HAL
open science

Biocapteur à base de bactéries pour le contrôle environnemental

Ibtissem Gammoudi

To cite this version:

Ibtissem Gammoudi. Biocapteur à base de bactéries pour le contrôle environnemental. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2012. Français. NNT : . tel-00985827

HAL Id: tel-00985827

https://theses.hal.science/tel-00985827

Submitted on 30 Apr 2014

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.

N° d'ordre : 4535

THÈSE

UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

FACULTÉ DES SCIENCES DE MONASTIR

ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE

Présentée par

Ibtissem GAMMOUDI

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉS : Électronique-Chimie

BIOCAPTEUR A BASE DE BACTERIES POUR LE CONTROLE ENVIRONNEMENTAL

Soutenue le 18 Juin 2012

Après avis des rapporteurs

M.	HAJ SAID Ayoub	Maître de Conférences – HDR, IPEI de Tunis	Rapporteur
M.	MOHAMMED-BRAHIM Tayeb	Professeur, Université de Rennes 1	Rapporteur

Devant la commission d'examen

Mme	COHEN-BOUHACINA Touria	Professeur, Université Bordeaux 1	Présidente de jury
Mme	DEJOUS Corinne	Professeur, IPB /ENSEIRB-MATEMECA	Co-directrice de thèse
M.	KALFAT Rafik	Professeur, Institut INRAP de Tunis	Co-directeur de thèse
M.	OTHMANE Ali	Professeur, Université de Monastir	Examinateur
M.	REBIERE Dominique	Professeur, Université Bordeaux 1, IUT	Examinateur
M.	HAJ SAID Ayoub	Maître de Conférences – HDR, IPEI de Tunis	Examinateur
M.	MOHAMMED-BRAHIM Tayeb	Professeur, Université de Rennes 1	Examinateur

Remerciements

Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragée, soutenue et confortée au long de toutes ces années. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

J'adresse une pensée particulière à Madame Corinne DEJOUS, Professeur à l'Institut Polytechnique de Bordeaux et ma directrice de thèse pour avoir accepté et encadré cette thèse, pour la confiance qu'elle m'a témoignée du début à la fin du travail, pour sa disponibilité à comprendre et à communiquer et sans oublier ses précieux conseils, pour ses qualités humaines, pour le temps qu'elle m'a accordé, notamment lors de la relecture du manuscript.

Je tiens également à remercier chaleureusement Madame Touria COHEN-BOUHACINA, Professeur à l'université Bordeaux 1 et responsable de l'équipe Biophysique et Nanosystèmes (BIOPHYNA) pour son aide, sa disponibilité, son soutien et surtout ses conseils et recommandations qui m'ont permis pas seulement d'acquérir de nombreuses compétences dans les domaines scientifique et académique mais aussi de développer ma personnalité.

J'aimerais aussi adresser un remerciement particulier à mon co-directeur de thèse Monsieur Rafik KALFAT, Professeur à l'Institut INRAP de Tunis, pour son aide et son soutien tout au long de ces années.

Je veux remercier ici très sincèrement les membres de mon jury de thèse, et tout particulièrement les rapporteurs du manuscript, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour avoir accepté de le juger.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Ali OTHMANE, Professeur à la Faculté de Médecine de Monastir, pour avoir initié ce travail et pour les idées innovantes qu'il m'a transmises.

De vifs remerciements vont à Monsieur Daniel MOYNET, du Laboratoire d'Immunologie Moléculaire et Parasitologie de l'Université Bordeaux 2 Victor Segalen, pour son accueil au sein de l'équipe et ses conseils et remarques, toujours pertinents.

J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe MDA du groupe microsystème sous la direction de Professeur Dominique REBIERE. Je pense particulièrement à Jean-Luc LACHAUD, Ingénieur d'Etude au sein de l'équipe, qui est toujours serviable et disponible.

Je remercie aussi les membres de l'équipe BIOPHYNA pour leur accueil et en particulier Fabien MOROTE, technicien de la plateforme NSI.

Mes dernières pensées iront vers mon fils Amen Allah, pour sa patience et son courage, ainsi que ma mère Jamila et ma sœur Henda qui se sont occupées de lui tout au long de mon parcours universitaire afin que je puisse préparer ma thèse dans de bonnes conditions. Je les remercie pour tous leurs sacrifices et l'amour qu'elles ont donné à mon fils.

Je remercie mes sœurs et mes frères pour leurs encouragements et en particulier ma sœur Mouna.

Un remerciement spécial pour mon père, sans lequel je n'aurai jamais eu l'opportunité de continuer mes études et effectuer cette thèse.

J'ai une pensée très tendre à l'endroit de mon beau-frère Houcine décédé il y a peu et qui serait content d'apprendre que j'ai enfin terminé ma thèse. Il m'a toujours donné l'espoir d'aller de l'avant.

Un grand merci à mon mari pour les nuits blanches qu'il a passé avec moi, même à distance pour m'encourager à finir la thèse.

Enfin, je remercie les deux familles DEJOUS et COHEN et tous mes amis, en particulier Hakim, Nima et Rokhaya, de m'avoir accompagnée et aidée pendant ces dernières années mais également pour les nombreux bons moments passés ensemble.

Résumé de thèse

La contamination par les polluants représente une menace pour l'environnement ainsi que pour la santé humaine puisque ces contaminants peuvent pénétrer dans le corps par l'alimentation, la respiration, l'absorption cutanée et l'exposition quotidienne aux innombrables produits chimiques crées et employés par les humains.

Ces polluants tels que les métaux lourds et les pesticides provoquent des maladies dangereuses et même mortelles (maladies cardiovasculaires, cancer, sclérose en plaques, syndrome de fatigues chronique, etc.).

Pour éviter ce bombardement constant du corps durant toute sa vie par ces toxines extérieures, et libérer graduellement le corps de son accumulation toxique, permettant au système immunitaire de fonctionner plus efficacement et promouvant le futur bien-être du corps, il faut contrôler constamment l'environnement et évaluer leur niveau de contamination.

En effet, il existe des méthodes classiques de détection de ces polluant telles que la spectroscopie de masse, l'absorption atomique, qui fournissent des informations très fine et complète, mais elles présentent des contraintes importantes de logistique, de coût et surtout du temps.

Les travaux de recherches actuels visent à élaborer et améliorer un outil capable d'entrer en concurrence avec ces techniques en sens de rapidité, stabilité et économie.

Le biocapteur qui présente la fusion de plus importantes technologies de ce siècle : l'électronique et les biotechnologies, pourrait être par cette association la base de la naissance d'un système efficace de détection précoce.

L'objectif de notre projet est la conception d'un micro-biocapteur à base de bactéries qui est sensible et utile en tant que capteur jetable pour le contrôle environnemental. L'étude de ce dispositif est particulièrement intéressante car elle permet de concilier à la fois l'aspect pratique du développement de systèmes directement utilisables pour des applications industrielles (surveillances de la pollution) et l'aspect recherche fondamentale au niveau de l'étude des interactions biochimiques entre l'espèce à détecter et le métabolisme cellulaire.

Mots clés: Microfluidique, PDMS, Capteur, Bacteries, Polyelectrolytes, Onde de Love, AFM, Electrochimie, Métaux Lourds.

Thesis summary

The high environmental pollution by toxic products including heavy metals presents a very aquatic medium threat. Therefore aquatic ecosystem management requires early warning systems for on line monitoring. New microtechnologies processing can give rise to innovative biologic devices capable to detect heavy metals. Such novel multidisciplinary biosensors technologies are able to provide a smart miniaturized sensor with low cost and high reliability that meet the needs and the expectations of users.

The aim of our project is the design of a micro-biosensor based on bacteria that is sensitive and useful as a disposable sensor for environmental control. The study of this device is particularly interesting because it allows to combine both the practical development of systems can be used directly for industrial applications (pollution monitoring) and the aspect of basic research in the study of biochemical interactions between species to detect and cellular metabolism. The aim of our project is the design of a micro-biosensor based on bacteria that is sensitive and useful as a disposable sensor for environmental control. The study of this device is particularly interesting because it allows to combine both the practical development of systems can be used directly for industrial applications (pollution monitoring) and the aspect of basic research in the study of biochemical interactions between species to detect and cellular metabolism.

In this subject, we developed a biosensor functionalized with whole bacteria *Escherichia.coli* as biological receptor; the value of *E.coli* is to mime the enzymatic activity present in vivo. E. coli is immobilized on polyelectrolyte multilayer (PEM) films realized by layer by layer technique (LbL) with successive adsorption of positive and negative charges, alternatively PAH (poly (allylamine hydrochloride)) and PSS (poly (styrene sulfonate)) . The acoustic delay line was inserted into an electronic oscillation loop for real time monitoring, and combined with a cell of polydimethylsiloxane (PDMS) with a microfluidic network used to control access to the surface of the bacteria and target species. A compatible microsensor with Love wave dispositive for electrochemical detection is fabricated with MEMS method. A microsystem with continuous and real time detection is elaborated , the sensor lead to efficient detection of ionic cadmium ad mercury in less than 60 seconds and with a detection limit better than 10^{-12} M. The AFM, through several modes of measurements, which allows to define the thickness, topography and to access to the nanomechanical properties of polyelectrolyte layers and bacteria immobilization, has demonstrated its ability as

complementary technique, to understand the phenomena occurring at the surface or near the interface of the sensor. Indeed, we present and analyze results of AFM characterization in liquid medium that showed high bacterial attachment and the stressing effect of toxic heavy metals on its morphological state, in good agreement with the sensor results.

Keywords: Microfluidic, PDMS, Sensor, Bacteria, Polyelectrolytes, Love wave, AFM, Electrochemical, Heavy metals.

Sommaire

Liste des abréviations et symboles 15

Liste des figures 19

Liste des tableaux 27

Introduction 29

1. État de l'art 33

1.1. Contexte de l'étude 33

1.1.1. Pollution de l'écosystème aquatique par les métaux lourds 33

1.1.2. Bioaccumulation des métaux lourds 34

1.1.2.1. Adsorption et assimilation 35

1.1.2.2. Bioconcentration 35

1.1.2.3. Bioamplification 36

1.1.3. Effets sur la santé humaine 37

1.1.3.1. Le mercure 37

1.1.3.2. Le cadmium 38

1.1.4. Principe de la biodétection par un biocapteur 38

1.2. Le biorécepteur 39

1.2.1. Les principaux biorécepteurs 39

1.2.1.1. Les enzymes 39

1.2.1.2. Les anticorps 40

1.2.1.3. L'ADN 40

1.2.1.4. Les micro-organismes 41

1.2.2. Notre choix : la bactérie *Escherichia Coli* 41

1.2.2.1. Effets des métaux lourds sur l'*Escherichia coli* 42

1.2.2.2. Les qualités requises du biocapteur bactérien 45

1.2.2.3. Techniques d'immobilisation des bactéries 45

1.3. Le transducteur 47

1.3.1. Plateforme optique 47

1.3.2. Plateforme électrochimique 48

1.3.2.1. Biocapteurs ampérométriques 48

1.3.2.2. Biocapteurs conductimétriques 49

1.3.2.3. Biocapteurs potentiométriques 49

1.3.2.4. Biocapteurs impédimétriques 49

1.3.3. Plateforme piézoélectrique 56

1.3.3.1. Capteur à onde de volume (Bulk Acoustic Wave BAW) 57

1.3.3.2. Capteur à onde de surface 58

1.3.3.3. Capteur à onde de Love 59

1.4. Exemples de Capteurs de métaux lourds 61

2. Méthodologies et théories 63

2.1. Plateforme à onde de Love 64

2.1.1. Le capteur à onde de Love 64

2.1.1.1. Ligne à retard 64

2.1.1.2. Couche guidante 65

2.1.1.3. Sensibilité 66

2.1.2. Électronique de conditionnement 66

2.1.3. Cellule de mesure 67

2.1.3.1. Principe général et cellule hydrostatique 67

2.1.3.2. Cellule de test hydrodynamique 68

2.1.4. Puce PDMS 69

2.1.4.1. Puce PDMS pour des mesures hydrostatiques 70

2.1.4.2. Puce PDMS pour des mesures hydrodynamiques 71

2.2. Microscopie à Force Atomique (AFM) 72

2.2.1. Introduction 72

2.2.2. Eléments constitutifs de l'AFM 73

2.2.2.1. Principe général 73

2.2.2.2. Sonde de mesure 74

2.2.2.3. La céramique piézoélectrique de positionnement 75

2.2.2.4. Système optique de détection 76
2.2.2.5. Le système d'asservissement 76
2.2.3. Utilisation de l'AFM 77
2.2.3.1. Modes de fonctionnement de l'AFM 77
2.2.3.2. Principales utilisations des modes 86
2.3. Éléments de théorie sur les écoulements 88
2.3.1. Fluides complexes 88
2.3.1.1. Définition des notions de viscosité 88
2.3.1.2. Etude des solutions polymères par viscosimétrie 89
2.3.2. L'hydrodynamique à bas nombre de Reynolds 90
2.3.2.1. Généralités 90
2.3.2.2. Nombre de Reynolds et écoulements 91
2.3.2.3. Réversibilité cinématique de Stokes 92
2.3.3. Application aux cellules microfluidiques des capteurs 93
2.3.3.1. L'intérêt de l'utilisation du réseau microfluidique 93
2.3.3.2. L'écoulement à travers le réseau microfluidique 93
2.4. Conclusion 94

3. Études sur les polyélectrolytes 96
3.1. Les polyélectrolytes en solution 97
3.1.1. Les polyélectrolytes utilisés 97
3.1.2. Les principaux paramètres 99
3.1.2.1. Longueurs caractéristiques et taux de charge 99
3.1.2.2. Longueur de Bjerrum 100
3.1.2.3. Paramètre de charge 101
3.1.2.4. Ecrantage des interactions électrostatiques 101
3.1.2.5. Rayon de giration 102
3.1.2.6. Viscosité 103
3.1.2.7. Coefficient de diffusion 104
3.1.2.8. Détermination du nombre de Reynolds 104
3.1.3. Polyélectrolytes en écoulement 105

3.1.3.1. Différents régimes de concentration de deux polyélectrolytes flexibles PAH et PSS 106
3.1.3.2. Déformation d'une chaîne isolée sous écoulement 107
3.2. Différentes méthodes de dépôts de PE et résultats expérimentaux 108
3.2.1. Films multicouches 108
3.2.1.1. Les différents types d'interaction 108
3.2.1.2. Principe de la technique LbL 109
3.2.2. Dépôt en cellule hydrostatique et suivi en temps réel par ondes de Love 110
3.2.2.1. Protocole de dépôt 110
3.2.2.2. Réponse acoustique aux multicouches de PE 111
3.2.3. Dépôt en cellule hydrodynamique et suivi en temps réel par ondes de Love 113
3.2.3.1. Protocole de dépôt 113
3.2.3.2. Réponse acoustique aux multicouches de PE 113
3.2.4. Influence de paramètres physico-chimiques sur la formation de multicouches 115
3.2.4.1. Effet du poids moléculaire 116
3.2.4.2. Effet du pH 116
3.2.4.3. Effet de la force ionique 117
3.3. Analyse de films de multicouches et de leur structure par AFM120
3.3.1. Calibration sur capteur nu 121
3.3.1.1. Protocole 121
3.3.1.2. Calibration 122
3.3.2. Mise au point du dépôt pour caractérisation par AFM 123
3.3.2.1. Dépôt par trempage 123
3.3.2.2. Optimisation de protocole du dépôt de PEM 123
3.3.2.3. Caractérisation de films PEM 125
3.3.3. Amélioration du dépôt par optimisation du pH 127
3.3.3.1. Influence du pH sur la formation de multicouches 127
3.3.3.2. Propriétés du film en fonction du nombre de couches de PEM 128
3.3.3.3. Détermination de l'épaisseur du film par AFM 131

3.3.4. Application : immobilisation des bactéries 132
3.3.4.1. Effet du pH 132
3.3.4.2. Effet d'une couche terminale de PSS 134
3.4. Conclusion 135

4. Détection des métaux lourds 136
4.1. Résultats de détection par électrochimie 137
4.1.1. Optimisation de la concentration bactérienne 137
4.1.2. Caractérisation de la détection des métaux lourds 138
4.1.2.1. Détection de l'ion cadmium Cd^{2+} 138
4.1.2.2. Détection de l'ion mercure Hg^{2+} 140
4.2. Résultats de détection par onde de Love 141
4.2.1. Mesures hydrostatiques 141
4.2.1.1. Préparation des capteurs 141
4.2.1.2. Détection des ions Hg^{2+} et Cd^{2+} 142
4.2.2. Mesures hydrodynamiques 145
4.2.2.1. Préparation des capteurs 145
4.2.2.2. La détection des ions Hg^{2+} et Cd^{2+} 146
4.3. Etude par AFM 149
4.3.1. Etape de calibration : Etude en milieu physiologique (et non agressif) 149
4.3.2. Surveillance du stress bactérien en présence de métaux lourds par AFM en milieu liquide 153
4.4. Amélioration du capteur à onde de Love par ajout d'une couche mince mésoporeuse de TiO_2 157
4.4.1. Réponse acoustique au dépôt du biofilm 158
4.4.2. Réponse acoustique pour la détection du cadmium 159
4.4.3. Etude par AFM de la durée de vie du capteur 160
4.5. Conclusion 166

Conclusion générale 168

Annexe 1 : Matériel salle blanche 171

Annexe 2 : Encres 173

Annexe 3 : Composés chimiques 176

Annexe 4 : AFM 181

Liste des abréviations et symboles

Symbole	Nom et Unité
a	*Taille d'un monomère*
ADN	*Acide Désoxyribonucléique.*
AFM	*« Atomic Force Microscopy », microscopie à force atomique.*
ARN	*Acide ribonucléique*
b	*Longueur de la chaîne*
C_H	*Capacité d'Helmoltz*
C_{dl}	*Capacité de double couche.*
C_t	*Capacité interfaciale totale de Stern*
C_G	*Capacité interfaciale de Gouy et Chapman*
CPE	*Elément de phase constant2.*
CV	*Cyclic voltammetry (voltamétrie cyclique)*
CL	*Cardiolipine*
c*	*concentration de recouvrement*
D	*Coefficient de diffusion*
E°	*Potentiel standard d'un couple redox.*
E_0	*Potentiel initial*
E_{max}	*Potentielmaximale*
E. coli	*Escherichia. Coli (Bactérie).*
ECS	*Electrode au Calomel Saturé (0,241 V vs. ESH à 25°C).*
f_0	*Fréquence fondamentale du cristal (f_0=5 MHz).*
f	*taux de charge*
$F_{Manning}$	*Condensation de Manning*
G	*Conductance (en siemens (s))*
GFP	*Green Fluorescent Protein*
IDTs	*Transducteurs interdigités (IDTs)*
if	*Courant faradique*
I	*force ionique*
ic	*Courant cathodique*
ISFET	*Ion sensitive filed effect transistor.*

ITO	*Oxyde de titane et d'étain.*
k_BT	*Energie d'agitation thermique*
K_{HD}^{-1}	*Ecrantage des interactions électrostatiques*
l	*Espace entre les deux cellules du conductimètre (en m)*
l_B	*longueur de Bjerrum*
L_D	*Epaisseur de la couche diffuse*
LbL	*Layer by Layer.*
MOSFETs	*Métal oxide semiconducter Field Efect Transistor*
NaCl	*Chlorure de sodium*
Ox	*Oxydant*
PEH	*Plan externe d'Helmoltz*
PIH	*Plan interne d'Helmoltz*
PE	*Polyélectrolytes*
PEM	*Polyelectrolytes multilayers*
PSS	*Poly (styrène sulfonate).*
PAH	*Poly (allylamine hydrochloride).*
PBS	*Phosphate buffer saline.*
PDMS	*Polydiméthylsiloxane.*
PHL 1273	*Souche d'Escherichia. Coli*
PG	*Phosphatidylglycérol*
P	*Pression(Pa)*
q	*Charge d'un électron*
Red	*Réducteur*
RCA	*(v :v ;1 :4 :20 ;NH_4OH ,H_2O_2,H_2O)*
R	*Constante molaire des gaz parfaits. (8, 314 j. K^{-1}.mol^{-1}).*
R_s	*Résistance de la solution.*
R_{tc}	*Résistance de transfert de charge.*
R_G	*Rayon de giration*
S	*Surface de cellules (en m^2)*
SAM	*« Self-Assembled Monolayer », monocouche auto-assemblée.*
S	*Sensibilité du capteur en vitesse à l'effet de masse*
TBS	*Tris Buffered Saline*
V_0	*Le potentiel sur la surface de l'électrode*
υ	*Viscosité cinématique ($m^2.s^{-1}$)*
μ	*Viscosité dynamique ($kg.m^{-1}.s^{-1}$)*
V	*Vitesse ($m.s^{-1}$)*

V_H	*Potentiel au plan externe de Helmholtz.*
V_P	*Vitesse de phase*
V_S	*Potentiel au sein de la solution*
V_t	*Tension thermique*
W	*Impédance de Warburg.*
W_{SL}	*Travail d'adhésion entre le solide et le liquide.*
T	*Température absolue (K).*
z	*Valence des ions*
Z	*Somme des impédances*
Z_{re}	*Impédance réelle*
Z_{im}.	*Impédance imaginaire*
Δm	*Variation de masse (en g)*
Δf	*Ecart de fréquence à la résonance (en Hz)*
Δm_s	*La variation de masse surfacique*
ρ_q	*Masse volumique de quartz*
λ_0	*Longueur d'onde*
ε_0	*Constante diélectrique relative du vide*
ε_r	*Constante diélectrique relative du milieu*
ξ	*Paramètre de charge*
ϕ'	*Constante de Flory*
τ_{Rousse}	*Equation de Rousse*
τ_{Zimm}	*Equation de Zimm*

Liste des figures

Figure 1-1: Cycle de l'eau [1] 34

Figure 1-2:Schéma explicatif de principe d'un biocapteur. 39

Figure 1-3 : Structure d'une cellule bactérienne [3] 42

Figure 1- 4: Principe de fonctionnement d'un équipement à résonance de plasmons de surface (SPR) 47

Figure 1-5: Eléments relatifs à l'impédance d'un capteur impédimétrique, a) Exemple de diagramme de NYQUIST, b) Circuit électrique équivalent proposé pour l'interface métal nu /électrolyte. 51

Figure 1-6: Exemple d'une courbe de voltamétrie cyclique d'une espèce redox diffusant en solution. 52

Figure 1-7**:** Variation du potentiel à l'interface conformément au modèle de Helmholtz. 53

Figure 1-8**:** Variation du potentiel avec la distance dans la couche diffuse selon le modèle de Guy et Chapman. 54

Figure 1-9 **:** Distribution de potentiel selon Stern. 55

Figure 1-10 : Répartition des charges à l'interface solide/liquide selon le modèle de Gouy-Chapman-Stern. 56

Figure 1-11 : Structure de principe d'un capteur à onde de volume. 58

Figure 1-12 : Caractéristiques d'un capteur à onde de surface. 59

Figure 1-13 : Schémas d'un capteur à onde de Love 60

Figure 1-14 : Biocapteurs commercialisés :a) capteur de glucose , b) test de grossesse 62

Figure 2-1: Schéma de principe d'un dispositif à onde de Love. 64

Figure 2-2 : Synoptique de la boucle d'oscillation. 67

Figure 2-3 : Cellule de mesure du dispositif à ondes de Love pour des mesures statiques (vue en éclaté) **[81]** 68

Figure 2-4 : Cellule de mesure du dispositif à ondes de Love pour des mesures hydrodynamiques (vue en éclaté) **[81]** 69

Figure 2-5 : a) Puce en PDMS pour le protocole hydrostatique sur un capteur à onde de Love, b) Moule utilisé pour la réalisation **[81]** 71

Figure 2-6 : Puce en PDMS avec réseaux microfluidiques. 71

Figure 2-17 : Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique. 73

Figure 2-18 : Images en microscopie électronique à balayage d'une pointe AFM a) pointe conique, b) pointe pyramidale, c) schémas d'une pointe. 75

Figure 2-19 : Schémas de deux modes de l'AFM, a) mode contact, b) mode contact intermittent (tapping). 78

Figure 2-20: Courbe de force idéalisée d'une pointe dure sur un matériau indéformable. La déflexion du levier est tracée en fonction du déplacement vertical de la surface (piézo). 79

Figure 2-21. Schéma de principe du microscope fonctionnant en mode tapping. 81

Figure 2-22 Mode opératoire en mode tapping. 82

Figure 2-23 : Modélisation de propriétés de la résonance. 83

Figure 2-24 **:** Modification de la courbe de résonance d'amplitude en fonction de la force d'interaction lors de l'approche de la surface en mode contact intermittent. 83

Figure 2-25 : Courbe Approche Retrait CAR pour les 2 régimes attractif-répulsif a) schéma « tapping », b) Courbe de résonance, c) Amplitude mode répulsif, d) Phase mode répulsif e) Amplitude mode attractif, f) Phase mode répulsif. 86

Figure 2-26 : Différents types d'écoulements. 92

Figure 2-27 : Simulation des vitesses d'écoulements dans la cavité microfluidique (Comsol®, 2208310 mailles, ~ 3 heures de calcul). 94

Figure 3-1 : Structure chimique du PSSNa partiellement sulfoné. 98

Figure 3-2 : Représentation de l'assemblage par interaction entre deux chaînes de polyélectrolytes. 99

Figure 3-3: Représentation schématique d'une chaîne polyélectrolyte. 99

Figure 3-4 : Longueurs caractéristiques d'une chaîne de polyélectrolytes (d'après Spiteri, 1997) avec R : longueur moyenne entre les extrémités, R_G : rayon de giration ; L : taille d'un monomère, b : distance moyenne entre deux sites ioniques consécutifs. 102

Figure 3-5 : Configuration de polyélectrolytes flexibles selon leur concentration. 107

Figure 3-6 : Procédure hydrostatique suivie pour le dépôt des multicouches de polyélectrolytes. 111

Figure 3-7 : Variation de fréquence du capteur au dépôt de films multicouches de PEM ; a) Exemple typique de réponse en temps réel; b) Variation de fréquence en régime permanent due au dépôt de chaque couche et mise en évidence de la reproductibilité des résultats (calculé à partir de la valeur moyenne de 4 mesures différentes sur 3 capteurs différents (cercles: PAH, carré: PSS). 112

Figure 3-8: Variations typiques de fréquence en temps réel (a) et en régime permanent (b) dues aux dépôts de PEM et reproductibilité des résultats (carrés noirs: PAH, cercles rouges: PSS). Les valeurs moyennes et les barres d'erreur ont été calculées à partir de 5 expériences avec différentes lignes à retard. 114

Figure 3-9 : Variations de fréquence pour un dépôt alterné de PAH/PSS sans étape de nettoyage. 115

Figure 3-10 : Réponses typiques obtenues avec le capteur à onde de Love, lors des étapes de dépôt de polyélectrolytes pour deux masses moléculaires différentes du PAH (M_W=15 kDa et M_W=15 kDa). 116

Figure 3-11 : Influence du pH sur la variation de fréquence lors des dépôts de PE (rouge : pH(PAH)=7,2, noir pH(PAH)=9). 117

Figure 3-12 : Influence de la force ionique sur les réponses acoustiques pour trois concentrations différentes (1,5 M ; 0,15 M ; 0,015 M). 118

Figure 3-13 : Illustration de la conformation d'une chaîne de polyélectrolytes selon la force ionique du milieu. 119

Figure 3-14 : Réponse du capteur acoustique en temps réel au dépôt de 8 bicouches de PAH/PSS (avec cellule hydrodynamique). 119

Figure 3-15 : Mode de croissance d'un film de PE à une force ionique égale à 0,15 M et jusqu'à 8 bicouches de PAH/PSS. 120

Figure 3-16 : La zone sensible caractérisée par AFM. 121

Figure 3-17 : Résultats d'AFM pour une surface de SiO_2 ; images topographiques 2D et 3D. La rugosité moyenne pour ces surfaces est de 3,32 nm (15 µm*15 µm) et de 2,49 nm (1 µm*1 µm). 122

Figure 3-18 : Processus d'un cycle de dépôt de multicouches de PE par trempage 123

Figure 3-19 : Images topographiques obtenues en mode tapping montrant la formation des cristaux sur un film de multicouches de PEM nettoyé par l'eau milli-Q et après des inter-étapes de rinçage avec le TBS. 124

Figure 3-20 : Images topographiques obtenues en mode tapping montrant l'influence du rinçage à l'eau MilliQ sur l'homogénéité du film PEM obtenu 124

Figure 3-21: Résultats obtenus en mode tapping sur 3 étapes de traitement de surfaces : SiO_2, SiO_2-PAH, SiO_2-(PAH-PSS). 125

Figure 3-22 : Irrégularité du film obtenu après le dépôt de multicouches de polyélectrolytes (ici, 3 bicouches de PEM) **:** image topographique de 5µm*5µm. 126

Figure 3-23: Comparaison de courbes de force sur les 3 surfaces : SiO_2, film de PEM et sur un agrégat. 126

Figure 3-24 : Images topographiques obtenues en mode tapping sur 3 surfaces ((a) : surface de silice, (b) : 3,5 bicouches de PE pour un pH de PAH égal à 7,2, (c) : 3,5 bicouches de PE pour un pH de PAH égal à 9. 127

Figure 3-25 : Evolution de la topographie de dépôts en fonction due nombre de couches de PEM (1, 2, 3, 4, 8 bicouches ; pH (PAH) = 9) pour chaque couche est représentée l'image de hauteur (rugosité, agrégats,..) ainsi que celle de la phase (hétérogénéité, charge, etc.)..... 129

Figure 3-26 : Evolution de la taille des agrégats (Hauteur, (a)) ainsi que celle de la rugosité (Rms,(b)) pour des films auto-assemblés de PAH/PSS. 130

Figure 3-27 : Résultats des expériences de grattage (avant et après) des trois surfaces : a) SiO_2, b) PEM_3-PAH, c) PEM_8-PAH 131

Figure 3-28 : Visualisation d'une section sur la zone grattée d'une surface de 17 couches PEM..... 132

Figure 3-29 : Image topographique d'AFM pour des bactéries immobilisées sur une surface SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH (pH=9). 133

Figure 3-30 : Comparaison entre les images topographiques d'AFM pour des bactéries immobilisées sur une surface SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH (pH=9, en haut) et une surface de SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH (pH=7,2, en bas)..... 134

Figure 3-31 : Image d'une bactérie déshydratée sur une surface de SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$ (pH=9) 135

Figure 4-1 : Réponse du capteur électrochimique à l'ion Cd^{2+} (10^{-9} M) pour différentes concentrations d'E.coli : la variation de la résistance de transfert de charge est maximale pour une densité optique proche de 0,6. 138

Figure 4-2: Spectres de Nyquist montrant la variation de l'impédance en fonction de la concentration de Cd^{2+} 139

Figure 4- 3 : Variation de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration de Cd^{2+}..... 140

Figure 4- 4 : Diagrammes de Nyquist montrant l'effet de l'ion Hg^{2+} sur la bactérie Escherichia coli par la réponse du capteur électrochimique. 141

Figure 4-5 : Etapes de dépôt de polyélectrolytes en configuration statique, chaque étape est suivie d'un nettoyage sous milieu tampon de sorte à éliminer les particules non immobilisées. 142

Figure 4-6 : Etapes de détection de métaux lourds en statique en présence d'une ligne de contrôle. 142

Figure 4-7 : Variation de la fréquence en temps réel de l'oscillateur à ondes acoustiques en fonction de la biodétection bactérienne pour des concentrations croissantes (a) de cadmium et (b) de mercure ; la reproductibilité est indiquée par des barres d'erreur représentant l'écart-type autour de la valeur moyenne, pour 4 tests effectués avec des capteurs différents. 144

Figure 4- 8: Etapes de dépôt de polyélectrolytes en configuration hydrodynamique. 145

Figure 4-9 : Etapes de détection de métaux lourds en hydrodynamique en présence d'une ligne de contrôle. 145

Figure 4-10 : Comparatif des réponses fréquentielles aux bactéries entre les deux protocoles, statique et microfluidique. 146

Figure 4-11: Réponse du capteur acoustique à l'immobilisation de E. coli (biorécepteur) et l'ajout de concentrations croissantes (a) de cadmium Cd (II) et (b) de mercure Hg (II) Courbes du haut : Variation typique de fréquence en temps réel (fréquence de résonance: 116 383 MHz) Courbes du bas : Réponses en régime permanent et reproductibilité des résultats ; les valeurs moyennes et les barres d'erreur représentant l'écart-type ont été calculées à partir de 4 expériences avec différentes lignes à retard 148

Figure 4-12 : Résultats obtenus en mode contact et en milieu liquide sur deux zones différentes de la surface les plus caractéristiques d'une population bactérienne. Ne sont reportées que les images de hauteur (images topographiques). 150

Figure 4-13 : a) Image topographique de bactéries isolées b) Section effectuée sur une bactérie isolée de caractéristiques typiques: longueur ~1,8 µm ; largeur à mi-hauteur ~ 1 µm; Hauteur ~ 500 nm. 151

Figure 4-14 : Expérience de force volume effectuée sur une population bactérienne (population dense) sur une surface SiO_2 de capteur. 152

Figure 4-15 : Suivi du comportement d'une population de 3 bactéries (1 à 3), avant et après injection de cadmium (AFM en mode contact, en milieu liquide), images 5×5 μm^2 : 2D (haut), 3D (bas). On remarque que la bactérie n°3 a disparu et que les bactéries n°1 et 2 ont changé de morphologies. 154

Figure 4-16 : Suivi du comportement de la bactérie numéro 2 par l'évolution de son profil (section longitudinale), avant et après exposition au cadmium (AFM en mode contact et en milieu liquide). 155

Figure 4-17 : Suivi du comportement d'une population bactérienne avant et après ajout de cadmium (mode contact et en milieu liquide) ; (a) Courbes de force « approche et retrait » effectuées sur la même bactérie avant et après l'addition de Cd^{2+} ; (b) Zoom de ces courbes force en approche, qui met en évidence le fait que l'élasticité de la bactérie dégradée par le Cd^{2+} est similaire à celle du substrat (pente= 0,8 alors que pour la bactérie saine elle est de 0,2)..... 156

Figure 4-18 : Comparaison de la variation de fréquence en temps réel de l'oscillateur à ondes acoustiques au dépôt du biofilm PEM (a) et bactéries (b) sur SiO_2 (4 µm) et SiO_2 (4 µm) + TiO_2 (100 nm). 159

Figure 4-19 : Réponse en fréquence du capteur à ondes acoustiques (SiO_2 + TiO_2 (100 nm)) au Cd (II) a) Variations de fréquences en temps réel (fréquence de résonance : 119,451 MHz) relatives à l'immobilisation de E. coli (biorécepteur) et l'ajout de concentrations croissantes de Cd (II), b) Variation de fréquence en régime permanent et reproductibilité des résultats, les valeurs moyennes et les barres d'erreur ont été calculées à partir de 4 expériences avec différentes lignes à retard sur les deux types de capteurs (Quartz+SiO_2 et Quartz+SiO_2+TiO_2 (100 nm). 160

Figure 4-20: Images AFM obtenues en mode tapping et à l'air sur un dépôt d'E. coli après 7 jours (a et b) TiO_2 mésoporeux ; (c) signal d'erreur correspondant (image d'amplitude) ; (d et e) SiO_2 : images topographiques (f) signal d'erreur correspondant (image d'amplitude). 162

Figure 4-21: Images d'AFM (3D) de bactéries (E. coli) sur le capteur TiO_2 aux 1er, 7ème, 15ème et 29ème jours de la durée de vie du biocapteur (stockage à 4 °C dans de l'eau MilliQ entre deux expériences AFM). 163

Figure 4-22: Diagramme de dispersion comparant le volume projeté des bactéries et la durée de vie sur deux surfaces différentes (Noir: SiO_2, Rouge: TiO_2). 164

Figure 4-23: Diagramme de dispersion montrant l'évolution du volume des bactéries en fonction du temps a) volume moyen pour 5 bactéries distinctes b) volume moyen estimé calculé avec deux logiciels (Noir: Gwiddion, Rouge: l'analyse Nanoscope). 165

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Capacités de bioconcentration de quelques espèces marines (INE RIS / AFSSA / CNRS - Synthèse OPECST)[]..... 36

Tableau 1-2 : Avantages et inconvénients de techniques d'immobilisation des bactéries..... 46

Tableau 1-3 : Exemples et performances de capteurs cellulaires dédiés pour la détection des métaux lourds 61

Tableau 2-1: Caractéristiques techniques du dispositif à onde de Love. 65

Tableau 3-1: Carte d'identité des polyélectrolytes utilisés. 98

Tableau 3-2 : Masse volumique et viscosité des polyélectrolytes utilisés. 104

Tableau 3-3 : Récupitulatif des paramètres des polyélectrolytes utilisés..... 105

Tableau 4-1 : Valeurs de la résistance de transfert de charge Rtc et de sa variation en fonction des ajouts de Cd^{2+} 139

Tableau 4-2 : Comparaison des valeurs de la variation de fréquence cumulée à l'état stationnaire | F-F0 | (en kHz), pour la détection des métaux lourds avec les deux protocoles : statique et hydrodynamique. 149

Tableau 5-1 : Pointes utilisées en mode Tapping..... 181

Tableau 5-2: Pointes utilisées en mode Contact..... 181

Introduction

La contamination par les métaux lourds représente une menace pour l'écosystème ainsi que pour la faune et la flore. De grandes concentrations de ces ions peuvent avoir des effets toxiques sur les organismes vivants [1]. En effet, de grandes quantités de métaux lourds arrivent dans l'environnement via l'industrie métallurgique, la combustion du charbon ou les hydrocarbures des pots d'échappement. Ils peuvent entrer facilement dans la chaîne alimentaire à travers diverses voies. Leur exposition à long terme dans l'environnement peut causer des effets toxiques et progressifs [2]. En conséquence l'élaboration de méthodes fiables pour détecter et éliminer ces métaux est d'une importance capitale. Cependant leur détection directe dans des échantillons est une tâche difficile. Les restrictions principales viennent de la complexité de leur matrice et de leurs très faibles concentrations, souvent en dessous de la limite de détection des techniques disponibles.

Les méthodes classiques de détection des métaux lourds sont fondées sur l'analyse physicochimique, telles la chromatographie ou la spectrométrie : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, GC-MS), chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS), spectrométrie d'absorption atomique (SAA), etc. Ces méthodes fournissent une information très fine et complète, mais elles présentent des contraintes importantes en termes de complexité et de durée d'analyse (échantillonnage, préparation, étalonnage, etc.). C'est la raison pour laquelle des recherches visent le développement d'une technologie simple, économique, rapide et fiable, utilisable pour la détection sur site, afin de fournir des données sur la présence des métaux dans l'environnement.

Dans le principe, un dispositif de type biocapteur, qui représente l'association des deux plus importantes technologies récentes, l'électronique et les biotechnologies, pourrait être à la base de la naissance d'un système efficace de détection précoce, avec des avantages notamment en termes de sensibilité et de rapidité. Un système appelé « biocapteur », combinaison d'un transducteur et d'un film de reconnaissance, a ainsi été décrit pour la première fois par Clark et Layons en 1965 [3], puis, en 1967, Updike et Hicks ont mis au point une électrode enzymatique permettant le dosage de glucose dans une solution biologique [4] (la diminution de la concentration d'oxygène mesurée était proportionnelle à la concentration en glucose).

Les capteurs peuvent être fonctionnalisés sur mesure, afin de viser des cibles spécifiques et de répondre ainsi aux besoins des industries de l'environnement, de la santé ou de l'alimentation, tout en gardant un socle technologique commun, permettant d'intéresser un industriel de la mesure par le rapprochement de plusieurs applications, susceptibles de représenter ensemble un marché important.

Le grand avantage des biocapteurs réside dans leur concept original autorisant la réalisation de systèmes de mesure intégrés, autofonctionnels, miniaturisables, aisés à mettre en œuvre et ne nécessitant que peu ou pas de traitement de l'échantillon à analyser. Ils constituent sans doute l'une des alternatives la plus séduisante, proposant ainsi des systèmes simples, fiables, rapides, économiques et sélectifs de détection.

Pour atteindre notre objectif, la détection de ces micropolluants toxiques et persistants [5] que sont les métaux lourds, nous élaborerons un système fusionnant des disciplines scientifiques et technologiques très éloignées, telles la bactériologie, la chimie des polymères, l'électrochimie et les ondes acoustiques, en faisant appel au domaine de la physique au sens large, pour la conception d'un biocapteur.

La miniaturisation du biocapteur nécessite l'utilisation de techniques de microfabrication qui permettent de réaliser un grand nombre de dispositifs à moindre coût. Pour réaliser ces nouveaux micro-biocapteurs, nous avons ainsi mis en œuvre des technologies de la microélectronique, et des microsystèmes en général, qui permettent de fabriquer des composants de taille micrométrique, utilisés par exemple dans les téléphones portables.

Afin de bien situer ce travail dans son contexte, le premier chapitre est consacré à un état de l'art sur le biocapteur et ses différents constituants, biorécepteur et méthode de transduction, dans l'optique de notre application. Une étude de l'effet des métaux lourds sur les micro-organismes vivants tels que les bactéries sera présentée dans ce chapitre.

Dans le deuxième chapitre, nous décrirons les différentes méthodologies utilisées pour la réalisation de deux types de plateformes de détection, à ondes acoustiques et électrochimique, en associant quelques éléments visant à la compréhension des caractérisations par microscopie à force atomique (AFM) et sur la théorie des écoulements mis en jeu dans les dispositifs microfluidiques associés aux structures.

Le troisième chapitre concerne une étude sur les polyélectrolytes comme méthode de fonctionnalisation de surface. Nous aborderons les principales caractéristiques de ces polymères, leur comportement en solution et en écoulement, dans le but de comprendre et optimiser la configuration du film auto-assemblé couche par couche sur la surface du capteur.

La mise au point d'un capteur pour la détection de métaux lourds à base de bactéries, immobilisées sur le film multicouche de polyélectrolytes, sera discutée dans le chapitre quatre, où nous allons présenter la détection de cadmium et de mercure en solution, en utilisant les plateformes à ondes acoustiques (onde de Love) et électrochimiques. Les différents résultats de mesure seront discutés et mis en perspective avec une étude approfondie par AFM, outil complémentaire de caractérisation des surfaces et des interactions s'y produisant. En dernière partie de chapitre, nous montrerons également l'opportunité d'utiliser une nouvelle couche ultra-sensible d'oxyde de titane mésoporeux sur la surface de transduction du capteur à onde de Love, en décrivant et quantifiant les différents résultats obtenus.

Enfin, une conclusion générale montrant l'originalité et les intérêts du biocapteur élaboré, clôturera ce manuscrit. Elle proposera aussi des perspectives à ce travail, d'une part, pour poursuivre le développement de ce type de micro-biocapteur dédié pour la détection de la toxicité des métaux lourds, et d'autre part, pour l'application des techniques mises au point à la conception de capteurs visant de nouvelles applications, telles que la contamination des eaux par des virus ou des bactéries, ou visant d'autres domaines tels que le domaine des biomatériaux.

Ces travaux ont été menés dans le cadre du projet CMCU Utique d'action en réseau n°10G1103.

Plusieurs laboratoires d'accueil ont été impliqués, notamment le laboratoire de biophysique (Université de Monastir), le Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine (LOMA, CNRS UMR 5798, Université Bordeaux 1), Le laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système (IMS, CNRS UMR 5218, IPB, Université Bordeaux 1), partenaires du projet CMCU mais également le laboratoire d'immunologie et parasitologie (Université Bordeaux 2) et le Laboratoire Des Méthodes et Techniques d'Analyse (LMTA, INRAP Sidi Thabet).

1. État de l’art

Les métaux lourds présentent une forte toxicité [6]. En conséquence leur présence dans l’eau, qui est une ressource essentielle pour la vie et pour les activités humaines, nécessite la réalisation d’un dispositif d’alerte et de contrôle immergé, rapide et efficace. Pour ce faire, les biocapteurs sont considérés comme des instruments avantageux par rapport aux autres moyens existants qui apparaissent lourds et fastidieux. En effet, ils allient facilité et simplicité d’utilisation avec fiabilité et rapidité des mesures. De surcroît ils présentent un faible coût de fabrication.

Dans ce chapitre, nous présentons le contexte de l’étude, notamment les propriétés de quelques métaux lourds, le mécanisme de leurs bioaccumulations et leurs effets, particulièrement sur le métabolisme de la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) que nous retiendrons comme biorécepteur, Le principe général d’un biocapteur est rappelé, ainsi que les principaux éléments le constituant, en détaillant davantage le principe des biorécepteurs et des transducteurs retenus pour nos travaux. Ces éléments de l’état de l’art s’appuient sur de nombreuses références bibliographiques, dont beaucoup de récentes montrent l’intérêt de la communauté scientifique pour l’enjeu de tels systèmes dan le cadre de ce type d’application.

1.1. Contexte de l’étude

1.1.1. Pollution de l’écosystème aquatique par les métaux lourds

Sont considérés comme des métaux lourds, les éléments du tableau périodique qui ont une masse volumique supérieure à 4,5 g/cm^3 d’après le protocole d’Aarhus (Danemark, juin 1998) dans la convention de Genève.

Les métaux lourds les plus souvent considérés comme poisons pour l’homme sont le plomb (Pb), le mercure (Hg), l’arsenic (As), le cadmium (Cd), d’autres comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le chrome (Cr) pourtant nécessaires à l’organisme en petites quantités, mais deviennent toxiques à des doses plus importantes [7,8].

Par le biais du cycle de l'eau (Figure 1-1) les écosystèmes aquatiques sont susceptibles d'être contaminés par les métaux lourds par des voies diverses et variées, d'origines accidentelles ou d'usage, entraînant des effets dommageables pour les êtres vivants.

Les problèmes associés à la contamination par les métaux lourds ont été mis en évidence pour la première fois dans les pays industriellement avancés en raison de leurs déversements industriels plus importants. En effet, pendant des dizaines d'années, les fleuves ont hérité des rejets, des eaux résiduaires et des déchets liquides résultant de l'extraction ou de la transformation de matières premières et de toutes les formes d'activités de production industrielle. A l'heure actuelle, bien que le niveau des activités industrielles soit relativement moins élevé dans des régions sous développées comme l'Afrique, on y observe néanmoins une prise de conscience croissante de la nécessité de gérer rationnellement les ressources aquatiques et notamment de maîtriser les rejets de déchets dans l'environnement.

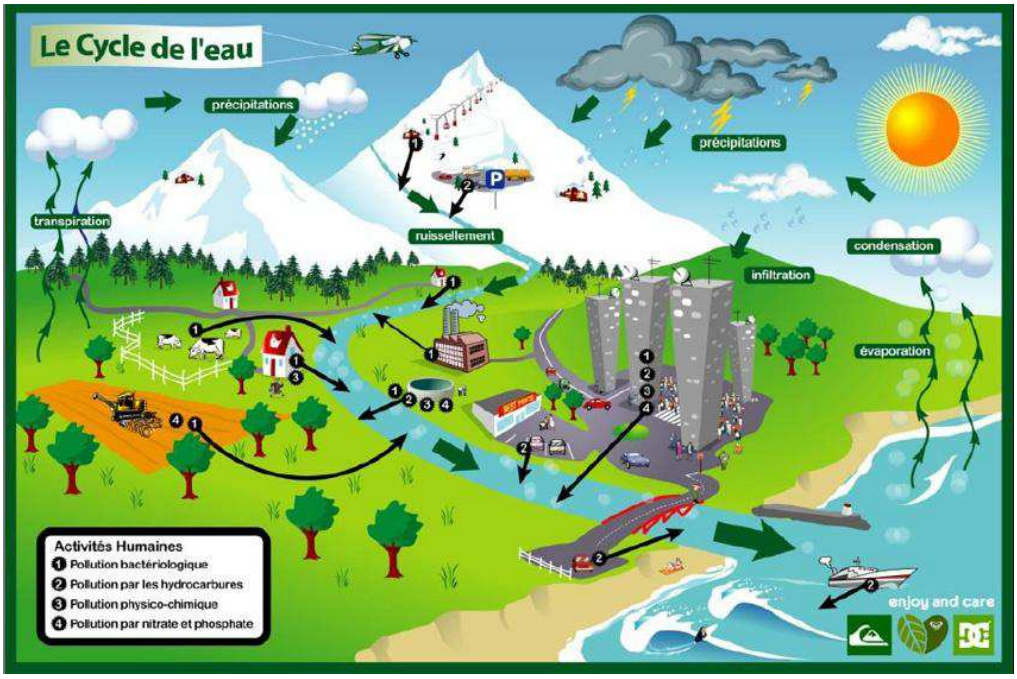


Figure 1-1: Cycle de l'eau [9]

1.1.2. Bioaccumulation des métaux lourds

L'eau est évidemment un élément particulièrement important pour les polluants en général et les métaux lourds en particulier, qui apparaissent comme des micro- polluants susceptibles d'être impliqués dans des réactions chimiques liées à l'acidité, l'alcalinité, la température et l'oxygénation notamment.

Les milieux aquatiques sont très sensibles à ces éléments, même à l’état de traces, par la coexistence de deux phénomènes : la bioaccumulation et la bioamplification qui peuvent entraîner une forte accumulation dans certains organismes vivants. De ce fait les métaux lourds se retrouvent au final dans la chaîne alimentaire. Le processus de bioaccumulation des métaux lourds se développe en trois parties, décrites en suivant.

1.1.2.1. Adsorption et assimilation

Lors de l’exposition, l’adsorption de polluants métalliques concerne la seule fraction soluble et biodisponible, généralement 95%, l’autre fraction, soit 5%, est insoluble et sera éliminée par différentes voies (digestive, urinaire et cutanée). La partie biodisponible et assimilable se concentre dans certains organes, c’est ce qu’on appelle l’organotropisme. Par exemple le cadmium se concentre presque exclusivement dans le tube digestif, le foie et les reins [10]. Le plomb diffuse également dans la peau, les muscles et la colonne vertébrale. Le mercure, dans sa forme organique, diffuse dans tout le système nerveux et le fœtus [11].

1.1.2.2. Bioconcentration

Les organismes, notamment les espèces aquatiques vivantes concentrent les métaux lourds. Cette bioconcentration des métaux lourds par les organismes vivants présente une hiérarchie entre les espèces, qui sont classées selon leur disposition à les concentrer.

Le tableau après donne une indication schématique de l’importance de la bioconcentration pour quelques espèces marines. Un facteur de bioconcentration moyen de l’ordre de 2000 et classiquement retenu.

Tableau 1-1 : Capacités de bioconcentration de quelques espèces marines (INE RIS / AFSSA / CNRS - Synthèse OPECST)[12].

Métal ***Espèce***	***cadmium***	***mercure***	***plomb***
Plantes	faible	faible	faible
Invertébrés	moyenne à forte	moyenne à forte	moyenne
Vers	moyenne	moyenne à forte	moyenne
Mollusques	moyenne	moyenne à forte	moyenne
Crustacés	forte	moyenne à très forte	moyenne
Moules	forte	moyenne	forte
Huîtres	très forte	faible	moyenne
Poissons	faible	moyenne à forte	faible
Harengs/sardines	faible	faible	faible
Plies/soles	faible	moyenne	faible
Bars/roussettes	moyenne	moyenne	moyenne
Espadons/thons	moyenne	forte	moyenne

1.1.2.3. Bioamplification

Le polluant, présent dans les algues et les microorganismes, est ingéré par un herbivore, lui-même proie d'un carnivore, qui est à son tour proie d'un supercarnivore, animal ou homme. En fin de chaîne, on trouve ainsi un consommateur final ayant bioaccumulé les formes solubles des métaux.

Il peut arriver que les concentrations augmentent au fur et à mesure que l'on progresse dans la chaîne trophique. C'est le cas du plomb et surtout du mercure sous la forme méthylée. Le mercure s'accumule à chaque étape et se retrouve concentré en bout de chaîne alimentaire, notamment dans les gros poissons piscivores. On nomme ce phénomène la «bioamplification» (ou « biomagnification », du terme anglo-saxon). Un facteur de l'ordre de 10^6 est généralement retenu entre les concentrations relevées au niveau des organes concentrateurs chez l'être humain par rapport aux concentrations dans l'eau.

1.1.3. Effets sur la santé humaine

Nous présenterons le mercure et le cadmium qui sont les deux métaux lourds considérés comme les plus toxiques ainsi que leurs effets sur la santé humaine.

1.1.3.1. Le mercure

Le mercure présent dans l'eau a diverses origines : l'industrie papetière, l'électronique, les thermomètres, l'extraction aurifère et est également présent dans les amalgames dentaires. On peut donc le retrouver chez les poissons se trouvant dans les parties les plus « hautes » de la chaîne alimentaire comme le thon, les huîtres et les moules qui servent de la nourriture pour l'être humain.

Le mercure est reconnu comme une substance puissamment neurotoxique qu'il soit inhalé ou ingéré (contaminant alimentaire). On peut citer les graves conséquences sur la population de pêcheurs de la baie de Minamata (Japon, années 1950, utilisation de Methyl mercure comme catalyseur) qui a fait plus de 1000 morts [13].

La toxicité du mercure provient de son extrême volatilité, de sa relative solubilité dans l'eau ainsi que de sa capacité à se lier avec d'autres molécules qu'il va modifier ou dont il va transformer les fonctions. Ainsi, dans l'organisme, le mercure peut se lier aux molécules constituant la cellule vivante (protéines, acides nucléiques, etc.) et modifie leur structure ou inhibe leur activité biologique.

Il présente des effets indésirables sur la santé tels que perte de mémoire, dépression, tendances suicidaires, troubles de fonctions cérébrales, asthénie, troubles visuels, paralysie, infections répétées ou cancer [14]. C'est un sujet qui a beaucoup intéressé les chercheurs. Par exemple, des laboratoires de recherche médicale ont établi le fait que l'amalgame dentaire est un contributeur majeur à la charge corporelle en mercure. En 1997, une équipe scientifique a démontré que l'inhalation de vapeurs de mercure par les animaux produisait une lésion moléculaire dans le métabolisme des protéines du cerveau similaire aux lésions observées dans 80% des cerveaux affectés de la maladie d'Alzheimer. Récemment, des expériences effectuées par des scientifiques de la faculté de médecine de l'université de Calgary ont révélé avec des preuves visuelles directes des cultures de neurones, comment les ions de mercure altèrent la fabrication des cellules neuronales en développement, pour mieux comprendre l'effet du mercure sur le cerveau. En effet, les dérivés organico-métalliques du mercure comme le méthyle mercure, forment un complexe très puissant qui peut provoquer des lésions permanentes dans les neurones, ainsi que la désamination de l'ADN ou sa méthylation.

1.1.3.2. Le cadmium

Le cadmium est un métal extrêmement toxique qui est largement utilisé dans la galvanoplastie. Il est également présent dans la fumée de cigarette, dans certaines peintures industrielles et dans certains produits destinés aux activités agricoles (engrais phosphorés) qui peuvent représenter un danger lors de leur pulvérisation et entraîner une pollution de la nappe phréatique. Le cadmium est aussi utilisé dans la fabrication et le recyclage de certains types de batteries.

Chimiquement, lorsqu'il est à l'état élémentaire atomique, tout comme le mercure et le plomb, le cadmium n'est pas toxique pour les organismes vivants. Mais il le devient après transformation chimique ou biochimique en un cation divalent M^{2+}.

Le cadmium est un métal d'origine naturelle, il est généralement présent dans l'environnement comme un minéral combiné avec d'autres éléments (par exemple, l'oxygène, le chlore et le soufre).

La toxicité du cadmium se produit par voie orale ou respiratoire [15], pouvant provoquer à court ou à long terme des problèmes de santé graves car il est capable de remplacer le calcium dans l'organisme et d'entraîner une fuite calcique.

Cette exposition affecte les poumons, les reins, les os et le système immunitaire. Elle peut conduire au cancer des poumons et à celui de la prostate, être à l'origine de troubles cardiovasculaires, ou encore causer le jaunissement des dents et provoquer de l'anémie. Le cadmium semble aussi contribuer aux maladies auto-immunes de la thyroïde, il est classé cancérigène et peut conduire au décès.

1.1.4. Principe de la biodétection par un biocapteur

Le biocapteur est un nouvel outil d'analyse miniaturisé, dont le principe (Figure 1-2) repose sur un processus de détection biologique. Il se définit comme un composant associant une membrane et comprend :

- une espèce biologique permettant la reconnaissance de l'espèce cible,
- un transducteur permettant de transformer l'évènement de reconnaissance en un signal physique mesurable.

L'élément biologique peut être, typiquement, un peptide, une enzyme, un acide nucléique, un anticorps ou un micro-organisme.

Le mode de transduction peut être, classiquement optique, électrochimique, piézoélectrique ou calorimétrique.

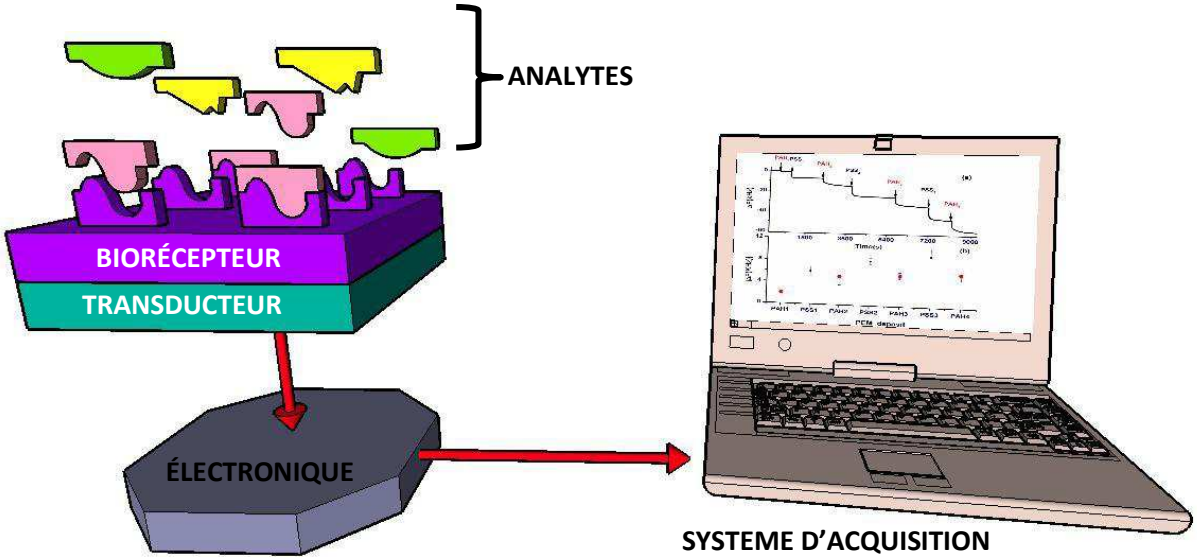


Figure 1-2:Schéma explicatif de principe d'un biocapteur.

Dans les deux parties suivantes sont exposés les principes des plus couramment rencontrés parmi ces éléments de reconnaissance et de transduction.

1.2. Le biorécepteur

1.2.1. Les principaux biorécepteurs

Le choix du matériel biologique utilisé comme biorécepteur dépend de plusieurs critères, comme sa spécificité, sa stabilité et la nature des substances chimiques ou biologiques à analyser. On peut distinguer divers types de biocapteurs, classés en fonction de l'élément sensible mis en œuvre comme biorécepteur : les capteurs enzymatiques, les capteurs immunologiques, les capteurs à ADN et les capteurs cellulaires ou bactériens [16].

1.2.1.1. Les enzymes

Les enzymes sont des protéines qui catalysent des réactions biochimiques chez les êtres vivants. Il en existe différentes sortes dans les cellules. Comme toutes les protéines, les enzymes sont constituées d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques [17]. Chacune catalyse une réaction spécifique avec un substrat spécifique. Cela signifie qu'une enzyme peut se lier avec une molécule reconnue (substrat) parmi des milliers d'autres et la transformer

toujours de manière identique à une vitesse très élevée. Les enzymes peuvent être utilisées en dehors de leur organisme d'origine, dans des préparations *in vitro*.

Ces propriétés fondamentales les rendent aptes à être utilisées dans la fabrication des biocapteurs. Le capteur enzymatique permet de détecter un produit d'une réaction chimique catalysée par l'enzyme, comme dans le cas du premier biocapteur biomédical réalisé par Updike et Hicks [18], qui opère le dosage du glucose en suivant l'activité enzymatique de la glucose-oxydase. Ce principe de détection est aussi utilisé pour des capteurs environnementaux où l'activité enzymatique (comme le cas de l'uréase et la β-galactosidase) est inhibée en présence de métaux lourds qui prennent la place des métaux M^{2+} nécessaires pour leurs activités.

1.2.1.2. Les anticorps

Les anticorps sont des immunoglobulines, protéines circulantes du milieu intérieur constituées d'une partie constante et d'une partie variable. Ils sont des effecteurs de l'immunité acquise et agissent en se liant spécifiquement aux antigènes qui ont déclenché leur expansion.

Les anticorps sont utilisés comme biorécepteurs dans la conception des immunocapteurs. Leurs principaux avantages sont leur très grande sélectivité et spécificité vis-à-vis de l'agent à détecter [19].

1.2.1.3. L'ADN

L'ADN contient l'information génétique responsable de la transmission des caractères héréditaires au cours des générations. Il porte le code génétique nécessaire à la synthèse des protéines.

Cela traduit l'importance de l'usage des séquences d'ADN comme biorécepteur fondé sur le principe de la détection d'événements d'hybridation reflétant la connaissance entre deux séquences complémentaires et permettant notamment la détection des mutations génétiques [20]. Les biocapteurs à ADN sont les premiers à faire l'objet du système miniaturisé, sous l'appellation courante de biopuce. Pour l'analyse d'ADN, le volume nécessaire pour une réaction varie de quelques microlitres à quelques centaines de nanolitres.

1.2.1.4. Les micro-organismes

Les micro-organismes sont utilisés comme biorécepteurs, car ils présentent un grand nombre d'avantages. En effet, ils sont capables de métaboliser une grande variété de composés chimiques, ils peuvent s'adapter à un environnement défavorable et développer une capacité à dégrader de nouvelles molécules [21].

Les micro-organismes paraissent représenter une alternative à l'utilisation d'enzymes purifiées coûteuses qui manquent généralement de stabilité. En effet, la culture de ces organismes vivants est souvent simple et peu onéreuse. De plus, les enzymes produites dans la cellule se trouvent dans un environnement « naturel » favorable à leur stabilité. Ainsi, les biocapteurs à micro-organismes ont en général, des durées de vie plus longues que les biocapteurs enzymatiques.

De plus, les cellules entières sont susceptibles d'être affectées au niveau de leurs activités, et permettent de ce fait d'obtenir une réponse plus physiologique à un toxique en délivrant une information sur l'effet d'un stimulus extérieur sur un système vivant.

Des biocapteurs à microorganismes génétiquement modifiés ont été élaborés : des plasmides recombinants ont été introduits dans ces microorganismes afin de transférer le gène de la luciférase et permettre ainsi des mesures de luminescence. La présence de toxiques va diminuer la luminescence par inhibition du gène lux ou de ses promoteurs. Ces biorécepteurs sont notamment utilisés pour la détection de métaux lourds ou la surveillance de procédés de bioremédiation [22]. Il est généralement admis que les micro-organismes sont plus sensibles aux métaux lourds que les plantes ou les animaux vivants dans les sols pollués [23].

1.2.2. Notre choix : la bactérie *Escherichia Coli*

Les micro-organismes les plus utilisés pour la détection des toxiques sont les bactéries (Figure 1-3) qui représentent les plus simples des organismes se trouvant dans la plupart des environnements naturels. Elles sont, unicellulaires, procaryotes, de dimension allant typiquement de 1 à 10 µm de long et caractérisées par une absence de noyau et d'organites. Elles peuvent se présenter sous différentes formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), ou encore plus ou moins spiralées. Elles possèdent souvent une coque protectrice résistante, appelée paroi cellulaire, sous laquelle une membrane plasmique entoure un compartiment cytoplasmique unique contenant de l'ADN, de l'ARN, des protéines et des ribosomes.

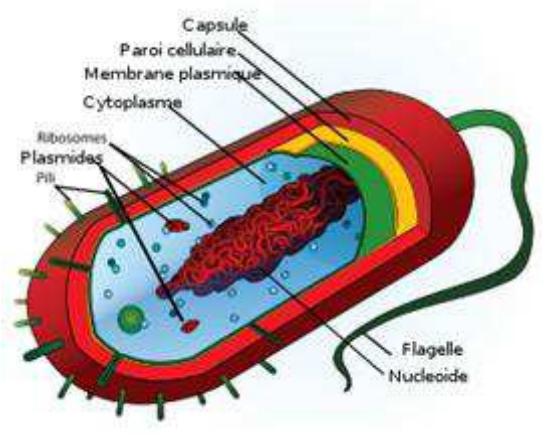


Figure 1-3 : Structure d'une cellule bactérienne [24]

Dans ce travail nous avons utilisé la bactérie *Escherichia coli* comme biorécepteur pour la détection des métaux lourds, en utilisant leurs effets physiologiques et sur l'activité de cette bactérie. En particulier, les métaux lourds possèdent des effets sur la structure tridimensionnelle des protéines ou sur l'intégrité de la membrane cellulaire, impliquant des modifications de la croissance, la morphologie et le métabolisme de ces micro-organismes [25]. Ces altérations conduisent à des réductions de biomasse microbienne.

1.2.2.1. Effets des métaux lourds sur l'*Escherichia coli*

Pour une meilleure compréhension des résultats qui seront obtenus dans le cadre de nos travaux, nous décrivons ici de manière plus détaillée ces effets des métaux lourds sur l'*Escherichia coli*.

a. L'inhibition des activités enzymatiques

En général, les cations métalliques sont en mesure de se fixer sur des résidus cystéines ou d'acides aspartiques présents dans les sites actifs de nombreuses enzymes. De même, en large excès, l'ion métallique peut rentrer en compétition avec un autre ion situé dans le site actif de l'enzyme, par exemple un ion cadmium peut remplacer un ion calcium. Les métaux lourds, de par leur charge positive, réagissent fortement avec les charges négatives des fonctions latérales de certains acides aminés et des protéines, notamment la cystéine. Le mercure, très efficace de ce point de vue, réagit avec son groupe thiol, jouant normalement un rôle important dans l'état d'oxydoréduction et l'activité de nombreuses enzymes qui se trouvent ainsi inhibées et/ou inactives, engendrant diverses pathologies.

Les métaux lourds tendent à se substituer aux éléments nutritifs tels que le calcium, le magnésium, le zinc, le manganèse et le cuivre, affaiblissant ou éliminant ainsi toute l'activité enzymatique qui découle de ces minéraux.

Il est bien établi que les métaux lourds, tel le Cd^{2+}, sont toxiques pour la plupart des micro-organismes. En effet, des travaux antérieurs ont confirmé la localisation de certaines enzymes qui subissent une perturbation de leurs activités, en présence de métaux lourds. Ces enzymes sont les phosphatases alcalines [26,27], les nitrates réductases [28,29] et la β-galactosidase [30,31]. Or deux de ces deux familles d'enzymes au moins sont présentes dans la bactérie *E.coli* : phosphatase et réductase, ce qui justifie son intérêt comme biorécepteur pour des études de toxicité.

- **La phosphatase alcaline**

C'est une enzyme de la famille des phosphatases qui est responsable de l'hydrolyse des molécules phosphorées donnant l'orthophosphate. Les phosphatases sont activées en présence de l'ion Mg^{2+} qui permet la stabilisation de l'enzyme dans sa conformation la plus active.

Plusieurs études ont démontré que l'activité de la phosphatase alcaline est inhibée en présence des métaux lourds divalents (cation M^{2+}) qui peuvent également jouer le rôle de Mg^{2+}.

Le Cd^{2+} et le Hg^{2+}sont classés comme des métaux lourds mous qui se lient de façon privilégiée avec des ligands mous polarisés tel que les fonctions SH au niveau du site actif de la phosphatase alcaline.

- **La nitrate réductase**

La nitrate réductase est une enzyme cytoplasmique. Une fois dans les cellules, la nitrate est dans un premier temps réduite en nitrite, puis dans un deuxième temps transformée en azote ammoniacal qui se lie alors rapidement à un composé organique.

$$NO^-_3 \xrightarrow{2e^-} NO_2 \xrightarrow{2e^-} X_1 \xrightarrow{2e^-} X_2 \xrightarrow{2e^-} NH^+_4$$

Pour réduire le nitrate en ammonium (NH_4^+), 8 électrons sont transférés au cours de 4 étapes; le passage du nitrate au nitrite est bien connu, mais pas la nature de X1 et X2 qui sont des produits intermédiaires liés à des enzymes.

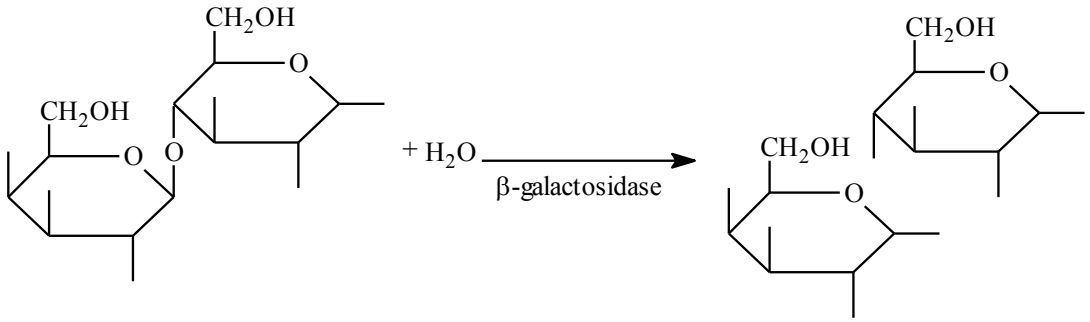
La réduction du nitrate en nitrite se réalise globalement selon la réaction suivante :

$$NO^-_3 + 2e^- + 2H^+ \longrightarrow NO^-_2 + H_2O$$

Des résultats ont montré que les métaux lourds et surtout le cadmium sont des inhibiteurs du processus de réduction de NO^{3-}[32].

- **La β- galactosidase**

La β- galactosidase d'*Escherichia Coli* catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose, comme représenté sur la réaction ci-après, et hydrolyse également les β-galactosides.



La β- galactosidase est une enzyme tétramérique constituée de 4 sous-unités identiques, mais inactives séparément.

Les ions Mg^{2+}stabilisent les associations entre les sous-unités et le 2-mercaptoéthanol en maintenant les groupements thiols à l'état réduit. Ils empêchent également la formation de dimères inactifs et constituent ainsi un conservateur de l'activité.

b. Les autres effets sur la cellule bactérienne

En plus de l'inhibition des activités enzymatiques, les métaux lourds peuvent avoir d'autres modes d'actions sur la cellule bactérienne. Ainsi, l'altération de la structure des acides nucléiques : la fixation des cations métalliques sur les groupements phosphates des acides nucléiques peut entraîner des variations de structure empêchant la transcription ou la traduction des gènes.

Egalement, les espèces oxygénées réactives issues des processus cellulaires respiratoires peuvent interagir avec les métaux et former des radicaux libres, ceux-ci endommagent différents constituants cellulaires tels que :

- les molécules d'ADN en créant des cassures pouvant mener à l'instabilité du génome,
- les protéines, en générant des pontages entre molécules,
- les acides gras insaturés de la membrane cellulaire entraînant ainsi la déstabilisation de ces membranes.

1.2.2.2. Les qualités requises du biocapteur bactérien

Les effets des espèces cibles sur le biocapteur bactérien retenu, doivent lui permettre de remplir un certain nombre de conditions, afin que le capteur puisse présenter les caractéristiques requises, notamment :

- stabilité : l'activité de la bactérie doit être maintenue pendant les mesures,
- sélectivité : la bactérie doit reconnaître un seul analyte défini,
- sensibilité : les concentrations faibles doivent être détectées.

1.2.2.3. Techniques d'immobilisation des bactéries

De plus, la fabrication des biocapteurs nécessite une immobilisation efficace de l'élément biologique, pour assurer la bonne détection du signal biochimique. Les bactéries peuvent être immobilisées par des méthodes physiques ou chimiques. Les procédés classiquement utilisés consistent à fixer les cellules sur un support par adsorption ou par liaison covalente, ou à les confiner dans une matrice par inclusion.

a. Liaison covalente

Cette technique d'immobilisation exige la présence de groupements fonctionnels sur la surface du transducteur telles que la fonction carboxylique (-COOH), la fonction amine (-NH_2), la fonction hydroxyle (-OH) ou la fonction thiol (-SH) [33].

b. Le confinement et l'inclusion dans un gel

La bactérie est confinée à l'intérieur du réseau tridimensionnel d'une matrice. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de la bactérie, cette technique est fréquemment utilisée [34,35]. Cette matrice peut être constitué d'un polymère plus ou moins rigide et synthétique (polyacrylamide par exemple) ou naturel (protéine comme la gélatine ou polysaccharide comme la cellulose, l'agar-agar ou les alginates). C'est à ce jour la seule technique qui ait un réel développement industriel.

c. L'adsorption et la technique « layer by layer »

L'adsorption est le procédé le plus anciennement étudié par lequel les cellules adhèrent à un support inerte par le biais d'interactions électrostatiques attractives.

Un exemple typique de ce type d'immobilisation est la méthode couche par couche (ou LbL pour« layer by layer »), qui permet la construction de films multicouches, typiquement par adsorptions successives de polyélectrolytes alternativement chargés positivement ou négativement. Cette technique constitue à elle seule, un secteur de recherche très convoité par

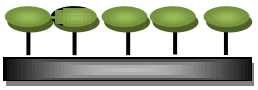
sa simplicité et ses applications variées, notamment pour la fonctionnalisation de divers types de surface : or, ITO, verre, nanoparticules, etc. Ces multicouches sont très stables et se fixent sans agitation ni ultrason. Le rendement moyen après chaque cycle d'adsorption est élevé (95-98%), ce qui autorise l'adsorption d'un grand nombre de couches avec un taux d'agrégation réduit au minimum [36].

Le dépôt couche par couche peut être appliqué à de nombreux polyélectrolytes, comme le poly (styrène sulfonate) (PSS) et le poly (hydrochlorure d'allylamine) (PAH) que nous utiliserons, ou pour la fixation rapide et aisée de cellules eucaryotes ou procaryotes, sur le film formé par ces deux polyélectrolytes.

d. Récapitulatif

Le tableau suivant récapitule ces principales méthodes d'immobilisation, et leurs avantages et inconvénients respectifs.

Tableau 1-2 : Avantages et inconvénients de techniques d'immobilisation des bactéries

Type d'immobilisation	Adsorption	Confinement physique	Liaison covalente
Avantages	* réutilisation possible de la matrice * traitement peu dénaturant : pas de modification de l'élément biologique	* pas de modification chimique des cellules	* faible contrainte diffusionnelle * liaisons fortes entre l'élément biologique et la matrice * résistance aux changements de pH et de force ionique
Inconvénients	* fixation fragile et sensible à une variation de pH, de la force ionique, de la température, ce qui pourrait provoquer la désorption de l'espèce adsorbée	* peut provoquer une déformation des cellules	* toxicité des molécules utilisées
Schéma représentatif			

Espèces chimiques (polyélectrolytes, groupements thiol, etc.) ou biologiques

1.3. Le transducteur

Les biocapteurs peuvent être regroupés selon le mode de transduction mis en jeu : optique, électrochimique ou piézoélectrique, notamment. Nous détaillerons plus particulièrement les capteurs électrochimiques et surtout impédimétriques, ainsi que les capteurs piézoélectriques, qui seront utilisés au cours de la suite.

1.3.1. Plateforme optique

Une large variété de méthodes de transduction optiques a été utilisée pour les biocapteurs grâce à ces techniques de transduction telles que l'ellipsométrie, l'interférométrie, la spectroscopie par diffraction ou par des miroirs résonants ou encore par résonance de plasmons de surface (SPR). Une reconnaissance biologique est déterminée par une variation d'indice de réfraction, par des propriétés d'absorbance des analytes ou par changement opto-chimique de la zone de transduction.

La méthode optique la plus utilisée et appropriée aux biocapteurs est sans doute la méthode SPR (Figure 1- 4) qui permet d'envisager des dispositifs miniatures. Ce type d'appareil trouve différentes applications industrielles, en particulier dans l'agroalimentaire [37], l'immunogénicité [38], la protéomique [39,40] et la découverte de médicaments [41].

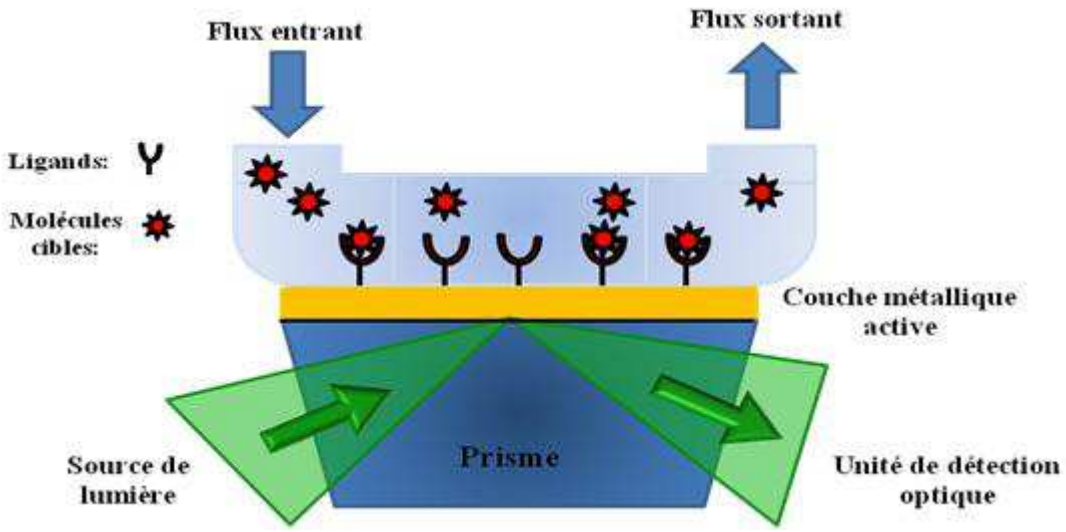


Figure 1- 4: Principe de fonctionnement d'un équipement à résonance de plasmons de surface (SPR)

Le principe de fonctionnement consiste à immobiliser, sur l'interface métallisée d'un prisme, un biorécepteur pour capturer les cibles qui sont injectées sur cette interface par un

flux continu à l'aide d'un système microfluidique. Le phénomène de résonance des plasmons de surface, générés à l'interface métal-diélectrique à l'aide d'un faisceau lumineux est alors détecté et sa variation traduit l'interaction ligand/analyte à l'interface du biocapteur.

Cette méthode est néanmoins limitée dans son usage car le transducteur ne peut être qu'un métal noble comme l'or ce qui limite le choix des procédures d'immobilisation. Une très faible profondeur de pénétration, de quelques nanomètres, est également un élément à prendre en compte selon la taille des éléments mis en jeu pour l'application. Peuvent également être considérés comme plateformes optiques, des transducteurs utilisant des marqueurs fluorescents par exemple, comme les biopuces à ADN. Malgré l'inconvénient de nécessiter une extraction et un marquage d'ADN, ces capteurs ont marqué un tournant dans l'étude du génome humain [42].

1.3.2. Plateforme électrochimique

Un capteur électrochimique est un conducteur électrique que l'on implante au sein du milieu à étudier ; il s'établit alors un transfert de charges entre les espèces chargées présentes et le capteur.

Il existe quatre types de biocapteurs électrochimiques qui sont classés selon leur principe de fonctionnement: les biocapteurs ampérométriques, conductimétriques, potentiométriques et impédimétriques, que nous présentons infra.

1.3.2.1. Biocapteurs ampérométriques

L'ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité du courant qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé [43]. Cette intensité dépend de la concentration des éléments pouvant être oxydés ou réduits au niveau de l'électrode de référence.

La technique d'ampérométrie permet de déterminer une courbe intensité-potentiel qui est obtenue en appliquant entre l'électrode de travail et l'électrode de référence une tension suffisamment importante. Cette courbe possède un palier de diffusion pour lequel l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'espèce réduite ou oxydée à l'électrode indicatrice.

1.3.2.2. Biocapteurs conductimétriques

Le principe de cette technique électrochimique est fondé sur la mesure de la conductance électrique G d'un milieu, entre deux électrodes de même nature et de même surface en leur appliquant un signal alternatif, avec $G = \mu\ S / l$: μ étant la conductivité du matériau (en S) et le rapport S/l représentant une caractéristique géométrique de la cellule (en *cm)* [44].

L'étalonnage ou le contrôle de la cellule est effectué en mesurant sa conductance G_i pour un électrolyte de conductivité μ connu. Lorsqu'on connaît la constante de conductivité de la cellule, la conductivité μ d'un électrolyte quelconque peut être déterminée en mesurant la conductance G de la cellule immergée dans cet électrolyte.

1.3.2.3. Biocapteurs potentiométriques

Ils sont fondés sur la mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes plongées dans une solution, permettant de suivre la variation de la concentration d'une espèce donnée. Le potentiel du capteur est mesuré par rapport à une électrode de référence, à courant nul ou constant : celle-ci peut être une électrode de mesure de pH ou une électrode spécifique.

L'un des biocapteurs potentiométriques très utilisé est l'**ISFET** (Ion Selective Field Effect Transistor) qui dérive directement du MOSFETs (Metal Oxide Semi-conductor Field Effect Transistor) dans lequel la grille métallique a été remplacée par une solution électrolytique et une électrode de référence [45].

L'utilisation de tels capteurs pour doser des ions en solution nécessite le dépôt d'un film mince sensible à un ion spécifique. Dans le cas des capteurs sensibles aux ions H^+, plusieurs types de films peuvent être utilisés notamment SiO_2, Al_2O_3 ou Ta_2O_5.

1.3.2.4. Biocapteurs impédimétriques

a. Mesure d'impédance

La spectroscopie d'impédance électrochimique s'est imposée comme un outil analytique puissant permettant de sonder les propriétés électriques de nombreux systèmes [46, 47, 48].

Les mesures de l'impédance fournissent de l'information détaillée sur les échanges résistance/capacitance au sein d'une surface conductrice ou semi-conductrice.

Pour cela, une tension alternative sinusoïdale V, de pulsation ω avec $\omega = 2\pi f$, f étant la fréquence, est appliquée aux bornes d'un échantillon. Il circule alors un courant d'intensité I. En notation complexe, V et I s'expriment de la manière suivante :

$$V(\omega) = V_0 \exp(j\omega t) \quad (1\text{- }1)$$

$$I(\omega) = I_0 \exp(j(\omega t - \phi) \quad (1\text{- }2)$$

V_0 et I_0 sont respectivement les amplitudes de la tension et de l'intensité du courant et ϕ est le déphasage de l'intensité par rapport à la tension. L'amplitude du signal appliqué devra être faible afin de maintenir une réponse pseudo-linéaire du système.

Des spectres d'impédance sont obtenus par des mesures séquentielles de $V(\omega,t)$ et $I(\omega,t)$ pour chaque fréquence (Figure 1-5-a). Dans un système linéaire (ou pseudo-linéaire), la réponse courante à un potentiel sinusoïdal sera également sinusoïdale avec la même fréquence, mais décalée en phase et différente en amplitude. L'impédance complexe s'exprimera dans ces conditions :

$$Z(\omega) = \frac{V(\omega)}{I(\omega)} = \frac{V_0}{I_0}\exp(j\varphi) = |Z|\exp(j\omega) \quad (1\text{-}3)$$

Cette impédance $Z(\omega)$ peut être représentée graphiquement dans le plan complexe en coordonnées cartésiennes par sa partie réelle $R_e(Z)$ et sa partie imaginaire $I_m(Z)$. Cette représentation correspond au diagramme de Nyquist (Figure 1-5-a), et l'impédance est modélisée à l'aide d'un circuit équivalent (Figure 1-5-b) dont les éléments sont expliqués en suivants.

- ***Résistance de la solution (Rs)***

La résistance de la solution, modélise le phénomène de passage du courant entre l'électrode de travail et la contre électrode. Elle dépend, principalement, de la résistivité de la solution, de l'aire et de la géométrie de l'électrode de travail.

- ***Résistance de transfert de charge (R_{ct})***

La résistance de transfert de charge est la résistance liée au mécanisme de transfert de charge pour des réactions redox à l'électrode.

- ***Elément de phase constante (CPE)***

L'élément de constante de phase *CPE* représente une grandeur empirique, qui prend en considération les irrégularités interfaciales (porosité, géométrie, rugosité, diffusion, etc.). Ce paramètre *CPE* est défini par une capacité C_{dl} et un nombre *n* qui peut prendre les valeurs *-1, 0, 0.5* ou *1* et qui correspondent respectivement à une inductance, impédance pure, terme de Warburg (présenté en suivant) ou capacitance.

- ***Impédance de Warburg (W)***

L'impédance de Warburg est l'impédance résultant de la diffusion d'une espèce à l'électrode. C'est le premier élément électrochimique qui a été présenté dans la description de l'impédance de la diffusion semi-infinie. Cette impédance dépend de la fréquence de la perturbation, du potentiel appliqué et de la concentration des espèces qui diffusent.

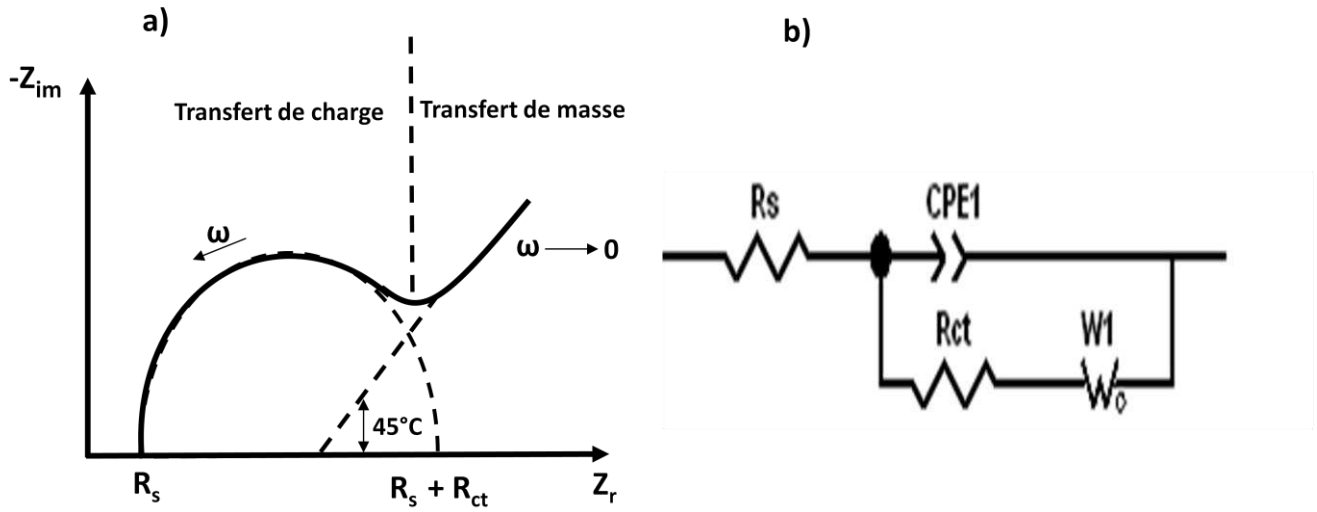


Figure 1-5: Eléments relatifs à l'impédance d'un capteur impédimétrique, a) Exemple de diagramme de NYQUIST, b) Circuit électrique équivalent proposé pour l'interface métal nu /électrolyte.

b. Voltamétrie cyclique

La voltamétrie est une technique d'électroanalyse, qui repose sur la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés tests présents en solution, sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel entre deux électrodes.

Elle permet d'identifier et de mesurer quantitativement un grand nombre de composés (cations, anions) et également d'étudier les réactions chimiques incluant ces composés.

La voltamétrie cyclique (CV : cyclic voltammetry) met en œuvre un balayage linéaire aller-retour du potentiel (Figure 1-6), permettant ainsi la mesure des courbes $i = f(E)$ (Figure 1-6) lors de l'oxydation et de la réduction du composé. Cette technique permet notamment d'étudier la rapidité de la réaction redox en fonction du temps de mesure [49].

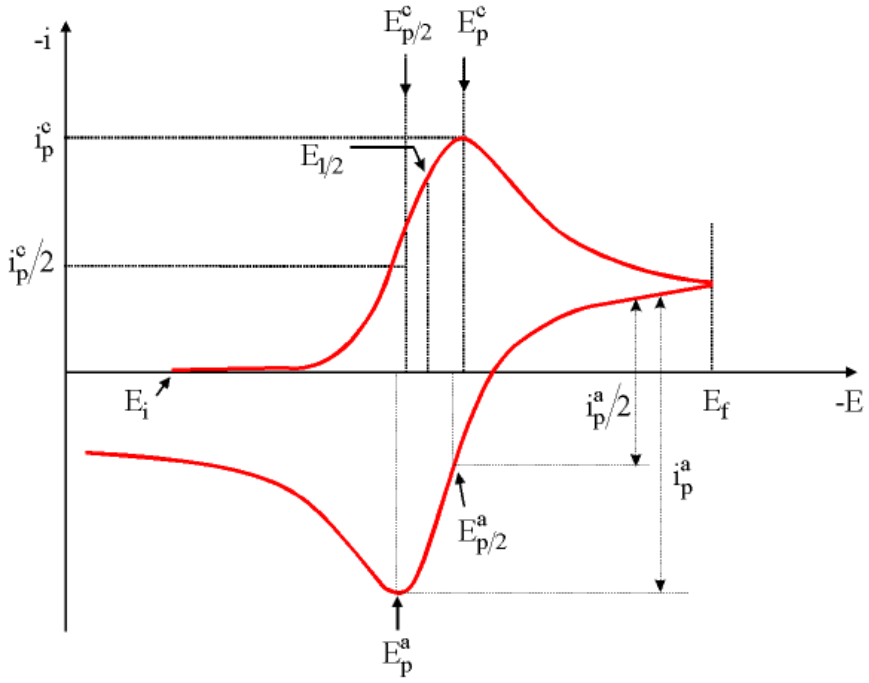


Figure 1-6: Exemple d'une courbe de voltamétrie cyclique d'une espèce redox diffusant en solution.

c. Description des phénomènes de surface : Théorie de la double couche électrique

L'électrochimie s'intéresse au processus qui influe sur le transport des charges. Dans l'électrode, ce transport a lieu par le mouvement des électrons [50] alors que dans l'électrolyte il se fait par le mouvement des ions [51].

- ***Modèle de la double couche de Helmholtz***

Helmholtz est l'un des pionniers de l'étude de la nature capacitive de l'interface entre un conducteur électronique solide et un conducteur ionique liquide [52].

La mise en contact de ces deux conducteurs est suivie par une redistribution de charges et du potentiel à l'interface créée. Pour équilibrer les potentiels électrochimiques, les porteurs de charges des deux phases diffusent à travers l'interface qui se comporte comme un condensateur plan où il existe une chute linéaire de potentiel. La zone de l'interface électrode/électrolyte où existent des espèces chargées, est appelée couche double électrique, elle est caractérisée, à un potentiel donné, par une capacité de la double couche C_{dl}.

Dans la couche qui contient des molécules de solvant spécifiquement adsorbées, le lieu des centres électriques est appelé plan interne de Helmholtz (*PIH*), il est situé à une distance x_1 de l'électrode. Le lieu des centres des ions solvatés, qui ne peuvent s'approcher qu'à une distance x_2, représente le plan externe de Helmoltz (*PEH*).

La surface solide portant un excès de charges au contact du liquide se recouvre d'une couche d'ions spécifiquement adsorbés (densité de charge σ_s) localisés sur le plan interne de Helmholtz.

Les ions solvatés situés sur le plan externe d'Helmholtz possèdent une densité de charge σ_a. Une couche diffuse d'ions en solution de densité σ_d peut être présente entre le volume de l'électrolyte et le plan externe de Helmholtz [53].

L'électroneutralité conduit à :

$$\sigma_s + \sigma_a + \sigma_d = 0 \qquad (1\text{-}4)$$

En raison de l'agitation thermique dans la solution, les ions non spécifiquement adsorbés sont situés dans une région appelée couche diffuse qui s'étend du *PEH* jusqu'à la solution. C'est pour cela que la répartition des ions dans la couche diffuse dépend essentiellement de l'agitation thermique et de la concentration de l'électrolyte.

Dans le cas d'un électrolyte suffisamment concentré, l'influence de la couche diffuse est négligeable et peut être considérée comme nulle.

L'interaction des ions solvatés avec l'électrode met en jeu uniquement des forces électrostatiques à grande distance.

La chute du potentiel *V* entre l'interface et la solution est linéaire comme représenté sur la Figure 1-7.

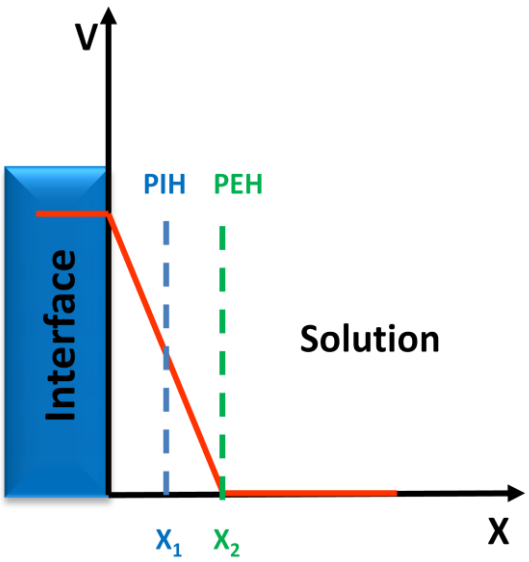


Figure 1-7: Variation du potentiel à l'interface conformément au modèle de Helmholtz.

Ce modèle de la double couche est relativement simple mais ne permet pas d'expliquer tous les résultats expérimentaux.

- ***Modèle de Gouy et Chapman***

Gouy et Chapman ont amélioré le modèle de Helmholtz en proposant un modèle où les ions qui forment la charge électrique à l'interface électrode/électrolyte ne sont plus localisés en totalité dans le plan de Helmholtz, mais possèdent une distribution décroissante avec la distance par rapport à l'électrode.

Le potentiel va présenter également une décroissance en fonction de la distance de l'électrode en tendant asymptotiquement vers zéro au sein de la solution (Figure 1-8).

La distribution des ions résulte d'un équilibre entre les forces de natures électrique et thermique et la double couche devient une couche diffuse. La chute de tension à travers la zone de charge d'espace est donnée par :

$$V(x) = V_0 . \exp\left[\frac{-x}{L_D}\right] \qquad (1\text{- }5)$$

V_0 est le potentiel sur la surface de l'électrode ($x = 0$) et L_D est la longueur qui représente l'épaisseur de la couche diffuse.

$$L_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 . \varepsilon_r . V_t}{2 . n_0 . z^2 . q}} \qquad (1\text{- }6)$$

V_t est la tension thermique tel que : $V_t = \dfrac{k.T}{q}$,

n_0 est le nombre d'ions par unité de volume, z la valence des ions et q la charge de l'électron.

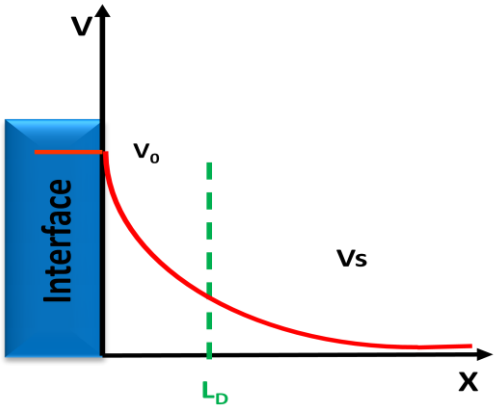


Figure 1-8: Variation du potentiel avec la distance dans la couche diffuse selon le modèle de Guy et Chapman.

Bien que le modèle de Gouy et Chapman constitue une amélioration de celui de Helmholtz, la valeur théorique de la capacité varie avec la tension appliquée beaucoup plus que la valeur expérimentale et elle est trop dépendante de la concentration ionique.

- ***Modèle de Stern***

Stern [54] a rectifié cette divergence en combinant le modèle de Helmholtz et celui de Gouy et Chapman. Dans ce modèle, les porteurs de charge en solution ont la même distribution que dans le cas de la couche diffuse mais commencent à partir du plan d'Helmholtz et non pas à la surface de l'électrode. En effet, Stern n'a pas fait l'approximation des charges ponctuelles du modèle de couche diffuse et il a considéré que les ions ne peuvent pas s'approcher de l'électrode au-delà d'une certaine distance critique.

On obtient donc deux différences de potentiels qui sont reliées par la relation suivante :

$$V_o - V_s = (V_0 - V_H) + (V_H - V_s) \qquad (1\text{- }7)$$

V_0 est le potentiel de surface de l'interface, V_S le potentiel au sein de la solution et V_H est le potentiel au plan externe de Helmholtz.

La Figure 1-9 montre que la distribution du potentiel est linéaire de la surface solide jusqu'au plan externe de Helmholtz puis elle décroît vers zéro.

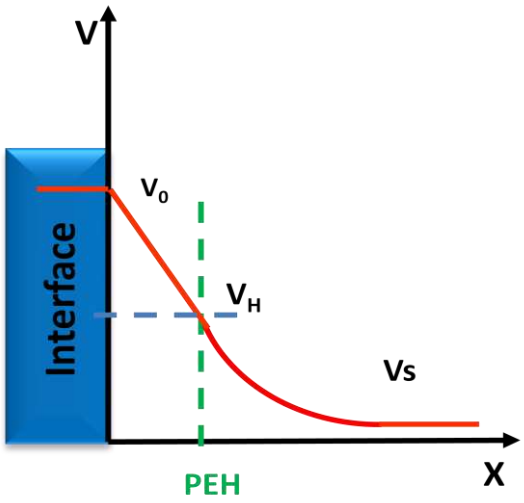


Figure 1-9 : Distribution de potentiel selon Stern.

La capacité interfaciale totale est la combinaison de deux capacités en série :

$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{C_H} + \frac{1}{C_G} \qquad (1\text{- }8)$$

$$C_H = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{d_{PEH}} \qquad (1\text{- }9)$$

Avec :

C_t : la capacité interfaciale totale de Stern

C_H : la capacité de Helmholtz

C_G : la capacité de Gouy et Chapman

ε_0 : la permittivité du vide et ε_r : la permittivité de l'électrolyte.

En conclusion, la double couche électrique dans l'électrolyte est définie comme étant formée de deux parties :

- Une zone interne compacte dans laquelle les dipôles des molécules du solvant (les ions spécifiques et les protons) couvrent la surface du solide. Cette zone appelée couche de Helmholtz, est délimitée du côté solide par une surface plane notée *PIH* (plan interne de Helmholtz) et s'étend dans le liquide jusqu'au plan noté *PEH* (plan externe de Helmholtz). Les centres des ions solvatés s'arrangent à la surface de ce plan *PEH (*Figure 1-10*).*
- Une zone externe appelée couche de Gouy ou couche diffuse qui s'étend de *PEH* à tout le volume de l'électrolyte. Dans cette couche, les ions sont dispersés dans l'électrolyte et leur concentration décroît de *PEH* vers l'intérieur du volume [55]**.**

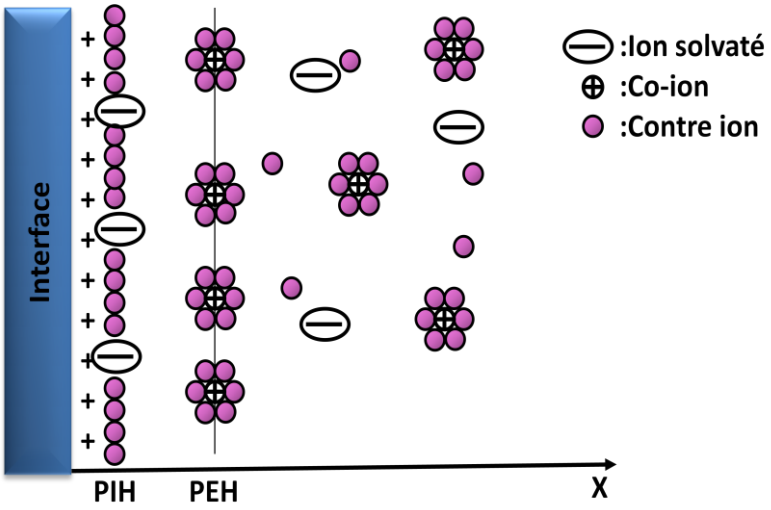


Figure 1-10 : Répartition des charges à l'interface solide/liquide selon le modèle de Gouy-Chapman-Stern.

1.3.3. Plateforme piézoélectrique

D'une manière générale, les biocapteurs à ondes acoustiques, sont basés sur un effet piézoélectrique inverse qui permet la génération d'une onde dont le type dépend de la géométrie et de la nature des matériaux :

- ondes de volume (Bulk Acoustic Wave BAW),
- ondes de surface (Surfacic Acoustic Wave),
- onde guidées.

A l'origine, ces technologies ont été développées en micro-électronique pour la réalisation de pilotes de fréquence ultra-stables et de lignes à retard.

Dans le cas d'applications à la détection en milieu liquide, le paramètre important sera le choix d'une onde présentant une polarisation (un déplacement) parallèle à la surface afin de limiter les pertes d'énergie dans le volume de liquide adjacent. Un confinement de l'énergie en surface assurera une bonne sensibilité aux variations de paramètres au niveau du biorécepteur. Nous allons décrire rapidement les structures utilisant ces trois types d'ondes afin de dégager les avantages inhérents au dispositif retenu pour une partie de nos travaux.

1.3.3.1. Capteur à onde de volume (Bulk Acoustic Wave BAW)

Le capteur à ondes acoustiques le plus répandu est la microbalance à quartz (*QCM*) qui est un cristal en quartz résonnant, dont la surface est équipée de deux électrodes, dont l'une (parfois les deux) est fonctionnalisée à l'aide d'une couche bioréceptrice dédiée à la reconnaissance spécifique de l'espèce à détecter (Figure 1-11). Le principe de ce type de dispositif est de faire vibrer le matériau piézoélectrique sur l'un de ses modes résonants, en appliquant un potentiel alternatif entre les deux électrodes. Toute accroche spécifique au niveau de la couche bioréceptrice entraîne une modification de la fréquence de résonance [56]. L'équation établie par Sauerbrey en 1959 [57] permet de relier l'effet de masse Δm_s sur la surface de l'électrode à la variation de la fréquence, notée Δf :

$$\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{-2\Delta m_s}{\rho_q \lambda_0} \qquad (1\text{- }10)$$

Avec:

f_0 : la fréquence fondamentale du cristal (f_0 de l'ordre de quelques MHz),

Δf : l'écart de fréquence à la résonance (en Hz),

Δm_s : la variation de masse surfacique (en kg.m^{-2}),

μ_q: module de rigidité élastique transverse du Quartz,

ρ_q : la masse volumique du quartz (en kg.m^{-3}),

λ_0 : la longueur d'onde avec $\lambda_0 = \frac{v_p}{f_0}$, v_p étant la vitesse de phase de l'onde de volume transverse ($v_p = \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}}$).

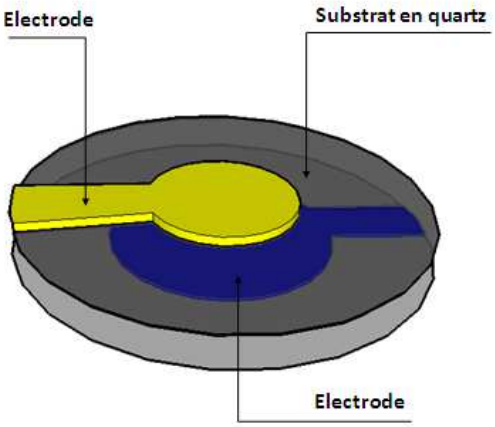


Figure 1-11 : Structure de principe d'un capteur à onde de volume.

Plusieurs travaux publiés ont utilisé des *QCM* notamment pour la réalisation de capteurs à base d'ADN [58] et des immunocapteurs [59]. Cette méthode reste limitée dans certaines applications qui nécessitent un seuil de détection faible. De plus, la structure tridimensionnelle du composant le rend peu apte à une fabrication collective dans un objectif de miniaturisation.

1.3.3.2. Capteur à onde de surface

Les techniques de réalisation planaire de la microélectronique ont permis la réalisation de transducteurs interdigités (*IDTs*) sur un substrat piézoélectrique. Des ondes acoustiques de surface (*SAW*) peuvent ainsi être générées (Figure 1-12).

Comme pour la microbalance à quartz, le principe de ce type de capteur repose sur la mesure de la variation de la fréquence de résonance de l'onde de surface, susceptible de se produire lors de modifications des paramètres surfaciques en particulier à l'immobilisation d'espèces cibles sur un film biorécepteur déposé au contact du chemin de propagation de l'onde entre les *IDTs* [60].

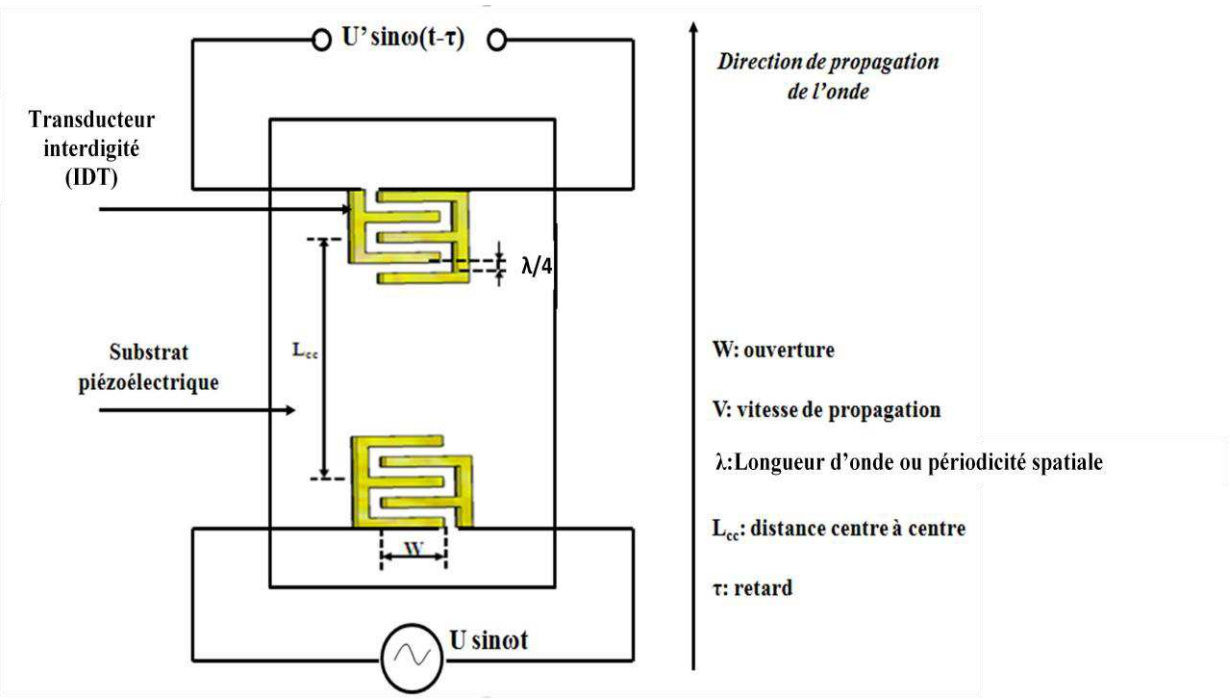


Figure 1-12 : Caractéristiques d'un capteur à onde de surface.

Dotés d'une excellente sensibilité inhérente au confinement de l'énergie de l'onde sur quelques dixièmes de longueur d'onde de la surface, de tels dispositifs ont montré leur intérêt principalement dans la détection de gaz [61,62], avec l'utilisation classique de l'onde de surface de type Rayleigh dont la polarisation elliptique dans le plan sagittal limite l'utilisation en milieu liquide.

1.3.3.3. Capteur à onde de Love

Les ondes de Love sont des ondes guidées dans un film mince, appelé couche guidante, déposé sur un substrat piézoélectrique, typiquement de quartz, considéré comme semi-infini vis-à-vis de l'onde (Figure 1-13). Les électrodes interdigitées placées sur le substrat de quartz parallèlement à l'axe cristallographique *X*, permettent de générer une onde purement transverse horizontale se propageant perpendiculairement à *X*, et permettant un fonctionnement en milieu liquide. L'onde est alors couplée dans la couche guidante rigidement liée au substrat sous réserve que tous les paramètres des matériaux (nature, orientation et géométrie du substrat et de la couche guidante) soient bien adaptés. Ainsi, l'onde de Love est une onde de polarisation transverse horizontale guidée en surface, d'où une abréviation communément rencontrée dans la littérature : « guided SH-SAW ». On retrouve alors le fonctionnement classique des capteurs à ondes acoustiques. L'intérêt réside dans le fait que l'épaisseur de la couche guidante est contrôlable : l'énergie acoustique de l'onde peut

ainsi être confinée sur une faible épaisseur, de quelques micromètres, alors qu’elle est répartie dans tout le volume des QCM, soit plusieurs dizaines voire centaines de micromètres : il en résulte une sensibilité accrue avec l’onde de Love [63], comme avec les ondes de surface de manière générale.

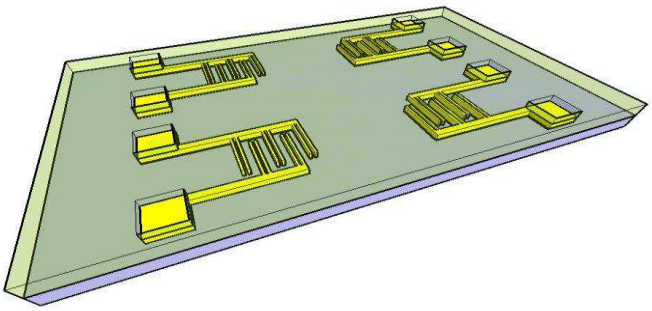


Figure 1-13 : Schémas d’un capteur à onde de Love

De nouveau, le principe de fonctionnement d’un tel capteur repose sur la détection des modifications des propriétés du liquide au contact de la surface sensible, ou est sensible à la présence d’analytes immobilisés en surface, par effet de masse ou visco-élastique. En effet, l’interaction d’un analyte chimique ou d’un milieu liquide complexe avec la surface du dispositif peut perturber la propagation de l’onde acoustique. Cette perturbation est mesurée par les modifications de fréquence, d’amplitude ou de phase de l’onde et permet alors d’obtenir des capteurs ultrasensibles, fonctionnant en temps réel.

1.4. Exemples de Capteurs de métaux lourds

Nous avons rassemblé dans le tableau suivant une liste non exhaustive de travaux effectués sur la détection des métaux lourds avec un biocapteur à récepteur cellulaire.

Tableau 1-3 : Exemples et performances de capteurs cellulaires dédiés pour la détection des métaux lourds

Ions détectés	Type de Biorécepteur	Type de transducteurs	Limites de détection	zone de détection	Année et références
Cu^{2+}	*Saccharomyces cerevisiae*	Ampérométrique	0, 042 M	5,62 – 39,3 10^{-3} M	2007, **[64]**
Fe^{2+} -	Acidithiobacillus *ferrooxidans*(I)	Ampérométrique	0, 9 µM	≥ 2,5 mM	2006,**[65]**
$Cr_2O_7^{2-}$	*Acidithiobacillus ferrooxidans(II)*	Ampérométrique	0, 4 µM	≥0,4mM	2006, **[66]**
Cd^{2+}, Zn^{2+}	*Calluna vulgaris*	Conductimétrique	Cd^{2+} :1, 124.10^{-6} M Zn^{2+} :0, 653.10^{-6} M	-	2005, **[67]**
Cd^{2+}	*Calluna vulgaris*	Conductimétrique	1, 124.10^{-6} M	-	2008, **[68]**
Pb^{2+}	*Phormididum spiruline*	Voltamétrique	2, 072.10^{-6} M	2, 07.10^{-6} – 8, 28.10-^{4} M	2010, **[69]**
Pb^{2+}	*Pseudomonas aeruginosa*	Voltamétrique	6.10^{-7} M	-	2011, **[70]**
Cu^{2+}	*Circinellaspiruline*	Voltamétrique	54 nM	0, 5 – 10µM	2008, **[71]**
Zn^{2+}, Hg^{2+}	*Acidithiobacillus caldus*	Conductémitrique	50.10^{-9} M	-	2010, [72]
Hg^{2+}	*Escherichia coli MC1061*	Fibre optique	0, 52 M	0, 40 - 4, 01.10^{-3} M	2007, [73]
Hg^{2+}, Cu^{2+}	*Cellule MCF-7*	Chimiofluorescence	4, 510^{-8} M	-	2007, [74]
Hg^{2+}, Cd^{2+}	*Escherichia coli*	Onde de Love	Hg^{2+} : 10^{-12} M	10^{-1} - 10^{-12} M	2010, [75]

Ces résultats montrent notamment que, si plusieurs associations de type de transducteurs et de biorécepteurs cellulaires permettent d'atteindre des seuils de détection micro- voire nano-moléculaires, l'association des ondes de Love et des bactéries *E.coli* nous permet de proposer des seuils plus bas, de niveau picomolaire.

Vers un Laboratoire sur puce

Comme nous l'avons vu, l'évaluation de la qualité de l'environnement et des milieux aquatiques requiert de plus en plus des observations continues ou semi-continues et la détection précoce d'éléments toxiques.

Notre objectif est de fabriquer un bio-microsystème microfluidique pour la détection de la toxicité des métaux lourds et d'aller, pourquoi pas, vers le laboratoire sur puce, qui va permettre de diminuer les volumes d'échantillons utilisés et donc d'obtenir un gain financier considérable.

Cette démarche de miniaturisation entraîne également une forte réduction des temps d'analyse, avec un bénéfice majeur dans le cas par exemple de l'étude du génome humain et surtout dans le cas d'urgence potentielle (diabète, hémophilie, hypertension…).

Plusieurs biocapteurs ont ainsi été commercialisés, comme ceux qui sont présentés sur la Figure 1-14. Pourtant, un biocapteur adapté pour mesurer la toxicité dans le sang ou dans les milieux aquatiques n'est pas encore présent sur le marché, laissant ouvert un large champ d'investigation pour la proposition de tels systèmes.

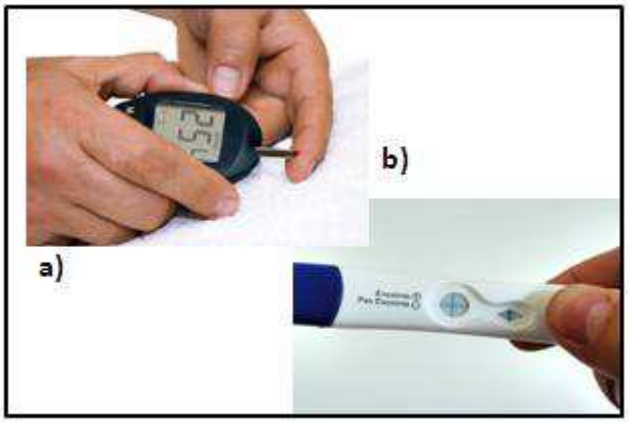


Figure 1-14 : Biocapteurs commercialisés :a) capteur de glucose [76], b) test de grossesse [77]

2. Méthodologies et théories

Le domaine des biocapteurs représente une innovation technologique majeure, avec une évolution rapide vers des systèmes de plus en plus miniaturisés. Cela permet de réduire la taille des dispositifs, diminuer le volume nécessaire des réactifs et d'accélérer les processus d'analyse.

Cette étude porte sur l'étude de deux types de micro-biocapteurs. Le premier est une plateforme à onde de Love, son principe repose sur la relation entre la masse des membranes et leur fréquence de résonance. Lors d'une interaction biologique ou chimique, l'ajout de masse se traduit ainsi par une diminution de la fréquence de résonance. A cet effet de masse pourront se superposer, d'autres effets, notamment mécaniques, comme ceux dus à des variations des propriétés viscoélastiques des membranes. Le second type de biocapteur repose sur un transducteur électrochimique planaire à trois électrodes sérigraphiées, développé dans le cadre de ces travaux.

Le développement rapide des technologies MEMS et leur utilisation pour des applications biologiques, nécessitent aussi de mieux comprendre l'écoulement de fluides à l'échelle du micromètre caractérisée par des écoulements laminaires du fait des dimensions mises en jeu, ce qui a donné naissance à une nouvelle discipline : la microfluidique.

L'objectif de ce chapitre est ainsi de décrire les deux types de microcapteurs qui ont été développés en vue de la mise au point d'un mode d'analyse en flux continu, le capteur électrochimique ayant été conçu et fabriqué de manière à être compatible avec le capteur à onde de Love. Une troisième partie sera dédiée à la présentation de la microscopie à force atomique, utilisée pour caractériser les surfaces et leurs modifications successives en complément des mesures réalisées par onde de Love. Enfin, une quatrième définit quelques éléments théoriques sur les écoulements rencontrés dans les structures.

2.1. Plateforme à onde de Love

2.1.1. Le capteur à onde de Love

Le capteur à onde de Love utilisé dans nos travaux a été conçu au sein du laboratoire IMS et fabriqué au sein de l'équipe Team du LAAS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes UMR CNRS 8001) de Toulouse, selon un procédé mis au point en collaboration [78]. Les dispositifs utilisés sont constitués de deux lignes à retard, une ligne peut servir de référence, l'autre pour la mesure. Quoique développés préalablement à ces travaux, nous en reprenons ici une description des principaux éléments.

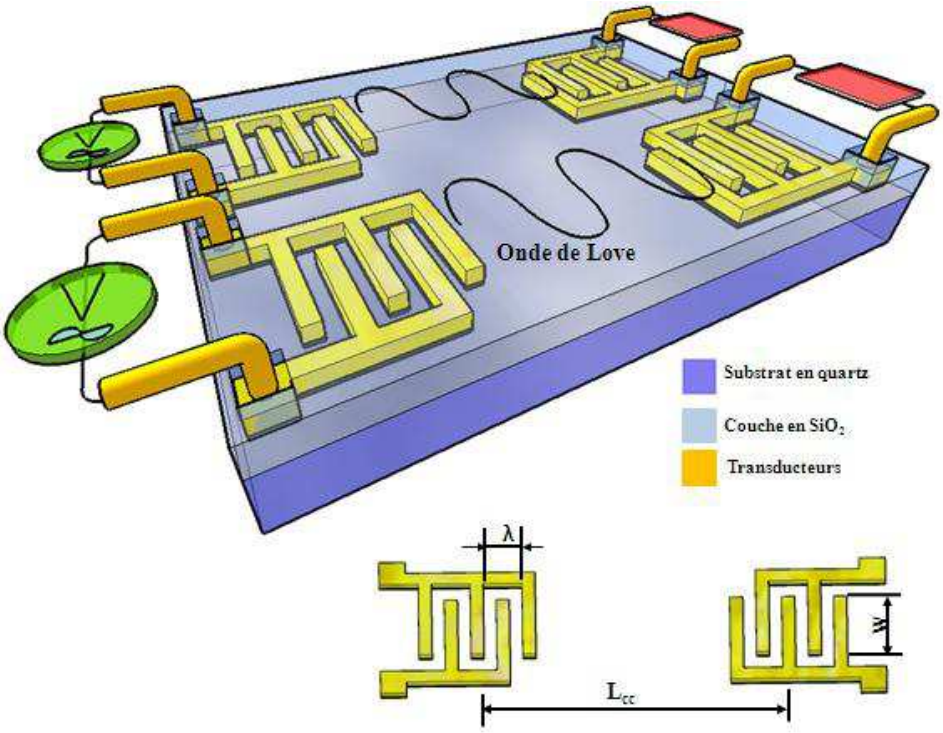


Figure 2-1: Schéma de principe d'un dispositif à onde de Love.

2.1.1.1. Ligne à retard

La structure présentée dans la Figure 2-1 est appelée ligne à retard en raison du temps de propagation du signal acoustique par rapport au signal électromagnétique qui transiterait directement d'un transducteur à l'autre. Chaque ligne possède deux transducteurs interdigités (IDTs, InterDigital Transducers) pour l'émission et la réception des ondes.

Le Tableau 2-1 reprend les principales caractéristiques du dispositif de test utilisé. La longueur d'onde λ correspond à la périodicité spatiale des IDTs, constitués de *4* doigt de $\lambda/8$

espacés de $\lambda/8$ pour une période. L'ouverture W correspond à la longueur de recouvrement des électrodes reliées aux potentiels positif et négatif. N est le nombre de paires de structures interdigitées constituant chaque IDT (émetteur ou récepteur). Enfin, L_{CC} est la distance centre à centre entre ces IDTs.

Tableau 2-1: Caractéristiques techniques du dispositif à onde de Love.

Substrat	***IDTs***				***Couche guidante***
Quartz coupe AT angles d'Euler : (0, 121,5°, 90°)	*λ (μm)*	*W (mm)*	*N*	*L_{CC} (mm)*	*SiO_2 d'épaisseur 4 μm*
	40	*1,56*	*44*	*8,36*	

Le logiciel LoveCAD développé par l'équipe de l'IMS [79] permet de calculer la vitesse de phase de l'onde de Love à partir des propriétés physiques du capteur et de son environnement. Pour le dispositif utilisé, nous obtenons une vitesse de phase $V_P = 4{,}664.10^3\ m.s^{-1}$, ce qui correspond à une fréquence $f = 116{,}8\ MHz$, en considérant $f = \frac{V_P}{\lambda}$ (en première approximation, en négligeant la différence entre vitesses de phase et de groupe).

2.1.1.2. Couche guidante

La couche guidante permet de confiner l'énergie acoustique dans une couche très mince ce qui augmente la sensibilité à l'effet de masse du capteur à ondes de Love. Pour que l'onde de Love puisse être générée, il faut que la vitesse de l'onde de volume transverse horizontale dans le substrat (V_s) soit supérieure à celle dans la couche guidante (V_h). La vitesse de phase de l'onde de Love V_p sera comprise entre ces deux vitesses:

$$V_h \leq V_p \leq V_s \qquad (2\text{-}1)$$

Dans le cadre de ces travaux, nous utiliserons des capteurs avec une couche guidante de SiO_2 d'environ 4 μm d'épaisseur, valeur proche de l'optimum théorique (5-6 μm) pour une sensibilité maximale [80] tout en restant compatible avec le procédé de dépôt utilisé. Le choix du SiO_2 est justifié par les nombreux avantages dont il est réputé : bonne rigidité, faibles pertes acoustiques, bonne résistance chimique et mécanique, compatibilité avec les milieux biologiques, fonctionnalisable et réutilisable. Nous noterons néanmoins le constat d'un certain vieillissement des capteurs au fil d'utilisations successives mettant en jeu des protocoles

chimiques et biologiques [81]. Ceci expliquera des essais effectués avec une couche terminale de TiO_2 mésoporeuse reconnue plus stable en milieu biologique [82].

2.1.1.3. Sensibilité

La sensibilité à l'effet de masse est calculée comme la variation relative de vitesse ramenée à la variation de masse surfacique de la couche sensible, modélisée classiquement par une variation de sa masse volumique ρ_c ou de son épaisseur h:

$$S = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{1}{\Delta \rho_c h} \qquad (2\text{- }2)$$

Avec :

V_0 : la vitesse de phase du dispositif avec couche sensible de référence (avant détection)

V_1 : la vitesse de phase du dispositif avec couche sensible modifiée (après détection)

$\Delta V = V_1 - V_0$: la variation de vitesse

L'estimation théorique de la sensibilité à l'effet de masse est représentative de la sensibilité aux effets mécaniques d'une structure. De manière générale, un dispositif pourra répondre à un effet de masse, également à des variations d'autres paramètres comme des grandeurs viscoélastiques notamment.

2.1.2. Électronique de conditionnement

La ligne à retard est placée dans la boucle de rétroaction d'un oscillateur afin de mesurer sa fréquence de résonnance en temps réel. Nous décrivons dans ce paragraphe les principaux éléments de la chaîne d'oscillation (Figure 2-2).

Le gain de l'amplificateur est calculé de manière à compenser les pertes d'insertion de la ligne à retard. Dans le cas de nos dispositifs ces pertes s'élèvent à environ 35 dB en air typiquement et à environ 40 dB en milieu liquide.

L'atténuateur variable est inséré dans la boucle de rétroaction afin d'obtenir un gain en boucle ouverte légèrement supérieur à 0 dB.

Le filtre passe-bande permet notamment d'atténuer les fréquences parasites, comme les harmoniques de la fréquence d'oscillation, et d'obtenir une meilleure stabilité de l'oscillateur.

Un coupleur permet de prélever une partie du signal sans perturber la boucle d'oscillation, pour mesurer la fréquence d'oscillation à l'aide d'un fréquencemètre (Agilent Technologies, HP53132A).

Afin d'éviter toute variation de phase de l'électronique et augmenter la stabilité de l'oscillateur ainsi réalisé, il est important de limiter tout bruit externe qui pourrait perturber la réponse de ce système. Le choix d'amplificateurs de type LNA (Low Noise Amplifier : Amplificateur faible bruit), permet de limiter le bruit apporté par l'électronique.

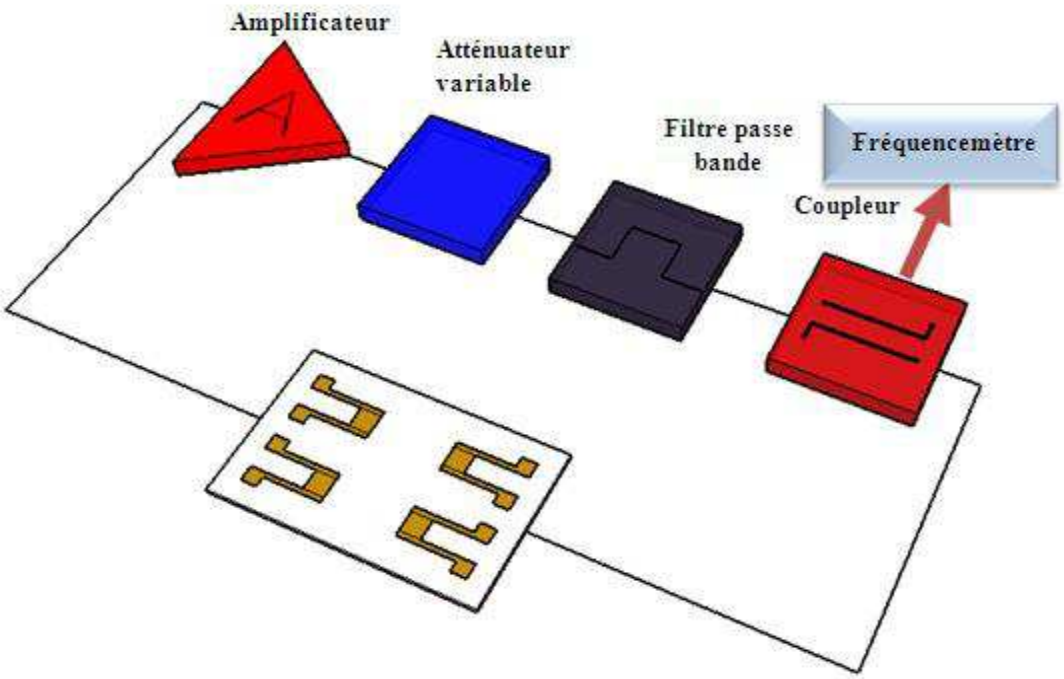


Figure 2-2 : Synoptique de la boucle d'oscillation.

2.1.3. Cellule de mesure

2.1.3.1. Principe général et cellule hydrostatique

Le dispositif dédié pour les mesures hydrostatiques en milieu liquide est inspiré d'un montage proposé par F. Josse et R. Cernosek, adapté dans le cadre des travaux de thèse menés à l'IMS [78, 81]. La cellule est formée par trois parties, représentées en Figure 2-3, assurant les connexions électriques et le maintien d'une puce en PDMS, décrite plus loin, pour la localisation du fluide sur le capteur.

Les lignes à retard sont placées directement sur la partie inférieure de la cellule. Le bloc de connexion, en laiton, est un élément intermédiaire qui comporte des pointes de touche à ressort venant au contact avec les plots de connexion des capteurs. Après avoir positionné la cellule en PDMS (polydiméthylsiloxane) sur le capteur, un capot assure une pression contrôlée de la puce.

Le banc est contrôlé par ordinateur à partir d'un programme développé dans l'environnement Labwindows CVI. Celui-ci permet d'enregistrer et de visualiser en temps réel l'évolution en fonction du temps de la fréquence d'oscillation du capteur.

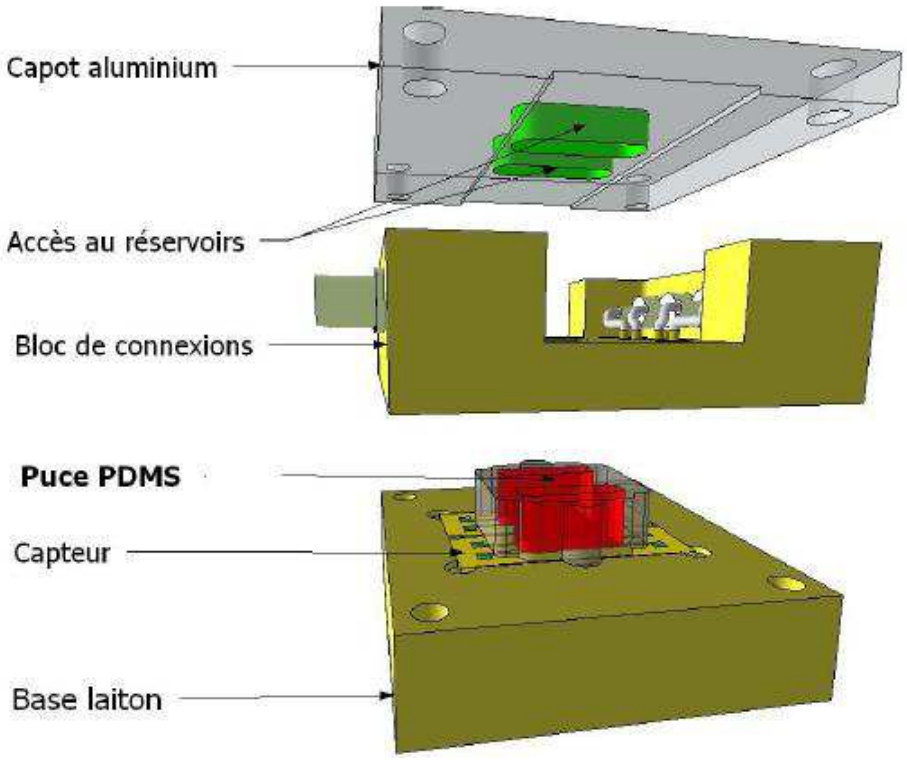


Figure 2-3 : Cellule de mesure du dispositif à ondes de Love pour des mesures statiques (vue en éclaté) ***[81]***

2.1.3.2. Cellule de test hydrodynamique

Ce nouveau modèle de cellule de mesure a également été développé au sein de l'équipe IMS [81] en vue d'une manipulation plus fiable, et avec la possibilité d'adjoindre un module de régulation de température. Cette nouvelle cellule comporte également 3 pièces principales (Figure 2-4) :

La base de la cellule (motif 1), en aluminium, comporte un système de contrôle de la température : sonde de température PT100 intégrée dans la puce PDMS et bloc de positionnement en téflon pour une céramique chauffante sérigraphiée avec une résistance de 10 Ω, sur laquelle sont déposés le capteur et la cellule d'analyse en PDMS.

Le bloc de calibration, en aluminium (motif 2), permet le calibrage de la hauteur de la cellule de test et le taux de compression des puces PDMS.

Le bloc de connexion (motif 3), en laiton, est équipé de pointes de touches à ressorts et de connecteurs SMA. Un couvercle en plexiglas, fixé sous le bloc de connexion, assure le

maintien de la puce de PDMS sur le capteur avec une pression homogène et contrôlée et permet de visualiser l'écoulement.

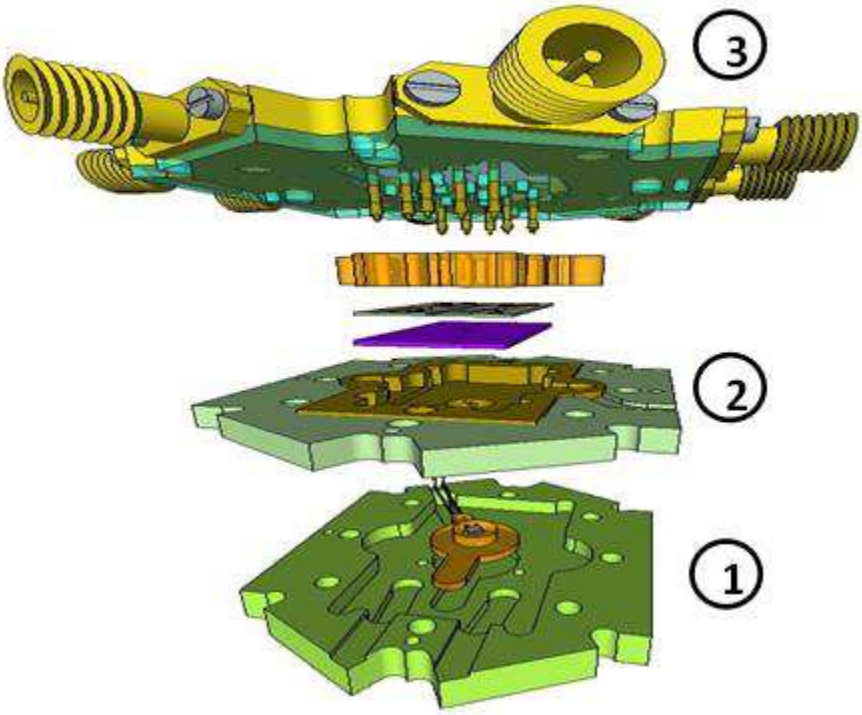


Figure 2-4 : Cellule de mesure du dispositif à ondes de Love pour des mesures hydrodynamiques (vue en éclaté) ***[81]***

2.1.4. Puce PDMS

Le polydiméthylsiloxane (PDMS) est un polymère organique silicone de la famille des organosiloxanes qui est composé de liaisons Si-C et Si-O. L'enchaînement des liaisons Si-O et la symétrie des liaisons Si-C forment un arrangement apolaire, ce qui rend la surface du PDMS hydrophobe.

Le PDMS est viscoélastique : on peut le trouver sous forme de liquide visqueux et quand le nombre n de motifs $[SiO(CH_3)_2]$ est élevé, il est sous la forme d'un solide élastique. Ce sont les liaisons siloxanes qui lui confèrent son élasticité. Par ailleurs il se solidifie quand il est exposé à la chaleur, dans un four par exemple. Du fait de ses propriétés, un grand intérêt a été porté au PDMS pour l'innovation dans le domaine de la microfluidique **[83]**. En effet, les microcanaux en PDMS sont faciles à fabriquer rapidement, souvent en moins de 4 heures. Le PDMS offre de surcroît, un bon contact avec le substrat et un démoulage facile lorsqu'il est

sous forme solide. Les cellules sont réalisées par moulage à l'aide d'un à deux éléments : l'un usiné en aluminium, pour l'architecture extérieure de la puce, un deuxième réalisé sur un wafer en silicium pour définir un réseau microfluidique, avec une précision de quelques micromètres, par photolithographie avec une résine SU-8. Le procédé de fabrication est détaillé dans le paragraphe **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**.

Par ailleurs, le PDMS présente en outre de bonnes qualités optiques puisque, translucide, il permet l'observation optique des écoulements internes **[84,85]**.

Nous décrirons dans la suite la procédure de fabrication de cellules en PDMS avec deux chambres de tests pour la détection en statique et des cellules avec réseau microfluidique pour des tests en flux continu.

2.1.4.1. Puce PDMS pour des mesures hydrostatiques

L'utilisation d'une puce en PDMS a permis d'isoler le liquide sur le chemin acoustique, en effet cette cellule possède un réservoir au-dessus de chaque ligne à retard, ainsi que des cavités d'air protégeant la surface de silice au-dessus des IDTs (Figure 2-5-a). La séparation des lignes permet de réaliser deux détections distinctes par capteur, permettant par exemple des mesures en différentiel, et de minimiser les quantités de solutions utilisées.

La pression appliquée pour le maintien de la puce en PDMS sur le capteur doit à la fois être suffisante pour assurer l'étanchéité et pas trop forte pour ne pas empêcher l'onde de se propager par une surface de contact PDMS/surface sensible trop grande.

Cette puce est réalisée par moulage, à l'aide d'un moule en aluminium permettant de démouler simultanément quatre puces (Figure 2-5-b). Après avoir soigneusement mélangé et dégazé les deux composants du kit PDMS (base et réticulant du kit Dow Corning Sylgard 184 silicone elastomer, avec un ratio massique base/réticulant = 9/1), le PDMS est coulé dans le moule puis placé sur une plaque chauffante et porté à 95 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, il est démonté et les puces sont démoulées.

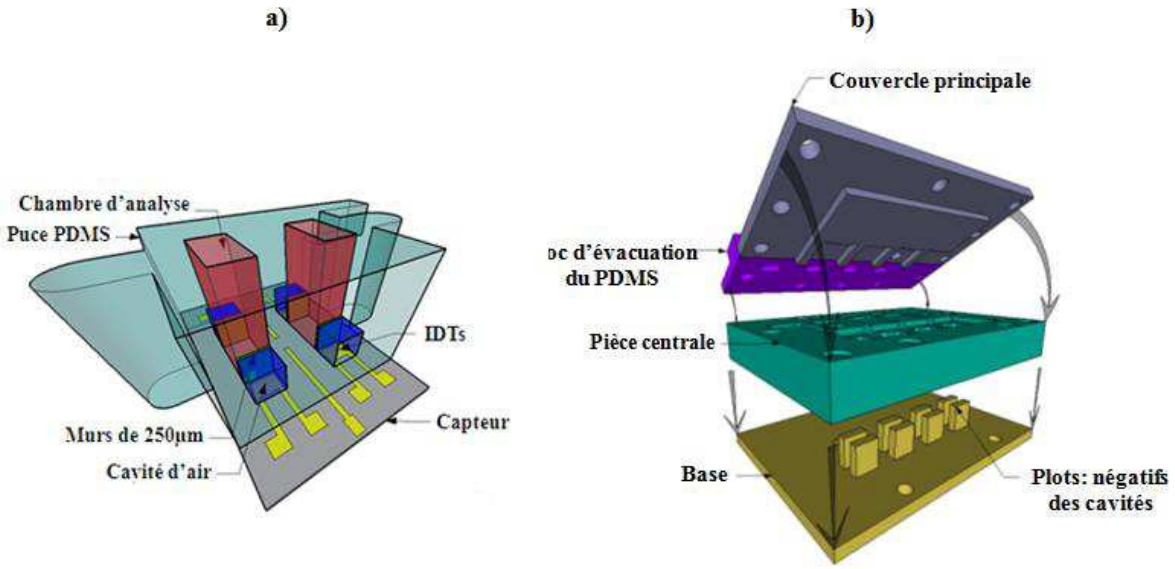


Figure 2-5 : a) Puce en PDMS pour le protocole hydrostatique sur un capteur à onde de Love, b) Moule utilisé pour la réalisation ***[81]***

2.1.4.2. Puce PDMS pour des mesures hydrodynamiques

Comme la précédente, la puce microfluidique en PDMS (Figure 2-6) comporte également des cavités d'air au-dessus des IDTs, ainsi que deux chambres d'analyse sur les chemins acoustiques et ici des réservoirs en amont. Ces motifs assurent l'homogénéité thermique et chimique de la solution avant son passage sur la zone sensible, et évitent la présence de zones mortes.

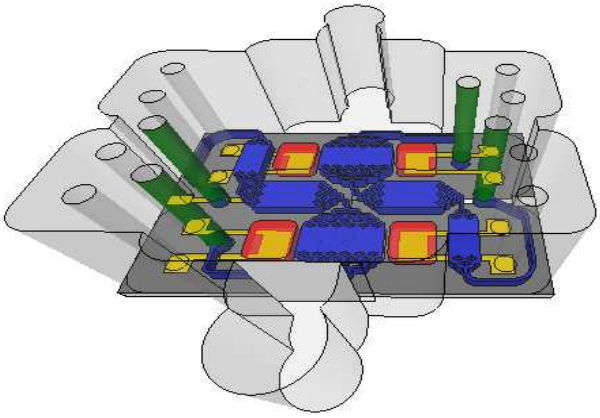


Figure 2-6 : Puce en PDMS avec réseaux microfluidiques.

2.2. Microscopie à Force Atomique (AFM[1])

2.2.1. Introduction

Le microscope à force atomique appartient à la famille de microscopes à champ proche SPM[2] (ou à sonde locale) dont le principe repose sur les interactions entre la sonde (une nanopointe) et la surface d'un échantillon. La taille « nanométrique » de la sonde confère le caractère local à ces microscopies. Ces techniques ont pris de plus en plus d'importance dans la caractérisation de matériaux grâce à leur capacité d'imager depuis l'échelle micrométrique jusqu'à l'échelle moléculaire ou atomique.

Les champs d'applications de ces techniques sont très vastes puisque n'importe quelle grandeur physique mesurable peut donner lieu à un microscope à sonde locale. Par exemple, le microscope à effet Tunnel (STM[3]) détecte un courant tunnel du système métal-isolant-métal constitué par la pointe, ce qui permet d'accéder à l'information de type taille, forme et périodicité, rugosité de surface, structure électronique et résolution atomique. Ce type de microscope ne permet d'imager, en général, que des surfaces métalliques ou semi-conductrices, contrairement à l'AFM qui peut s'appliquer à n'importe quel type de surface quelles que soient ses propriétés électriques, comme les polymères et les matériaux biologiques [**86,87,88,89]**.

Binnig *et al.* [**90**] ont introduit en 1986 l'AFM, instrument qui était une sorte d'application du STM qu'ils inventèrent en 1981. L'élément de base de ce microscope est une pointe nanométrique solidaire d'un microlevier. Comme son nom l'indique, le principe de ce nouveau microscope consiste à mesurer les forces d'interactions atomiques entre les atomes du bout de la pointe et ceux de la surface de l'échantillon à étudier, ces forces sont appelées forces de Van der Waals et dépendent fortement de la distance pointe-surface. La mesure de ces forces permet de remonter à la topographie de la surface balayée par la pointe AFM. En effet, une image est obtenue en mesurant et en enregistrant l'évolution de ces forces quand la pointe balaye l'échantillon dans les directions x et y de l'espace. Par ailleurs, l'échantillon est monté sur un support piézoélectrique, ce qui permet son positionnement dans les trois dimensions de l'espace.

Dans cette partie, nous présenterons les principes de fonctionnement sur lesquels s'appuie l'AFM ainsi que ses principaux éléments constitutifs. Nous préciserons ensuite les différents

[1] AFM provient de l'anglais « Atomic Force Microscopy »
[2] SPM provient de l'anglais « Scanning Probe Microscopy »
[3] STM en anglais « Scanning Tunneling Microscopy »

modes de fonctionnement en détaillant ceux utilisés au cours des travaux dans le cadre de cette thèse.

2.2.2. Eléments constitutifs de l'AFM

2.2.2.1. Principe général

Le principe de ce microscope repose sur une sonde, levier encastré à une extrémité et dont l'autre extrémité est munie d'une pointe, qui est en interaction avec la surface d'un échantillon dont le déplacement (dans les trois directions de l'espace) est assuré par une céramique piezoélectrique. Pour suivre les mouvements de la sonde (déflexion) et générer une image, une diode laser pointe le microlevier, le rayon est réfléchi vers un miroir qui le renvoie sur des photodiodes 4-quadrants (Figure 2-7). Ainsi la sonde permet de transformer l'effet d'une force en un signal électrique. Ce dispositif comporte une boucle d'asservissement qui permet d'ajuster la position de la sonde afin de maintenir la force d'interaction pointe-échantillon constante.

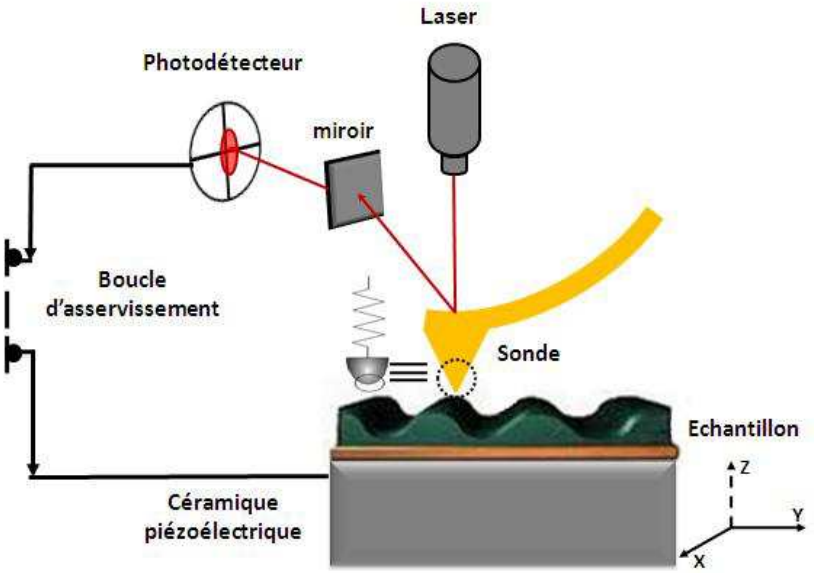


Figure 2-7 : Principe de fonctionnement d'un microscope à force atomique.

Deux types de mesures sont accessibles par AFM : des images et des « courbes de force ». Les images sont obtenues suivant deux modes : le mode contact ou le mode dynamique (ici contact intermittent dit « tapping ».

Afin de mieux comprendre les images qui seront obtenues, les principaux éléments à la base du fonctionnement de l'AFM sont décrits ci-après.

2.2.2.2. Sonde de mesure

La sonde est l'élément central de cet outil, elle se compose de la pointe et du microlevier (ou « cantilever »). Elle peut-être représentée par un ressort de raideur k et la pointe par une sphère de rayon R. Quand la sonde balaie l'échantillon, les interactions entre la sonde et la surface provoquent une déflection du levier. On obtient une mesure directe de la force suivant la loi de Hooke : $F = k.z$ F = kz; où k est la constante de raideur et z la déflexion du levier. Les forces mises en jeu sont de l'ordre du nanonewton (nN).

Le système majoritairement utilisé aujourd'hui est un microlevier en silicium ou en nitrure de silicium avec une détection optique. Le levier est commercialisé avec différentes longueurs et formes (poutre rectangulaire et trapèze). Leurs constantes de raideurs k varient entre 0.01 et 50 N/m. Celle du cantilever rectangulaire peut être exprimée par la relation :

$$k = \frac{wEe^3}{4l^3} \qquad (2\text{-}3)$$

Où E est le module d'élasticité (en $N.m^{-2}$), w la largeur, l la longueur et e l'épaisseur du microlevier [91].

La forme de la pointe et la constante de raideur k du microlevier sont des paramètres importants pour les mesures d'AFM. En effet, si les propriétés mécaniques sont bien connues pour la plupart des matériaux de composition des leviers commerciaux, les paramètres géométriques varient avec les incertitudes de fabrication. En effet, en phase de production, il est difficile de maîtriser l'épaisseur avec précision, ainsi les constructeurs ne peuvent assurer mieux que 50% d'incertitude sur la raideur pour les leviers les plus souples. Aussi des techniques de mesure ont été développées **[92, 93, 94, 95]**, et nous nous sommes intéressés à celle qui s'appuie sur l'exploitation du bruit thermique d'un microlevier libre **[96]** et qui est utilisée depuis des années pour calibrer la raideur d'un levier d'AFM (voir Annexe).

(a) *(b)* ©

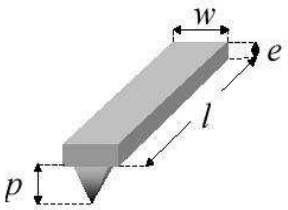


Figure 2-8 : Images en microscopie électronique à balayage d'une pointe AFM a) pointe conique, b) pointe pyramidale, c) schémas d'une pointe.

La pointe est la partie qui interagit directement avec l'échantillon, la connaissance de sa forme et de sa taille constitue un enjeu important. Elle est généralement à base de silicium, du fait du développement considérable des techniques de microfabrication utilisant ces matériaux pour la microélectronique. Les pointes peuvent avoir différentes tailles et géométries, chacune ayant ses propres caractéristiques vis-à-vis du contact avec l'échantillon et de l'image qui en résulte. Elles peuvent être de forme conique ou pyramidale, certaines sont longues et pointues (Figure 2-8). Celles-ci permettent une imagerie bien résolue mais elles sont fragiles et peuvent se casser facilement et dès le premier contact. Les autres pointes, en silicium nitruré (pyramidales) sont moins longues et avec des rayons de courbure plus importants.

De façon générale, la résolution latérale de l'AFM est limitée par le rayon de courbure de l'extrémité de la pointe. Malgré quelques techniques de caractérisation (par MEB ou par AFM *in situ*, à l'aide de billes de latex [97]), cette pointe est fragile et peut évoluer au cours d'une même manipulation. En effet, lors du balayage de la surface d'un échantillon, plusieurs mécanismes d'usure peuvent intervenir. Le premier mécanisme évoqué est l'abrasion : si la pointe ou la surface de l'échantillon présente des protubérances, on parle d'abrasion à deux corps, le corps le plus fragile est rayé. Le second mécanisme est la fatigue, c'est un processus qui peut aussi conduire à des dommages ou à des ruptures au niveau de la pointe au cours du balayage. La fatigue désigne une évolution locale et progressive, mais irréversible, des caractéristiques mécaniques d'une structure soumise à des contraintes et à des déformations variables et répétées. Dans le cas du contact en AFM, compte tenu de la faible fréquence de sollicitation et des charges importantes, on considère qu'il s'agit d'une fatigue dans le domaine plastique à faible nombre de cycles. Il en résulte une accumulation de défauts sur la surface de la pointe qui vont donner lieu à la création puis la propagation de fissures, aboutissant à une pointe rugosifiée. Enfin, mentionnons l'usure par adhésion. Bloo *et al* [98] utilisent un modèle d'Archard 1953 dans lequel le volume de matière arrachée sur le corps le plus fragile au cours d'un glissement est proportionnel à la distance parcourue. L'usure par adhésion en AFM peut plutôt s'expliquer par un processus de rupture molécule par molécule.

2.2.2.3. La céramique piézoélectrique de positionnement

Le déplacement de la pointe ou de l'échantillon est réalisé par un système piézoélectrique qui assure des déplacements latéralement et verticalement, inférieurs au dixième d'angström. Dans le cas des appareils commerciaux, ce dispositif a la forme d'un tube et est composé de 5

éléments séparés les uns des autres par des couches isolantes. Chaque élément, recouvert d'un matériau conducteur, est relié par des connexions électriques à un générateur de tension. En appliquant une tension à une de ces électrodes, la partie correspondante du tube subit une dilatation perpendiculaire. Ainsi le déplacement latéral (x, y) est obtenu par contrôle des tensions appliquées aux électrodes disposées à 90° l'une de l'autre. Les grandeurs (Xmax, Ymax, Zmax) de la céramique piézoélectrique utilisée au cours de ce travail sont respectivement (150µm, 150µm, 12µm). Une calibration du système piézoélectrique est effectuée régulièrement sur une surface dure telle que des billes de latex ou une surface étalon de SiO_2 nano et microstructurée.

2.2.2.4. Système optique de détection

La tête optique est le système permettant de détecter les déflexions du levier suite à la variation des interactions entre la pointe et la surface lorsque l'échantillon est balayé. Ce système se compose d'une diode laser, d'un miroir et d'une cellule photoélectrique. Ce photodétecteur est formé de quatre photodiodes permet de recueillir les mouvements du levier. Un réglage précis permet de focaliser le faisceau laser, issu de la diode, sur l'extrémité du cantilever, qui est recouvert d'une fine couche réfléchissante. Ce dépôt réfléchit le faisceau sur les quatre photodiodes via le miroir. Les déflexions du levier sont plus importantes à son extrémité, ainsi il est important d'optimiser le réglage du faisceau afin d'obtenir une sensibilité maximale. Les déviations du faisceau laser réfléchi se traduisent par des différences d'éclairement entre les photodiodes qui sont alors converties en différence de tension, puis en unités de longueur après des réglages de calibrage. Le signal peut être enregistré et une image (topographique ou autre) de la surface peut ainsi être réalisée.

L'outil AFM qui nous a permis d'évaluer les propriétés de surface est de type Bioscope II. Il peut fonctionner en mode contact ou dynamique (ici tapping), aussi bien à l'air qu'en milieu liquide. Cet AFM est associé à un microscope optique inversé « Olympus », qui permet non seulement une approche plus facile des échantillons biologiques complexes comme les cellules et les micro-organismes, sous réserve d'un support de test transparent, mais aussi de sonder et coupler les propriétés mécaniques et optiques d'un même échantillon.

2.2.2.5. Le système d'asservissement

Quel que soit le mode de fonctionnement (contact ou oscillant), il est préférable d'obtenir des images quand le système est placé dans une boucle d'asservissement, régulée par un amplificateur PI (Proportionnel, Intégral).

La boucle d'asservissement dans les modes dynamique et intermittent, nécessite notamment un bon rapport signal sur bruit au voisinage de la résonance excitée du levier. En mode contact, l'asservissement de l'AFM maintient le microlevier suffisamment défléchi pour que ce dernier reste dans le domaine répulsif. Le circuit d'asservissement assure cette condition en modifiant la hauteur du piézoélectrique en z de façon à garder la déflexion verticale du microlevier constante. Les données traduisant les déplacements du cantilever verticalement comme latéralement sont ainsi enregistrées.

2.2.3. Utilisation de l'AFM

Un nombre important de forces, attractives ou répulsives, de différentes portées et intensités, peuvent être mises en jeu entre une pointe AFM et une surface, ouvrant un large champ d'applications dans le domaine de la caractérisation des propriétés des matériaux (viscoélastique, électrostatique, magnétique, chimique). Ces forces, qui interviennent dans le processus de mesure, dépendent à la fois du milieu dans lequel sont réalisées les expériences (vide, air, liquide) mais aussi du type de pointe utilisée (grosse, fine, nature du matériau, fonctionnalisation) et de la nature de l'échantillon sondé. La fonctionnalisation de la pointe permet de rendre cette dernière plus sensible à une force en particulier. Une description des différents types de forces mises en jeu est disponible en annexe.

2.2.3.1. Modes de fonctionnement de l'AFM

Il existe différents modes de travail différents qui permettent non seulement d'accéder à la topographie de la surface sondée mais aussi à ses propriétés mécaniques. On distingue 3 principaux modes utilisés : le mode contact, le mode contact intermittent (dit « tapping ») ainsi que le mode non contact. On n'abordera dans ce qui va suivre que les 2 modes « contact et tapping », modes utilisés dans le cadre de ce travail.

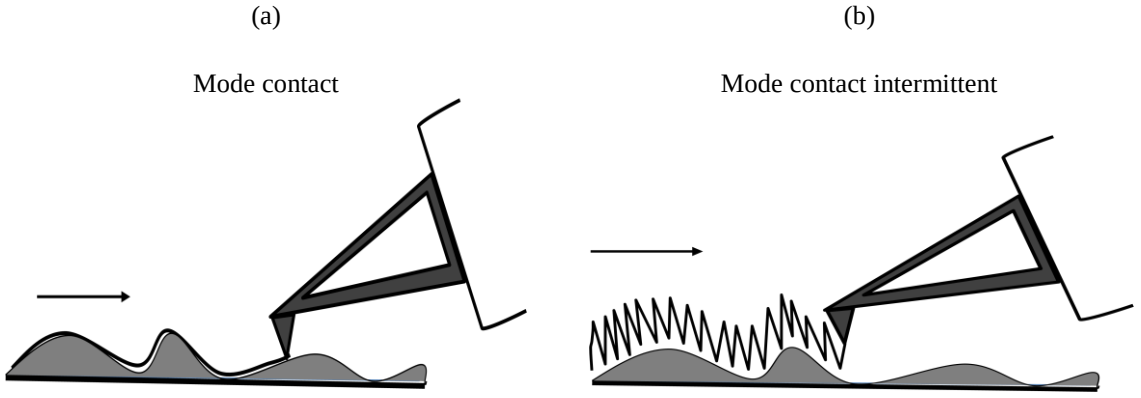


Figure 2-9 : Schémas de deux modes de l'AFM, a) mode contact, b) mode contact intermittent (tapping).

a. Mode contact

Le mode contact est historiquement le premier mode de fonctionnement développé, il repose sur des mesures de déflexions statiques du levier qui supporte la pointe AFM. Ce mode peut fonctionner selon l'un des modes suivants :

- ***Mode contact « hauteur » (force constante)***

Au cours du mode contact (Figure 2-9-a) l'extrémité de la pointe est mise en contact avec la surface à analyser. Il y a répulsion entre la pointe et la surface durant le balayage dans le plan horizontal (x,y) et la force est maintenue constante. La boucle d'asservissement règle la position verticale de l'échantillon par le biais du déplacement de la céramique piézoélectrique. Pour assurer une déflexion constante. On obtient ainsi la topographie de la surface de l'échantillon.

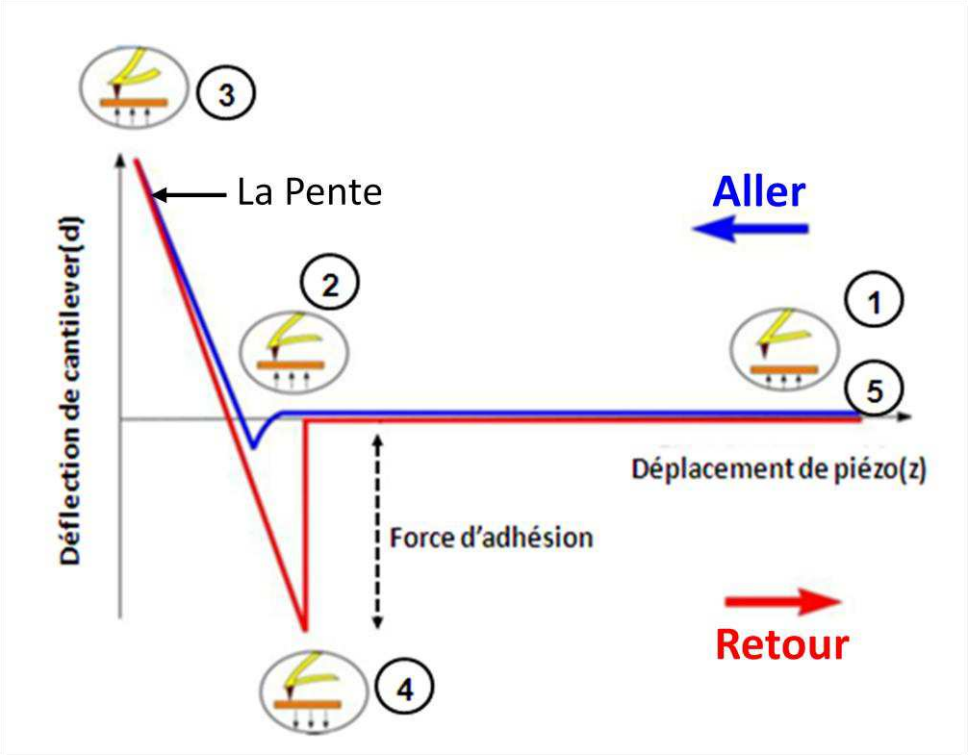
Ce mode est intéressant quand les surfaces sont rugueuses (pour éviter de détériorer la pointe) ou quand elles sont fragiles (polymères, cellules, etc.) pour éviter d'abîmer l'échantillon, mais il peut induire des artéfacts liés à la partie électronique de l'asservissement.

- ***Mode contact « force » (hauteur constante)***

La hauteur de l'échantillon est maintenue constante (pas d'asservissement) et l'image est constituée par la mesure de la déflexion du levier. Cette mesure est purement physique (pas d'artéfacts liés à l'électronique) mais avec une limitation dans le choix des échantillons (pas trop rugueux, pas trop mou, etc.). Avec ce mode l'échantillon peut être endommagé si les forces d'adhésion entre la pointe et la surface sont importantes. Ce mode peut fournir, en plus des informations topographiques, des caractéristiques telles que les propriétés mécaniques locales de l'échantillon sondée (nanotribologie, nanorhéologie, etc.).

- ***Mode spectroscopique « courbe de Force » CF***

Le mode spectroscopique (dit « mode force »), permet l'étude de l'évolution de la force détectée en fonction de la distance verticale pointe-échantillon. Quand la pointe est loin de l'échantillon, la déflexion du levier n'évolue pas et lorsqu'elle s'approche de l'échantillon, il y a interaction soit attractive soit répulsive. Quand la pointe est très proche de la surface, la déflexion du levier augmente à cause des forces attractives existant entre la pointe et l'échantillon. Ces mesures fournissent des courbes dites « de force » (ou de charge/ décharge) (Figure 2-10), qui renseignent sur les forces d'adhésion et la raideur de l'échantillon.



1) L'échantillon et la pointe se rapprochent. Il n'y a pas d'interaction (déflexion nulle).
2) La pointe plonge sur la surface de d'échantillon (déflexion négative). Elle est comme happée.
3) L'échantillon s'élève encore, et fait défléchir le microlevier (déflexion positive).
4) L'échantillon se retire, le microlevier est entraîné avec lui à cause des forces d'adhésion.
5) Il n'y a plus de contact, la pointe se détache de la surface et revient à son état d'équilibre (déflexion nulle).

Figure 2-10: Courbe de force idéalisée d'une pointe dure sur un matériau indéformable. La déflexion du levier est tracée en fonction du déplacement vertical de la surface (piézo).

Décrivons à partir de la Figure 2-10, la courbe de force typique du comportement du levier lors du trajet « aller » puis « retour » dans le cas d'un matériau dur :

- ***Courbe aller (ou approche) :*** loin de la surface, les forces interfaciales sont très faibles et la déflexion du levier nulle. A l'approche du contact, l'interaction pointe-surface devient attractive, ce qui entraîne une faible déflexion du levier qui n'est parfois pas détectable, en

particulier lorsque celui-ci est très raide. Au contact et si l'échantillon continue de monter, la déflexion va croître linéairement avec le déplacement vertical de l'échantillon.

- ***Courbe retour (ou retrait) :*** la déflexion suit d'abord la courbe aller jusqu'à atteindre le point de déflexion nulle et devient négative ensuite du fait des forces d'adhésion et de la raideur finie du levier. La courbe de déflexion reste dans le prolongement de la droite de contact car la pointe reste en contact avec la surface à cause des forces d'adhésion. Pour rompre ces forces d'adhésion il faut continuer d'éloigner l'échantillon jusqu'à ce que la force appliquée corresponde au point d'instabilité du décollement. Au point de rupture, la déflexion retrouve sa position d'équilibre, c'est à dire sa position sans interaction, un cycle d'hystérésis mécanique est ainsi observé.

Pour chaque nouvelle sonde nous procédons à la calibration de l'expérience. Nous sondons dans un premier temps un substrat de référence considéré comme matériau dur (mica ou SiO_2). Nous réalisons une courbe de force et fixons (via le logiciel) la pente p à 1. Cette opération permet de convertir le signal des photodiodes en nanomètres et se base sur le fait que pour un déplacement Δz donné de l'échantillon, le levier subit une déflexion Δz, sans indentation de l'échantillon par la pointe (matériau dur). La raideur du levier est déduite préalablement à partir de la mesure du bruit thermique. Une fois la sonde calibrée, nous procédons aux différentes analyses (topographiques ou autres) du substrat de référence selon le protocole établi. Ensuite l'échantillon à étudier est positionné et, comme pour la référence, les courbes de forces sont enregistrées. Fournissant des informations sur la raideur effective de l'échantillon ainsi que sur son énergie de surface W à partir de la mesure de force, ces courbes permettent aussi de fixer le point de fonctionnement de l'expérience, en particulier la force imposée au niveau du contact et avec laquelle les images topographiques et/ou mécaniques seront effectuées. La force imposée est déduite à partir de la loi de Hooke.

b. Mode contact intermittent (mode « tapping »)

Un autre mode de fonctionnement est possible et est appelé mode contact intermittent (tapping). Dans ce mode, la pointe oscille au voisinage de sa fréquence de résonance venant ainsi périodiquement en contact avec l'échantillon. C'est un mode intermédiaire entre le mode contact et le mode non-contact[4]. L'amplitude d'oscillation varie alors suivant

[4] Chaque levier a une fréquence propre. La mesure est réalisée à une fréquence légèrement plus faible que la fréquence de résonance f^-. L'amplitude et la phase sont enregistrées de manière indépendante. La phase renseigne sur les propriétés mécaniques de l'échantillon, alors que l'amplitude nous renseigne entre autres sur sa topographie de l'échantillon.

l'interaction pointe-surface. L'asservissement consiste à maintenir une amplitude d'oscillation constante **[99]**. Ce mode présente l'avantage de limiter le temps de contact entre la pointe et la surface et donc de minimiser les forces de cisaillement limitant ainsi l'usure de la pointe mais aussi et surtout celle de l'échantillon.

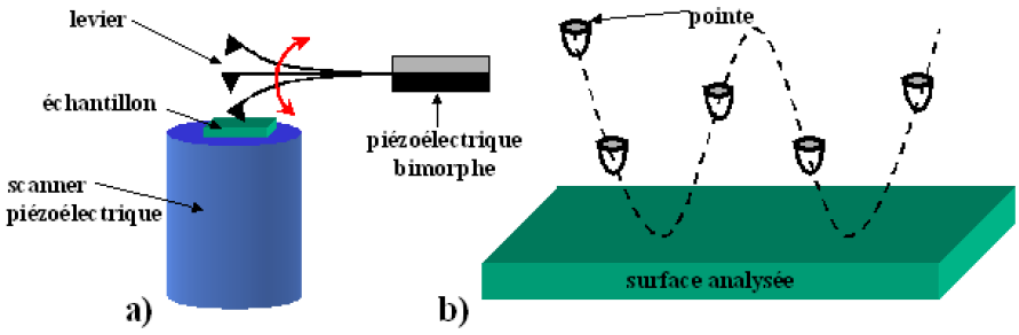


Figure 2-11. Schéma de principe du microscope fonctionnant en mode tapping.

L'avantage principal de ce mode est de pouvoir obtenir d'excellentes résolutions latérales avec des oscillations de grande amplitude, la pointe entre dans le régime répulsif lorsque la distance pointe-surface est très courte. La pointe "touche" donc périodiquement la surface, néanmoins, la durée du contact est très courte minimisant ainsi le temps d'interaction et assurant un très petit déplacement latéral du levier (suite au balayage) pendant son contact et donc une force latérale très faible. Ce mode n'a pas besoin d'un grand facteur de qualité de l'oscillateur formé par le levier, il est donc particulièrement bien adapté aux mesures pour la visualisation d'échantillons fragiles tels que les matériaux mous et les macromolécules biologiques.

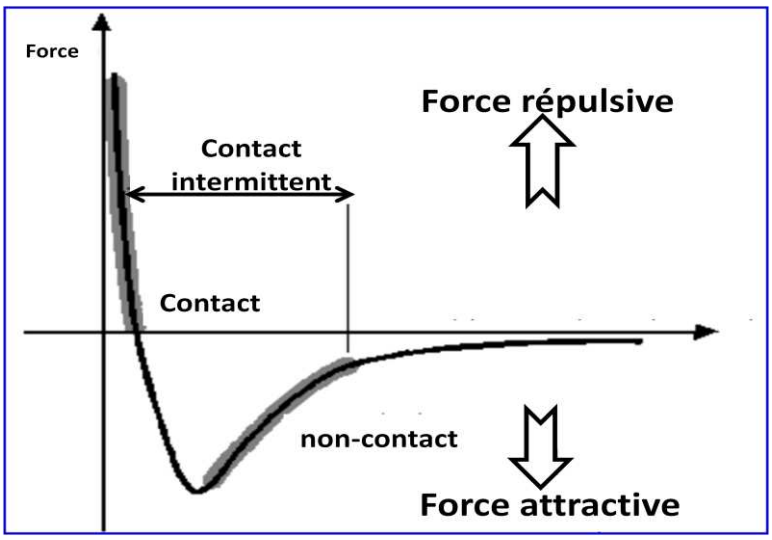


Figure 2-12 Mode opératoire en mode tapping.

L'analyse des différents régimes de forces d'interaction « pointe-surface » en fonction de la distance permet de récapituler comment se fait l'imagerie dans les différents modes de fonctionnement : contact, non contact, contact intermittent. En effet, pour une amplitude des oscillations petite lorsqu'elle est comparée à l'apex de la pointe, l'interaction est attractive dominant et dans ce cas la pointe ne touchera pas la surface sondée. Par contre, quand les oscillations sont plus grandes par rapport à R alors la pointe a l'énergie suffisante pour toucher la surface, il s'agit du mode contact intermittent répulsif dominant. Le mode intermédiaire est appelé mode « répulsif-attractif ». Selon le mode utilisé, on aura accès aux propriétés mécaniques comme l'élasticité et/ou la déformation mécanique à l'échelle locale ou à des informations d'interaction de force.

- ***Mode opératoire***

Avant toute approche de la surface, un balayage en fréquence du piezo excitateur permet de localiser l'amplitude maximum du levier qui correspond à sa résonance. Comme nous l'avons vu, le levier est assimilé à un oscillateur du second ordre et par conséquent, l'amplitude est maximale à la résonance et la phase est à $\pi/2$ (Figure 2-13).

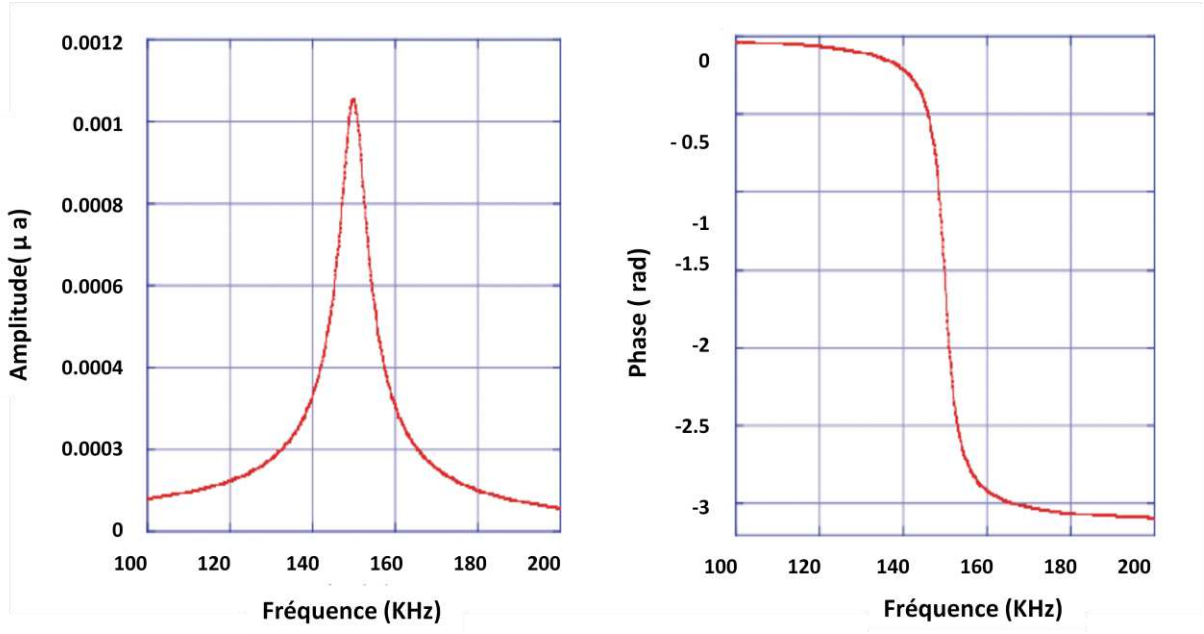


Figure 2-13 : Modélisation de propriétés de la résonance.

Au fur et à mesure de l'approche, en fonction de l'interaction pointe-surface la fréquence de résonance se décale. En situation de contact intermittent, s'ajoute à ce décalage une déformation du pic de résonance, qui devient dissymétrique (Figure 2-14); il faut alors utiliser un modèle d'oscillateur non linéaire pour décrire le système. D'un point de vue pratique, cette non-linéarité a pour conséquence la possibilité d'avoir plusieurs points de fonctionnement stables, en fonction des paramètres d'interaction pointe-surface et de commande (plusieurs amplitudes d'oscillation possibles pour une même fréquence d'excitation).

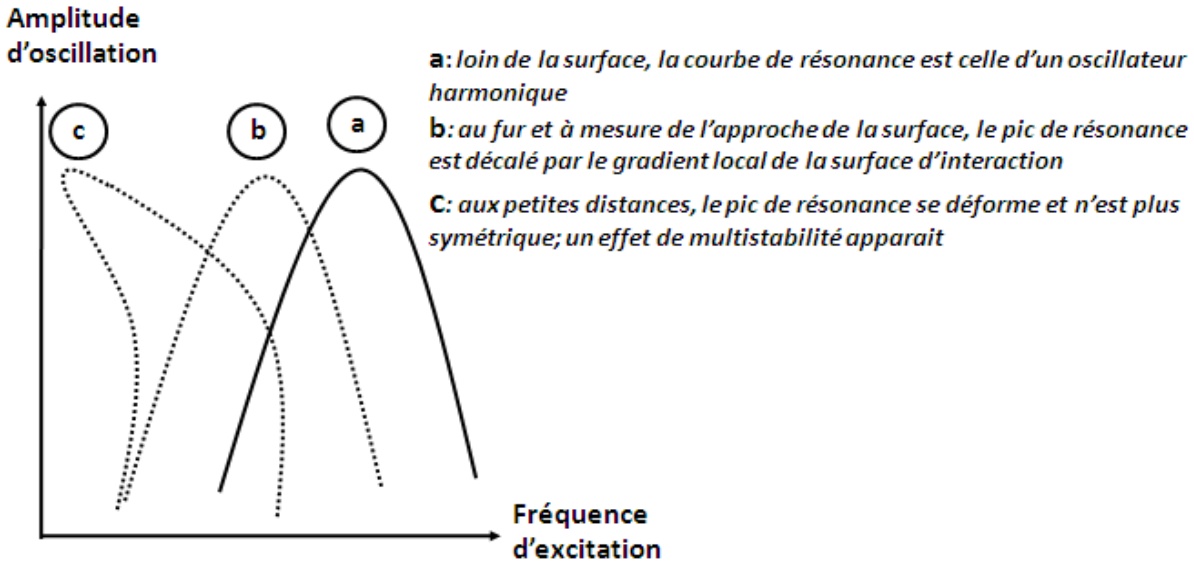


Figure 2-14 : Modification de la courbe de résonance d'amplitude en fonction de la force d'interaction lors de l'approche de la surface en mode contact intermittent.

Puis, avant d'approcher la pointe de l'échantillon, un bimorphe piézoélectrique impose une oscillation mécanique au levier à une pulsation ω légèrement inférieure à celle du mode principal de résonance ω_0 de la pointe, pour optimiser la sensibilité du dispositif expérimental. La pointe ne ressent alors aucune influence de la part de l'échantillon. Le levier peut encore être considéré comme un oscillateur harmonique.

Lorsque la pointe s'approche de l'échantillon, celle-ci ressent une force additionnelle qui dépend de sa distance avec l'échantillon. La pointe commence à toucher de manière intermittente la surface et les forces de surface, en général attractives, vont induire une diminution de la fréquence de résonance du système.

En composant la caractéristique de l'interaction pointe-surface et celle de l'interaction pointe-actionneur piézoélectrique, on obtient un ou plusieurs points de fonctionnement qui reflètent les états de stabilité du système. De même, on peut voir que l'interaction pointe-surface est une courbe qu'il est possible de linéariser par morceaux, comprenant alors une partie neutre à longue distance, puis une partie attractive et enfin une partie répulsive à courte distance.

L'étude de l'évolution du système en utilisant ces courbes et leurs points de fonctionnement permet d'établir des formules de passage entre celles-ci et la courbe d'approche-retrait classique en fonction de la raideur du cantilever utilisé et du type de surface.

- ***Comportement de la résonance en fonction de la distance à la surface***

A l'air, loin de la surface, la courbe de résonance du microlevier est quasiment celle d'un oscillateur harmonique.

Si F est l'amplitude de la force sinusoïdale ressentie par la pointe lors de l'excitation, l'équation du mouvement s'écrit alors :

$$m_e\ddot{z} + c\dot{z} + kz = F\exp(i\omega t) \qquad (2\text{- }4)$$

En posant γ=a /m_e et, nous obtenons :

$$\ddot{z} + \gamma\dot{z} + \omega_0^2 z = \frac{F}{m_e}\exp(i\omega t) \qquad (2\text{- }5)$$

Dans la limite où les forces de viscosité sont faibles $\gamma \ll \omega_0$, la dépendance en temps de z(t) est simplement :

$$z(t) = A(\omega)\exp(i\omega t - \phi(\omega)) \qquad (2\text{- }6)$$

La résolution de l'équation (2- 5) fournit l'amplitude te la phase d'oscillation en fonction de l'excitation :

$$A(\omega) = \frac{F}{m_e} \frac{1}{\sqrt{\omega_0^2 - \omega^2) + \gamma^2 \omega^2}}, \text{ où } (\gamma = \frac{c}{m_e} \quad et \quad \omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m_e}}) \tag{2- 7}$$

$$\phi(\omega) = \arctan\left(\frac{\gamma\omega}{\omega_0^2 - \omega^2}\right) \tag{2- 8}$$

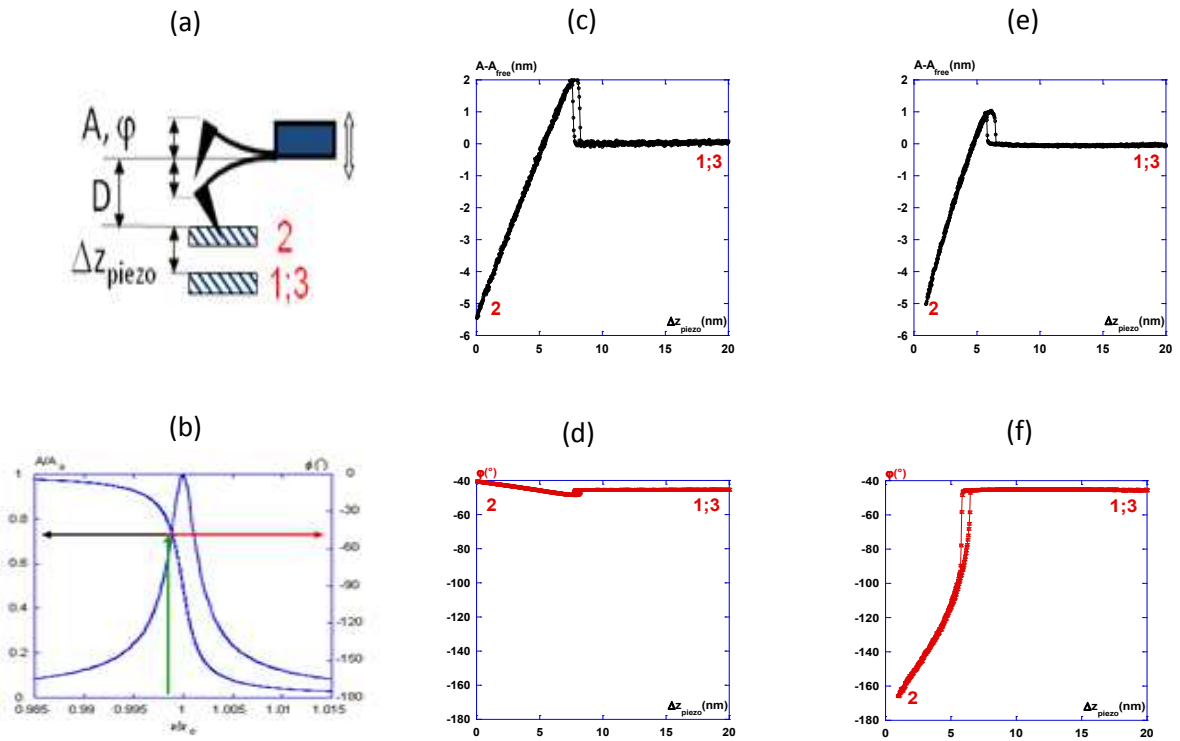
Le levier peut être assimilé à un oscillateur harmonique dont la masse, que nous avons notée m_e, est la masse équivalente de l'oscillateur. Ainsi, la pointe vibre avec une amplitude A et avec un déphasage Φ par rapport à l'excitation. La sensibilité est décrite par le facteur de qualité Q de l'oscillateur:

$$Q = \frac{\omega_0}{\Delta\omega} = \frac{f_0}{\Delta f} \tag{2- 9}$$

Avec $\Delta\omega$ la largeur de la résonance mesurée à l'amplitude $A(\omega_0)/\sqrt{2}$. En résolvant l'équation $\frac{A(\omega)}{A(\omega_0)} = \frac{1}{\sqrt{2}}$ nous obtenons la relation $\Delta\omega = \gamma$ soit $Q = \omega_0/\gamma$. La valeur de Q est de l'ordre de la centaine dans le cas de l'utilisation de l'AFM à l'air, ce facteur est divisé par 10 environ en milieu liquide.

- ***Mode spectroscopique « Courbe d'Approche Retrait » CAR***

Le principe d'une courbe d'approche-retrait est sensiblement le même qu'une courbe de force en mode contact à ceci près que c'est un autre signal que la déflexion du levier qui est enregistré lors du cycle de montée et descente de l'échantillon vers la pointe. En effet, ce mode correspond à une mesure de l'amplitude et de la phase des oscillations du levier en fonction du déplacement vertical de l'échantillon. On obtient une « courbe d'approche-retrait » ou « courbe amplitude distance ». La mesure consiste à enregistrer l'amplitude du cantilever. Les courbes typiques ressemblent à celles présentées dans la Figure 2-15.



$a=A/A$ $d=D/A$	Situations de contact intermittent	Situations de non-contact
$u=\omega/\omega_0$ $Q=\omega/\beta_0$	Mode répulsif dominant	Mode attractif dominant

Figure 2-15 : Courbe Approche Retrait CAR pour les 2 régimes attractif-répulsif a) schéma « tapping », b) Courbe de résonance, c) Amplitude mode répulsif, d) Phase mode répulsif e) Amplitude mode attractif, f) Phase mode répulsif.

Notons que l'origine de la dissipation que nous traitons est principalement due à l'hystérésis mécanique, ou asymétries, entre l'aller et le retour de l'oscillation.

En mode contact intermittent à l'air, on utilise typiquement des microleviers de constante de raideur ~50 nN/nm et de fréquence de résonance ~300 kHz (Figure 2-8). Cette raideur de microlevier (typiquement de l'ordre de 50 nN) est suffisante pour vaincre la force de capillarité entre la pointe et le film d'eau qui recouvre la surface en atmosphère ambiante.

2.2.3.2. Principales utilisations des modes

a. Utilisation du mode contact intermittent à l'air

Différents paramètres instrumentaux sont à prendre en compte pour utiliser le mode contact intermittent de manière satisfaisante. Les propriétés mécaniques du microlevier oscillant doivent être adaptées à l'application envisagée (notamment le fonctionnement à l'air ou en milieu liquide). La caractérisation de la courbe de résonance libre (loin de la surface) est une étape indispensable dans la mise en œuvre de ce mode d'imagerie; la qualité et la forme

de cette courbe dépendent à la fois du mode d'excitation du microlevier, des propriétés physiques de celui-ci et du milieu d'imagerie. Près de la surface et a *fortiori* en situation de contact intermittent, l'oscillation dépend de plus de l'interaction avec la surface. La modélisation des forces d'interaction pointe-surface à l'air ou en milieu liquide est un sujet complexe, encore plus difficile à aborder dans le cas d'objets individuels mous et hydratés comme des macromolécules biologiques et pourtant nécessaire pour un contrôle fin de cette force. Enfin, la fréquence d'acquisition des images est une limitation majeure des AFM commerciaux actuels pour l'imagerie résolue en temps en milieu liquide.

Nous avons utilisé ce mode pour détecter la structure et la morphologie de polyélectrolytes à chaque étape de leur fabrication par dépôts successifs du polycation PAH, hydrophile, et du polyanion PSS qui

possède une chaîne centrale hydrophobe. Ce mode a également permis d'étudier l'évolution de la morphologie bactérienne au cours du temps. Cela nous a permis de compléter les résultats obtenus par le dispositif acoustique afin d'approfondir notre compréhension des phénomènes mis en jeu lors de l'élaboration du film sensible, puis lors des détections, en fonction de paramètres comme le pH ou la charge électrique de surface.

Ainsi, dans le cadre de ce travail, la topographie a permis de recueillir plusieurs types d'informations, dans un premier temps, des mesures de rugosités ont été réalisées, l'état de surface a été caractérisé, la moyenne arithmétique de hauteur Ra a été mesurée.

b. Utilisation du mode contact à l'air

Ce mode nous a permis d'étudier les charges surfaciques des films de PEM et d'identifier l'épaisseur du film par des opérations de grattage. Le passage au mode force volume a permis d'obtenir une cartographie des courbes de force d'adhésion de la pointe sur la surface point par point, cette procédure a été mise en œuvre pour des surfaces avec des bactéries.

c. Utilisation du mode contact en milieu liquide

Dans le cadre de la recherche des propriétés mécaniques de la bactérie, l'AFM est utilisé comme un nanoindenteur et on mesure l'effort exercé sur la micropoutre en fonction du déplacement vertical tout au long de l'essai qui comprend une phase d'approche, d'indentation et de retrait. Le point clef du dépouillement des mesures d'indentation réalisées avec l'AFM réside dans la modélisation de l'interaction entre la pointe et l'objet d'étude qui permette de faire ressortir des grandeurs mécaniques associées au comportement de l'échantillon. La cellule présente une architecture complexe avec plusieurs constituants internes. Cet état de fait rend actuellement impossible une modélisation de tous ses

composants. Cependant, ce mode a été utilisé pour obtenir une connaissance préliminaire sur le comportement mécanique global d'une cellule avec une approche analytique adaptée avant et après l'ajout d'un stress (dans notre cas l'effet de métaux lourds) ainsi que l'évolution de la morphologie de la bactérie au cours du temps.

2.3. Éléments de théorie sur les écoulements

Ce paragraphe vise à donner quelques éléments théoriques de base à la compréhension des phénomènes d'écoulement mis en jeu dans nos dispositifs, une dernière partie portant sur la modélisation des écoulements dans nos cellules particulièrement celle pour le capteur électrochimique mise au point dans le cadre de ces travaux.

2.3.1. Fluides complexes

Les fluides complexes sont des systèmes moléculaires de taille mésoscopique qui sont construits à partir de liaisons chimiques (polymères) ou à travers des interactions moléculaires fortes (micelles, cristaux liquides) [100].

Les fluides complexes classés non newtoniens possèdent un écoulement compliqué par rapport aux fluides newtoniens qui ont un écoulement facile à décrire à partir de la simple connaissance de leur viscosité et leur densité.

La physico-chimie permet de concevoir des propriétés macroscopiques en jouant sur les interactions entre les objets constituant le fluide, comme les forces de Van der Wals [101], les forces électrostatiques [102], les liaisons hydrogènes [103], ainsi que sur les contraintes stériques et géométriques. L'hydrophobicité des matériaux joue aussi un rôle essentiel vis-à-vis de leur comportement sur les parois.

2.3.1.1. Définition des notions de viscosité

Les écoulements de fluides peuvent être classés en deux catégories : laminaires et turbulents. La frontière entre ces deux régimes est donnée par la capacité de la matière à s'écouler, sous la forme d'une grandeur caractéristique du fluide, sa viscosité. Cette grandeur est admise comme étant une mesure de la résistance à la déformation sous l'action d'un cisaillement.

Considérons deux couches de fluides contiguës, distantes de *dz*. La force de frottement *F* qui s'exerce à la surface de séparation de ces deux couches s'oppose au glissement d'une

couche sur l'autre. Elle est proportionnelle à la différence de vitesse des couches soit *dv*, à leur surface *S* et inversement proportionnelle à *dz*.

L'expérience montre aussi qu'un mouvement stationnaire s'établit où la vitesse v_0 de la plaque supérieure est constante. C'est donc le long d'une paroi immobile, comme dans notre cas au niveau du haut de la cavité fluidique, que le liquide exerce sur cette paroi des forces tangentielles dont la résultante vaut précisément -*F*.

Cette force est proportionnelle au gradient de vitesse d'où la formule de Newton :

$$F = \eta S \frac{dV}{dz} \qquad (2\text{- }10)$$

La viscosité dynamique η est appelée également viscosité apparente, son unité est le poise (*P*) dans le système CGS, et le pascal seconde (*Pa.s*) dans le système MKSA.

Est également définie la viscosité cinématique, notée *v*, utilisée chaque fois que l'accélération intervient, qui est égale au rapport de la viscosité dynamique par la masse volumique du fluide considéré :

$$v = \frac{\eta}{\rho} \qquad (2\text{- }11)$$

Où ρ est la masse volumique du matériau. L'unité de *v* est le $cm^2.s^{-1}$ encore appelée Stokes (St) dans le système CGS, le $m^2.s^{-1}$dans le système MKSA.

2.3.1.2. Etude des solutions polymères par viscosimétrie

Lorsque la solution de polymères s'écoule avec un champ de vitesse non uniforme, la présence de macromolécules de dimensions comprises entre 0,2 et 0,002 µm, introduit des frottements supplémentaires de telle sorte que le coefficient de viscosité est supérieur à celui du solvant pur.

L'équation empirique de Mark-Houwink relie la viscosité apparente, noté $[\eta]$, à la masse moléculaire *M* par la relation :

$$[\eta]=K.M.\alpha \qquad (2\text{- }12)$$

Où *K* et α sont des paramètres caractéristiques du système polymère-solvant à température donnée. Cette relation est admise dans le cas général. Les relations théoriques entre la viscosité et la masse moléculaire sont cependant difficiles à établir, d'autres facteurs intervenant, en particulier, la forme des macromolécules.

Nous présenterons ici brièvement deux procédés de mesure expérimentale de la viscosité d'un polymère, les viscosimètres de Couette et à écoulement (capillaire).

a. Viscosimètre de Couette

Ce viscosimètre comporte un cylindre rempli du liquide à étudier, dans lequel est immergé un cylindre plein, entraîné de l'extérieur par un mécanisme permettant la mesure du couple. On réalise ainsi une application de la loi de Newton, dans laquelle *dS* est remplacé par la surface latérale du cylindre plein. Le couple d'entraînement de ce cylindre est proportionnel à la viscosité dynamique, à la vitesse de rotation et à une constante propre de l'appareil.

Il en existe de nombreuses variantes, utilisant des mobiles de formes diverses, par exemple, celui qui utilise la déviation d'un faisceau laser sur un miroir, et la mesure de la viscosité est donnée par :

$$\eta = \frac{\tau.\alpha.(R-r)}{2.\pi.r^2 h.w.R} \qquad (2\text{- }13)$$

Le viscomètre de Couette donne ainsi une mesure directe de la viscosité dynamique par mesure d'une déviation d'angle. Ce type de viscomètre a été utilisé pour déterminer la viscosité de nos solutions de polyélectrolytes, les calculs sont présentés dans le chapitre 3.

b. Viscosimètre à écoulement

Le viscosimètre absolu à capillaire utilise le débit *Q* dans un tube capillaire de rayon *r* et de longueur *l*, sous l'action d'une différence de pression Δp. La loi de Poiseuille, dans le cas d'un écoulement laminaire, permet d'exprimer la viscosité dynamique sous la forme :

$$\eta = \frac{\pi.\Delta P.r^2}{8.l.Q} \qquad (2\text{- }14)$$

Cette méthode constitue ainsi une mesure dynamique de la viscosité, par la mesure d'un débit en utilisant les lois de la dynamique de fluides, en particulier la formule de Poiseuille.

2.3.2. L'hydrodynamique à bas nombre de Reynolds

2.3.2.1. Généralités

Les canaux utilisés dans les systèmes microfluidiques ont souvent des rapports de forme importants, avec notament une largeur *w* grande devant l'épaisseur *h*. Cela permet de négliger les effets de bord et de considérer une vitesse uniforme sur la longueur.

L'équation de Stockes qui décrit l'écoulement microfluidique stationnaire d'un fluide newtonien incompressible, dans le cas où il n'y a pas de force extérieure appliquée, s'écrit :

$$\eta \Delta V - \vec{grad} p = 0 \qquad (2\text{- }15)$$

Avec:

v : vitesse du fluide

η : viscosité du fluide

p : pression du fluide

$\vec{grad}$ et Δ: correspondent respectivement aux opérateurs différentiels gradient et laplacien.

La résolution de cette équation est de la forme :

$$V = -z(h-z)^{\frac{1}{2\eta}\nabla p} \qquad (2\text{- }16)$$

Où ∇p est le gradient de pression uniforme sur toute la longueur du canal. Pour un écoulement en cavité, dans lequel la longueur de parcours est également grande devant l'épaisseur du canal, la vitesse moyenne et le débit correspondant à Q sont donnés respectivement par :

$$V = -\frac{h^3}{12\eta}\nabla p \qquad (2\text{- }17)$$

et

$$Q = -\frac{L.h^3}{12.\eta}\nabla p \frac{\mathrm{lh}^3}{12\eta}\nabla \mathrm{P} \qquad (2\text{- }18)$$

2.3.2.2. Nombre de Reynolds et écoulements

Ainsi, les écoulements utilisés en microfluidique sont caractérisés par des petites dimensions et des vitesses faibles. A ces échelles, les effets de la viscosité deviennent prépondérants sur les effets inertiels. On quantifie cette situation en introduisant le nombre de Reynolds :

$$R_e = \frac{\text{Force d'inertie}}{\text{Force de viscosité}} = \frac{\rho.V.L}{\eta} \qquad (2\text{- }19)$$

V et L représentent la vitesse et la longueur typiques de l'écoulement, ρ et η sont respectivement la masse volumique et la viscosité du fluide.

Les expériences réalisées par *Reynolds* (1883) lors de l'écoulement d'un liquide dans une conduite cylindrique rectiligne dans laquelle arrive également un filet de liquide coloré, ont montré l'existence de deux régimes d'écoulement : laminaire et turbulent. L'expérience montre que :

- Si Re < 2000 : le régime est laminaire (Figure 2-16), l'équilibre entre les forces de frottement visqueux et le gradient de pression va déterminer le profil d'écoulement. Dans ce cas les phénomènes de diffusion dominent. L'équation de Navier-Stokes se simplifie et devient l'équation de Stokes.
- Si 2000 < Re < 3000 : le régime est intermédiaire.
- Si Re > 3000 : le régime est turbulent (Figure 2-16) : les forces inertielles sont seules responsables du transfert de quantité de mouvement, et le mécanisme de transfert dominant sera l'advection.

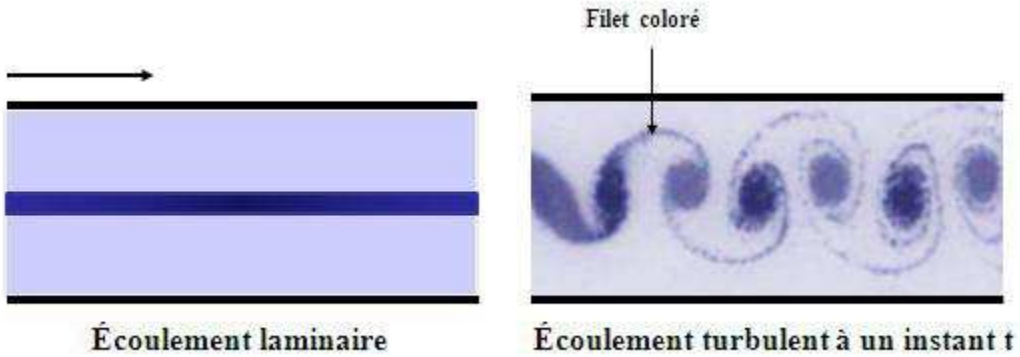


Figure 2-16 : Différents types d'écoulements.

Ainsi, un faible nombre de Reynolds implique l'absence des phénomènes turbulents qui sont utilisés dans les systèmes macroscopiques pour assurer le mélange.

Parmi les écoulements avec des échelles de longueur très petites, mentionnons également les écoulements autour de petites macromolécules telles que les polymères, ainsi que la propulsion des micro-organismes par des cils et des flagelles. Les développements récents des microsystèmes mécaniques (MEMS) et des dispositifs d'analyse physico-chimique intégrés accroissent encore le champ d'application des écoulements à petits nombres de Reynolds.

Dans notre cas, des hauteurs de canaux de l'ordre de 100 μm et des débits de *15* à 25$\mu L/min$, une vitesse moyenne d'écoulement de l'ordre de 8.10^{-3} à 20.10^{-3} $m.s^{-1}$, permettent d'évaluer un nombre de Reynolds entre *1* et *3* environ.

2.3.2.3. Réversibilité cinématique de Stokes

Une conséquence de la linéarité de l'équation de Stokes est la réversibilité des écoulements à très petits nombres de Reynolds. Si l'écoulement du fluide est créé par le mouvement de parois solides, lorsqu'on inverse le mouvement des parois, les particules de fluide reprennent exactement les mêmes trajectoires, mais en sens inverse.

La réversibilité cinématique a des conséquences fondamentales sur les modes de propulsion des vivants. Les micro-organismes comme les bactéries vivent dans un milieu où l'inertie est négligeable devant la viscosité. L'évolution de ces micro-organismes a ainsi conduit à des modes de propulsion utilisant des cils.

2.3.3. Application aux cellules microfluidiques des capteurs

2.3.3.1. L'intérêt de l'utilisation du réseau microfluidique

Comme mentionné plus haut, la linéarité de l'équation de Stokes pose un problème dans les applications où l'on cherche à mélanger les fluides. La turbulence inertielle, mécanisme très efficace pour assurer une bonne homogénéité du mélange, n'existe pas dans les microcanaux à cause de l'absence des non-linéarités inertielles. La diffusion est seule à l'œuvre et ne permet pas d'homogénéiser rapidement le contenu des canaux dans la plupart des cas. Aussi des formes d'arrivées de canaux en réseau ont été introduites pour accélérer le mélange de liquides newtoniens (Figure 2-17). Ce type d'architecture, retenu ici pour les puces PDMS, favorise une diffusion rapide, et ainsi une homogénéisation, des solutions arrivant sur le capteur.

2.3.3.2. L'écoulement à travers le réseau microfluidique

Pour prévoir la nature d'écoulement et évaluer l'influence des géométries de la chambre à flux sur la vitesse d'écoulement, nous nous sommes appuyés sur un logiciel de simulation par éléments finis (Comsol Multiphysics®).

Nous avons réalisé des simulations qui ont montré une homogénéité d'écoulement comme sur la Figure 2-17 qui représente le profil des vitesses dans l'une des cavités avec réseau microfluidique développé pour le microcapteur sérigraphié. Cette géométrie offre plusieurs avantages, notamment d'éviter toute zone de recirculation du liquide ainsi que toute zone morte pouvant ralentir ou empêcher les interactions au niveau du capteur.

La vitesse d'écoulement moyenne est de l'ordre de $10^{-3}\ m.s^{-1}$, pour une hauteur du canal de ~ 100 μm, et un débit imposé de 25 $\mu L/min$. Les solutions de polyélectrolytes qui seront utilisées pour la réalisation d'une matrice d'immobilisation des bactéries sur le capteur, sont modélisées par un fluide de masse volumique égale à celle de l'eau (1g/cm³).

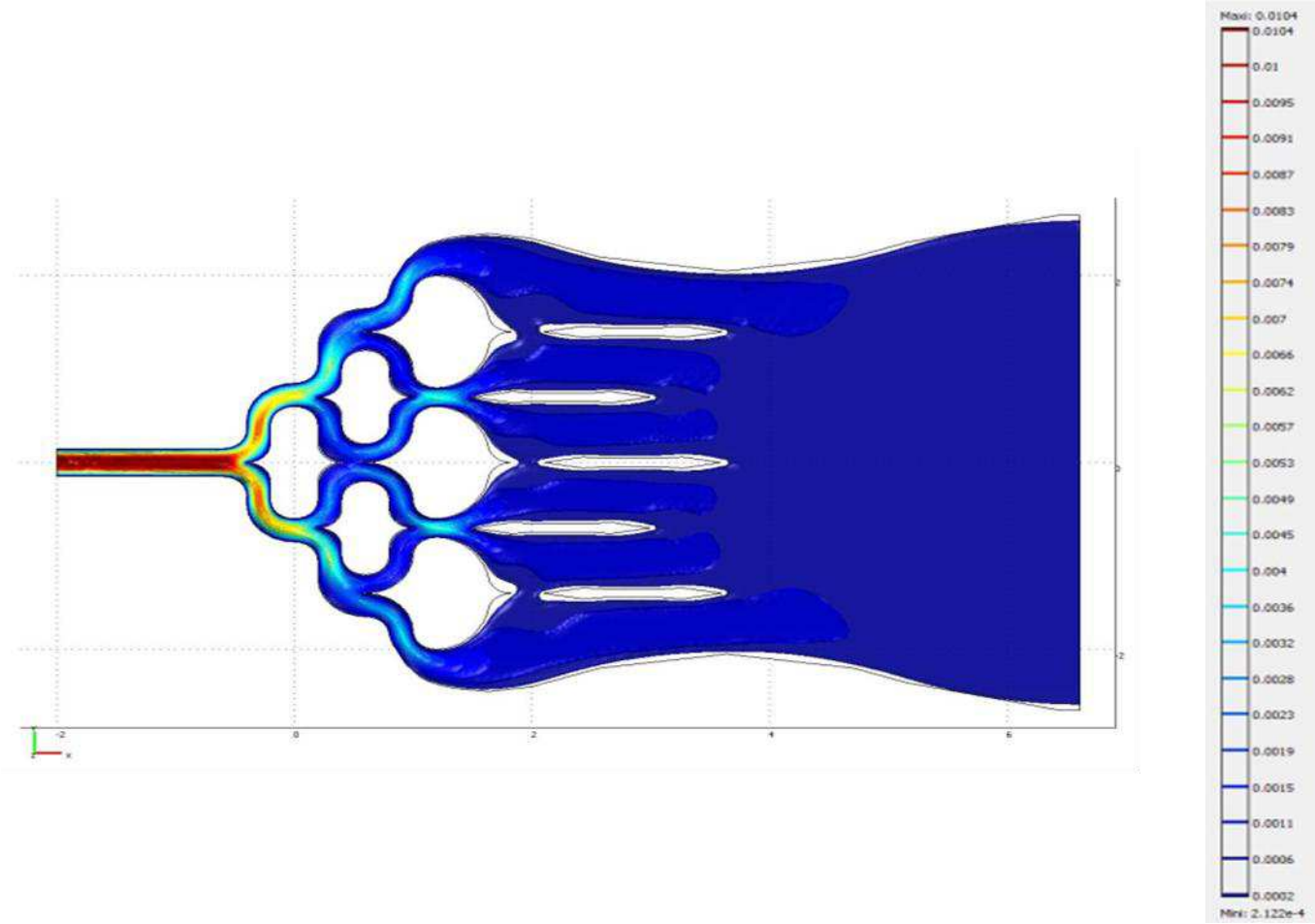


Figure 2-17 : Simulation des vitesses d'écoulements dans la cavité microfluidique (Comsol®, 2208310 mailles, ~ 3 heures de calcul).

2.4. Conclusion

Ainsi, ce chapitre a permis de présenter les deux types de plateformes de transduction mises en œuvre et en partie conçues dans le cadre de ces travaux, l'une à ondes acoustiques (ondes de Love), l'autre électrochimique (impédimétrique), chacune équipée d'une puce microfluidique. La microscopie à force atomique a été présentée comme moyen de caractérisation des surfaces de capteurs, à rapprocher d'un moyen de détection complémentaire, quoique non intégré et à ce titre non assimilable à un biocapteur.

L'une des originalités de ce travail est liée à la compatibilité des deux techniques de mesure, qui vise à pouvoir comparer les deux méthodes dans des conditions expérimentales similaires.

Notons en particulier la conception de la plateforme électrochimique, qui offre de nouvelles perspectives de développement et de miniaturisation. Le procédé développé pour la fabrication de ce microcapteur est rapide, il utilise des outils de fabrication peu coûteux, la

sérigraphie et le moulage de chambres fluidiques en PDMS, permettant d'envisager le domaine des laboratoires-sur-puces.

Des éléments sur la théorie des écoulements et des simulations ont permis de montrer l'efficacité des chambres microfluidiques retenues pour assurer un écoulement laminaire homogène des solutions en surface des capteurs.

3. Études sur les polyélectrolytes

Les films multicouches de polyélectrolytes (PEM) couche par couche ou films « Layer by Layer» (LbL) correspondent à un nouveau type de film polymérique qui a été développé au début des années 90 par Decher *et al* [104]. Cette technique LbL est fondée sur la réalisation de dépôts successifs de polycations et polyanions sur un substrat. Depuis l'utilisation de cette technique de dépôt couche par couche pour la fonctionnalisation de surface, plusieurs études tentent de comprendre les comportements physiques mis en jeu [105, 106, 107].

Ce chapitre est consacré à la compréhension de la structuration de multicouches alternées de polyélectrolytes. Les caractéristiques de ce type de film en termes de croissance et de structure seront appréhendées par deux méthodes complémentaires : la microscopie à force atomique (AFM) et les ondes acoustiques. Ces méthodes ont été utilisées pour la caractérisation de la croissance des films multicouches et de l'adsorption de polymères, et nous montrerons, en particulier, l'influence de quelques paramètres physico-chimiques sur les mécanismes de structuration des multicouches alternées des polyélectrolytes retenus : le poly (allylaminehydrochloride) (PAH, polycation) et poly (styrènesulfonate) (PSS, polyanion).

L'objectif de cette étude est d'améliorer la nature et la configuration du film déposé (homogénéité, épaisseur, etc.) de manière à obtenir une immobilisation de notre biorécepteur la plus efficace possible et d'augmenter par la suite la sensibilité du capteur et sa durée de vie.

Nous présenterons, au début de ce chapitre, les différents paramètres qui caractérisent un polyélectrolyte en solution dans le but de comprendre l'écoulement d'un polymère chargé dans un fluide. Nous exposerons ensuite le principe sur lequel repose le dépôt couche par couche ainsi que les interactions fortes (interactions électrostatiques) et les interactions faibles (hydrophobes) qui assurent la construction du film. Puis nous présenterons le mode de croissance des films ainsi que les différents procédés de mise en œuvre de cette technique par trempage, à la micropipette ou en flux. Les surfaces des films seront analysées morphologiquement par AFM, des courbes des forces permettant également d'appréhender les forces d'adhésion mises en jeu et le caractère viscoélastique des éléments présents. Ces propriétés de viscoélasticité et le comportement mécanique de manière plus générale seront également analysés par la réponse en temps réel du capteur à onde de Love. Ces réponses permettront de plus d'ajuster le temps nécessaire pour chaque dépôt, d'étudier l'influence du

poids moléculaire et de valider l'étape de rinçage. Enfin, et après optimisation de notre protocole de dépôt, nous présenterons l'application de ce film pour la fixation des bactéries.

3.1. Les polyélectrolytes en solution

On définit un polyélectrolyte comme un polymère possédant des groupes dissociables en solvant polaire. Il possède ainsi des charges sur ses monomères compensées par des contre-ions de charge opposée. Ces charges permettent aux polyélectrolytes en solution d'être utilisés dans de nombreux domaines grâce à leurs propriétés. Ils peuvent aussi se trouver sous la forme de complexes polymères et prendre une multitude de configurations à la surface du matériau à revêtir, selon la formulation du polymère et les paramètres extérieurs comme le pH, les solvants, la conductivité ionique, etc.

3.1.1. Les polyélectrolytes utilisés

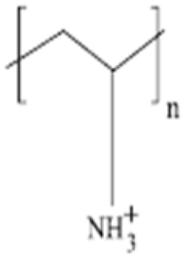
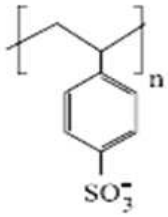
Les deux polyélectrolytes utilisés dans notre travail sont donc le poly (allylaminehydrochloride) (PAH) comme polycation et le poly (styrènesulfonate) (PSS) comme polyanion.

Le Poly (hydrochlorure d'allylamine) (PAH) est un polyélectrolyte faible chargé positivement à pH neutre grâce à son groupement amine. Pour nos travaux, deux références de masses moléculaires différentes ont été utilisées: 15 kDa et 56 kDa (voir tableau 3-1). Ces polymères se présentent sous la forme d'une poudre. Dans le cas de l'utilisation de TBS (Tris Buffered Saline, Tris: l'abréviation de tris (hydroxymethyl) aminomethane $(HOCH_2)_3CNH_2$)) comme solvant, les contre-ions sont les cations du TBS : Na^+ et H^+.

Le PSS est un polyélectrolyte fortement anionique. En effet, la chaîne latérale de chaque motif monomère porte un groupement sulfonate qui est complètement chargé à partir de pH = 3. Dans le cas d'utilisation de TBS comme solvant, le contre-ion est le Cl^-. Il est hydrophobe lorsque son squelette est en situation de mauvais solvant[5] dans l'eau. Le PSSNa (polystyrène sulfonate de sodium) partiellement sulfoné peut être considéré comme une molécule de polystyrène sur laquelle ont été greffés des groupes sulfonates de sodium.

[5] Mauvais solvant : les interactions effectives entre maillons de la chaîne d'un polymère sont attractives. Le polymère est plus difficile à dissoudre. Un polymère peut se trouver en mauvais solvant mais rester dispersé si la solution est suffisamment diluée.

Tableau 3-1: Carte d'identité des polyélectrolytes utilisés.

Nom du composé	PAH: poly (allylamine hydrochlorure)	PSS: poly (styrene sulfonate)
Formule chimique		
Fournisseur et référence	Sigma Aldrich C.A.S : 71550-12-4	Sigma Aldrich C.A.S : 25704-18-1
Poids moléculaire	*15 000 *56 000	70 000

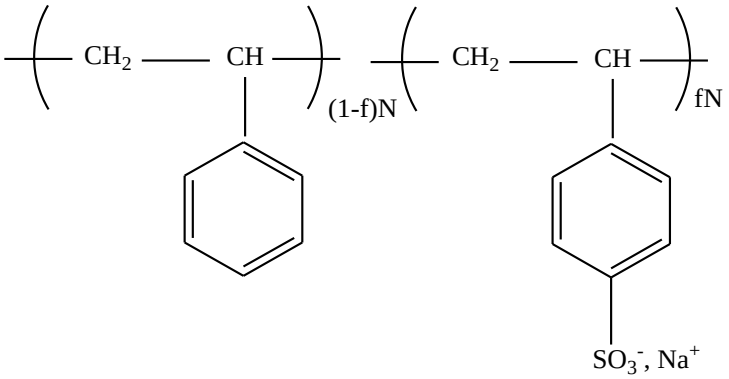


Figure 3-1 : Structure chimique du PSSNa partiellement sulfoné.

Le Poly (hydrochlorure d'allylamine) et le Poly (styrène sulfonate) sont utilisés sans purification supplémentaire. Ils sont utilisés à des concentrations de 5 mg/ml en solution dans le TBS à 0,15 mol/l et pH = 7,2, excepté pour voir l'effet de la force ionique sur la formation de films multicouches, où une solution de NaCl à 0,15 mol/l a été utilisée après optimisation à différentes concentrations. Le pH des solutions a été ajusté avec des solutions d'acide chlorhydrique et de soude pour observer l'effet du pH sur la construction du film.

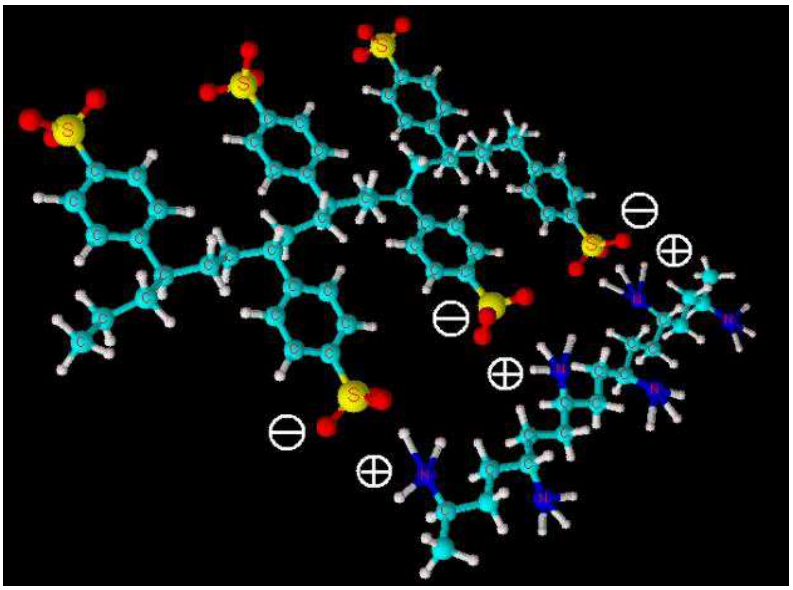


Figure 3-2 : Représentation de l'assemblage par interaction entre deux chaînes de polyélectrolytes.

3.1.2. Les principaux paramètres

Les polyélectrolytes sont caractérisés par plusieurs paramètres mécaniques et électrostatiques que nous présentons dans ce paragraphe.

3.1.2.1. Longueurs caractéristiques et taux de charge

Un polyélectrolyte présente des grandeurs caractéristiques, notamment la taille du monomère, *a*, et la distance entre deux charges successives le long de la chaîne, *b* (Figure 3-3).

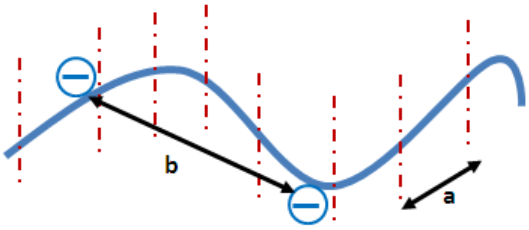


Figure 3-3: Représentation schématique d'une chaîne polyélectrolyte.

Le paramètre *f* appelé taux de charge correspond au rapport entre la taille du monomère, *a*, et la distance entre deux charges successives le long de la chaîne, *b* :

$$f = b / a \qquad (3\text{-}1)$$

La conformation de chaîne de polyélectrolytes sera directement dépendante de ce paramètre. Il est à pondérer par la condensation de contre-ions.

Si on considère que le polyélectrolyte PSS (polyanion fort, a = 0,25 nm) a une charge sur chaque monomère, son taux de charge f serait égal à 1, alors que le PAH (polycation faible, a = 0,25 nm) est chargé à 40% à un pH de 9 correspondant à b = 0,1 nm et un taux de charge f=0,4.

De plus, chaque chaîne est constituée d'un nombre de monomère $N = M_W / M_i$ (M_i : masse d'un monomère) soit 214 monomères pour le PSS (M_W = 70000, M_i = 223), 736 monomères pour le PAH (M_W = 56000) et 197 pour le cas d'une masse moléculaire M_W = 15000.

Cela permet d'évaluer une nouvelle dimension représentative, la longueur de contour ($L_C = N*b$), égale à :

L_C (PSS: M_W = 70000) = 53,5 nm,

L_C (PAH[1]: M_W = 56000) = 73,6 nm,

L_C (PAH[2]: M_W = 15000) = 19,7 nm.

3.1.2.2. Longueur de Bjerrum

Le taux de charge proposé par Manning [108] fait intervenir la longueur de Bjerrum, distance à laquelle l'énergie d'interaction entre deux charges élémentaires vaut l'énergie d'agitation thermique k_BT. Elle caractérise l'intensité des interactions électrostatiques dans le solvant et elle est donnée par l'expression :

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_r\varepsilon_0 k_B T} \qquad (3\text{-}2)$$

Où e est la charge électronique, ε_r et ε_0 représentent respectivement la constante diélectrique relative du milieu et celle du vide. Pour l'eau, à température ambiante T = 300 K, la longueur de Bjerrum l_B est égale à 0,712 nm. Cette longueur varie assez peu avec la température, dans une gamme de quelques dizaines de degrés autour de 300 K. Pour des distances supérieures à l_B, l'énergie électrique devient négligeable devant l'énergie d'agitation thermique k_BT.

On définit le seuil de condensation de Manning par :

$$F_{Manning} = a / l_B \qquad (3\text{-}3)$$

Avec une taille de monomère a = 0,25 nm pour le PSS et le PAH, en considérant que le solvant de type eau à température ambiante, l'expression précédente permet d'évaluer une valeur de seuil de condensation de Manning pour les deux polyélectrolytes (PSS et PAH) égale à 0,351.

3.1.2.3. Paramètre de charge

Manning définit également le paramètre de charge ξ comme le rapport entre la longueur de Bjerrum, l_B, et la distance entre deux sites ioniques successifs le long de la chaîne, b.

$$\xi = \frac{l_B}{b} = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r b k_B T} \qquad (3\text{-}4)$$

Lorsque le paramètre de charge ξ est supérieur à une valeur seuil égale à 1 (cas d'une solution diluée de polyélectrolytes), une partie des contre-ions restera proche du polyion, et va être totalement liée à celui-ci (bloquée à une distance finie). Il s'agit d'effets dits « de condensation » [109, 110, 111].

Le calcul de ce paramètre de charge pour les polyélectrolytes PSS et PAH dans l'eau donne les valeurs $\xi(PSS) = 11{,}39$ et $\xi(PSS) = 7{,}13$, dans les deux cas ξ est supérieur à 1, on est donc dans un régime dilué et les chaînes de polyélectrolytes sont flexibles.

3.1.2.4. Ecrantage des interactions électrostatiques

L'écrantage électrostatique est une notion importante des systèmes chargés de type polyélectrolytes, associé à la présence des ions libres en solution. Si les contre-ions sont situés près des chaînes ou si un sel est ajouté dans la solution, la chaîne perd son caractère rigide à grande échelle. La longueur d'écran K_{HD}^{-1} correspondant à l'échelle sensible à l'écrantage électrostatique et appelée longueur de Debye-Hückel est définie comme suit :

$$K_{HD}^{-1} = (4\pi . l_B . I)^{-\frac{1}{2}} \qquad (3\text{-}5)$$

La longueur de Debye-Hückel est reliée à la concentration I des contre-ions c'est-à-dire à la force ionique de la solution, définie comme la demi-somme des concentrations en ions présents en solution pondérées par leur charge au carré :

$$I = 1/2 \sum C_i Z_i^2 \qquad (3\text{-}6)$$

Elle dépend de l'ensemble des ions libres de la solution et donc de la concentration en contre-ions dissociés et en sel ajouté. Il convient de souligner que l'ajout de sel à la solution de polyélectrolyte a pour effet d'accroître la force ionique.

Nous avons utilisé pour la préparation des solutions de polyélectrolytes une solution tampon TBS (Tris Buffered Saline) qui possède deux ions, les deux contre-ions présents sont le Na^+ et Cl^- de NaCl à une concentration de 0,15 M, soit une force ionique I = 0,15 M. Dans ce cas, la longueur d'écrantage électrostatique est égale à : $K_{HD}^{-1} = \frac{0{,}304}{\sqrt{I(M)}} = 24{,}821\,\text{nm}$.

3.1.2.5. Rayon de giration

Le rayon de giration R_G est une mesure de la distribution de masse de polymère autour de son centre de gravité. Dans le cas des polyélectrolytes, les effets de volume exclu[6] prennent également en compte les répulsions électrostatiques. On définit ainsi, un facteur d'expansion électrostatique $\alpha_{s,el}^2$ qui peut être calculé à partir des relations décrites par Yamakawa-Tanaka **[112],** Odijk et Houwaart **[113]** et Fixman et Skolnick **[114].** Dans le cas des polyélectrolytes:

$$\left\langle R_G^2 \right\rangle = \alpha_{s,el}^2 \left\langle R_G^2 \right\rangle_0 \qquad (3\text{- }7)$$

Yamakawa [115] a estimé que le rayon de giration R_G à une concentration de 0,1 M de NaCl, dépend de la masse moléculaire selon l'expression R_G= 0,0216 $M_W^{0,60}$, ce qui donne :

R_G (PSS: M_W = 70000) = 17,44 nm,

R_G (PAH[1]: M_W = 56000) = 15,25 nm,

R_G (PAH[2]: M_W = 15000) = 6,92 nm.

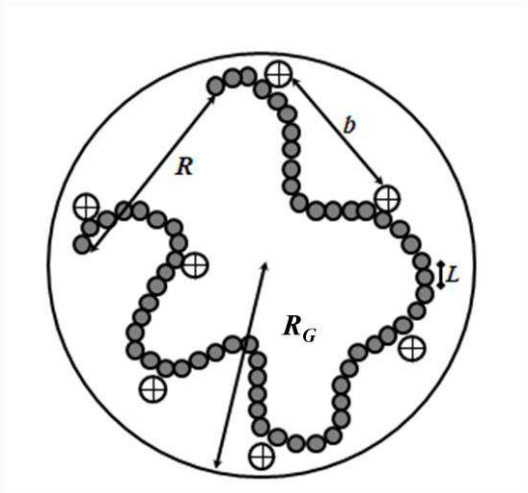


Figure 3-4 : Longueurs caractéristiques d'une chaîne de polyélectrolytes (d'après Spiteri, 1997) avec R : longueur moyenne entre les extrémités, R_G : rayon de giration ; L : taille d'un monomère, b : distance moyenne entre deux sites ioniques consécutifs.

La chaîne adopte une conformation moyenne appelée « pelote[7] » caractérisée par la distance :

[6] Une chaîne est à « volume exclu » lorsque les interactions répulsives entre maillons d'une même chaîne dominent, la conformation de la chaîne s'en trouve « gonflée » par rapport à sa conformation idéale.

[7] La pelote est un objet statistique ayant des fluctuations incessantes de sa configuration à l'équilibre. Sa dynamique de relaxation est dominée par son élasticité et la friction exercée par le solvant environnant

$$R_0 \equiv \sqrt{\left\langle R^2 \right\rangle_0} = bN^{\frac{1}{2}} \qquad (3\text{- }8)$$

La distribution de masse moyenne de la pelote est caractérisée par son rayon de giration, rayon de la sphère de même moment d'inertie que le polymère. Pour une pelote idéale il s'écrit :

$$R_G = \frac{R_0}{\sqrt{6}} = \frac{b}{\sqrt{6}} N^{\frac{1}{2}} \qquad (3\text{- }9)$$

3.1.2.6. Viscosité

La viscosité peut être évaluée à partir de R_G, l'équation (2-18) a été reprise par Fox et Flory **[116].** Ils ont introduit un paramètre appelé coefficient d'expansion moléculaire, noté ϕ', qui prend en compte les dimensions géométriques. On peut résumer la théorie de Fox et Flory par l'expression de ce coefficient, tel que :

$$[\eta] = \phi' \frac{R_G^3}{M} \qquad (3\text{-}10)$$

Où R_G est le rayon de giration exprimé en mètre et ϕ' est la constante de Flory qui vaut théoriquement $2{,}86 \cdot 10^{23}$ mol^{-1} dans le cas d'un polyélectrolyte.

D'après la relation (3-10) et avec le rayon de giration R_G calculé précédemment, nous pouvons évaluer les valeurs théoriques de viscosité de nos solutions de polyélectrolytes :

η(PSS) = $1{,}12\times10^{-3}$ kg.m^{-1}.s^{-1}

η(PAH^1) = $1{,}19\times10^{-3}$ kg.m^{-1}.s^{-1}

η(PAH^2) = $1{,}08\times10^{-3}$ kg.m^{-1}.s^{-1}

Ces viscosités ont également été mesurées expérimentalement, à l'aide d'un viscomètre à capillaire de type Ostwald. L'écoulement dans ce cas est de type Poiseuille, le liquide s'écoule entre deux parois fixes avec un régime qui doit être laminaire. La viscosité η du liquide est proportionnelle à la durée de vidange t du volume V de liquide compris entre deux repères et à la masse volumique du liquide exprimé en g.cm^{-3} : $\eta = k.\rho.t$. k est une constante propre au viscosimètre, égale ici à 0,02 unités SI. Les valeurs sont reportées dans le tableau 3-2Tableau3- 1.

Tableau 3-2 : Masse volumique et viscosité mesurées expérimentalement des polyélectrolytes utilisés.

Polyélectrolyte	Masse volumique ρ (g.cm^{-3})	Viscosité (kg.m^{-1}. s^{-1})
PSS	0,97 ± 0.02	0,86.10^{-3}
PAH[1]	0,96 ± 0.02	1,02.10^{-3}
PAH[2]	0,91 ± 0.02	1,34.10^{-3}

En comparant les valeurs théoriques et expérimentales de la viscosité, on constate que, quoi que non identiques, elles sont du même ordre de grandeur.

3.1.2.7. Coefficient de diffusion

Le coefficient de diffusion du centre de gravité de la pelote est relié à sa mobilité par la relation d'Einstein : $D = \mu.k_B.T$. La mobilité μ est définie comme le rapport entre la vitesse atteinte par la pelote en solution et la force F appliquée. Elle nous renseigne sur l'interaction entre le polymère et le solvant. Pour coupler hydrodynamiquement le polymère au solvant, à chaque sous-unité de la chaîne est associé un centre de traînée visqueuse, par exemple une sphère dont la traînée de Stokes est équivalente à celle de la sous-unité décrite, avec une dynamique sur-amortie (l'inertie est négligeable à ces échelles).

En utilisant l'équation de Stockes (2-15) et en faisant l'hypothèse que le polymère se comporte comme une particule sphérique de rayon R_G. le coefficient de diffusion peut être calculé à partir de l'équation de Stockes-Einstein :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_G} \tag{3-11}$$

Avec k_B la constante de Boltzmann (1,38.10^{23} J.K^{-1}), R_G le rayon de giration (m), η la viscosité absolue de la solution (kg.m^{-1}.s^{-1}) et T la température absolue (K).

Le coefficient de diffusion D dépend de la taille des molécules, en effet les plus petites diffusent plus rapidement vers la surface et l'atteignent en premier **[117].** Il dépend aussi des conditions hydrodynamiques expérimentales.

3.1.2.8. Détermination du nombre de Reynolds

La relation **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) qui relie la vitesse et la longueur ypique de l'écoulement à la viscosité du fluide, dans notre cas les polyélectrolytes, nous permet de déterminer le nombre de Reynolds R_e qui caractérise un écoulement et nous permet

de définir la nature de son régime (laminaire, transitoire ou turbulent). Dans notre cas la longueur typique d'écoulement L est de l'ordre de 100 µm et la vitesse d'écoulement V varie de ~8.10^{-3} m.s^{-1} à 20.10^{-3} m.s^{-1}. Nous obtenons alors :

$R_e(PSS)$ varie entre 1,14 et 2,87 environ,

$R_e(PAH^1)$ varie entre 1,13 et 2,83 environ,

$R_e(PAH^2)$ varie entre 0,89 et 2,02 environ.

Tableau 3-3 : Récapitulatif des paramètres des polyélectrolytes utilisés.

Paramètres / Polyélectrolytes		Taux de charge f	Condensation de Manning $F_{Manning}$	Rayon de giration R_G (nm)	Viscosité η (kg.m^{-1}.s^{-1})	Nombre de Reynolds
PAH	PAH^1	0,4	0,351	15,25	1,19×10^{-3}	1,1 - 2,8
	PAH^2			6,92	1,08×10^{-3}	0,9 - 2,0
PSS		1	0,351	17,44	1,12×10^{-3}	1,1 - 2,9

Ces valeurs montrent notamment que l'écoulement est en régime laminaire quel que soit le fluide considéré : eau, TBS, polyélectrolytes. Ces paramètres interviendront également dans le comportement des polymères lors des dépôts sur le capteur en fonction des paramètres physiquo-chimiques des solutions de dépôt (pH, température, concentration).

3.1.3. Polyélectrolytes en écoulement

Contrairement aux cas des polymères neutres, la compréhension complète des propriétés des polyélectrolytes en solution n'est pas encore acquise malgré de nombreuses études, à la fois théoriques et expérimentales. Il existe encore plusieurs zones sombres dans les aspects fondamentaux du comportement de ces systèmes.

L'ensemble des propriétés physico-chimiques de la macromolécule est affecté par la présence des charges : polyions, contre-ions et électrolyte (sel ajouté). Les charges dissociées dans une solution sont à l'origine des interactions électrostatiques inter et intra-chaîne. Ces interactions sont de longue portée et très fortes par rapport aux interactions de type Van der Waals.

La combinaison des propriétés macromoléculaires (propriétés d'une chaîne de polymère neutre) et des effets des interactions électrostatiques conduit à une variété impressionnante de phénomènes tels que la condensation des contre-ions sur la chaîne, la distribution de ces contre-ions, l'écrantage mutuel des charges entre chaînes, le phénomène de couplage entre les ions, etc. Tous ces effets ne peuvent être traités séparément, ce qui rend complexe l'étude

théorique des polyélectrolytes en solution. Ces différents paramètres vont nous permettre d'appréhender le comportement de ces solutions de polyélectrolytes en écoulement sur la surface des capteurs.

3.1.3.1. Différents régimes de concentration de deux polyélectrolytes flexibles PAH et PSS

La configuration d'une chaîne en écoulement résulte d'un équilibre entre les forces électrostatiques favorables à l'élongation (minimisation des interactions entre monomères) et les forces élastiques qui s'opposent aux précédentes (maximisation de l'entropie de configuration). Deux régimes peuvent être distingués. En régime dilué, chaque polyélectrolyte peut être représenté comme une chaîne de blobs électrostatiques de taille δ à l'intérieur desquels la chaîne se comporte comme un polymère neutre. La frontière séparant le régime dilué et le régime semi-dilué est appelée concentration de recouvrement c^*. Elle correspond au seuil d'enchevêtrement où les chaînes peuvent être en contact et interpénétrées de manière significative. La valeur de c^* correspond au nombre de chaînes N par unité de volume de ces N chaînes. Ainsi, on considère que cette valeur frontière est obtenue lorsque l'ensemble du volume V est rempli de N chaînes occupant chacune une sphère de rayon R_G, ce qui permet d'établir l'expression suivante :

$$c^* = \frac{N}{V(N)} = \frac{1}{\frac{4}{3}\pi R_G^3} \qquad (3\text{-}12)$$

Une longueur de corrélation ξ' est également introduite [118]. Elle définit la distance caractéristique à partir de laquelle les répulsions intra-chaînes sont écrantées. En dessous de cette échelle, les forces électrostatiques sont dominantes et les chaînes conservent la même configuration de bâtonnets de blobs qu'en régime dilué. Au-dessus de cette échelle, ni les forces électrostatiques ni celles du volume exclu n'interviennent, le polyélectrolyte est représenté par une chaîne idéale de blobs de taille ξ'.

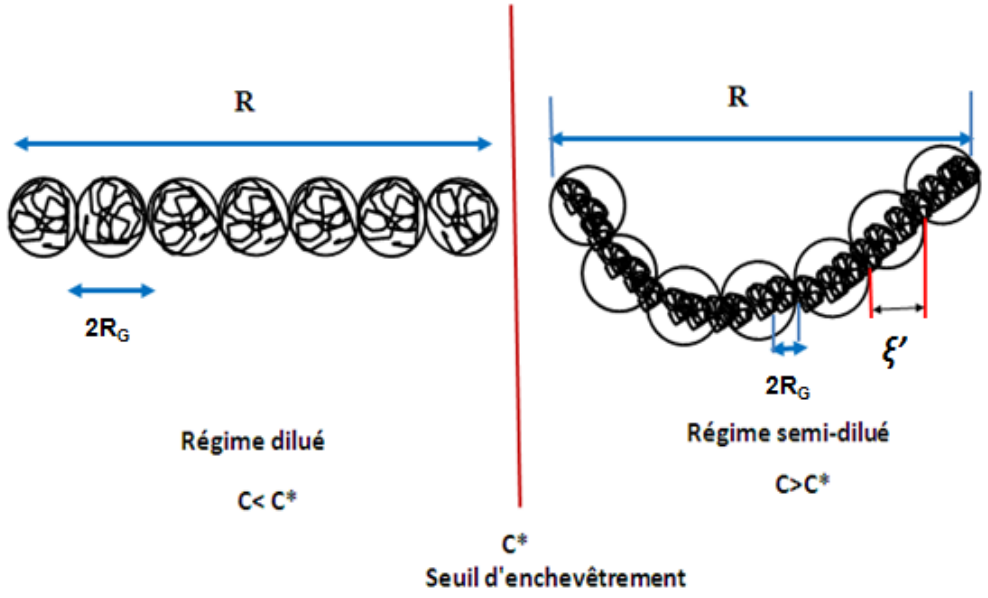


Figure 3-5 : Configuration de polyélectrolytes flexibles selon leur concentration.

La distance entre extrémités de la chaîne *R* résulte de la distribution aléatoire des *N/g* blobs de taille ξ', avec $R = \xi'.(N/g)^{1/2}$ où g est le nombre de monomères dans un blob. C'est le cas d'une chaîne idéale dite en solvant θ[8].

3.1.3.2. Déformation d'une chaîne isolée sous écoulement

Un paramètre essentiel pour comprendre l'écoulement de polymères est le temps de relaxation de la chaîne. Une chaîne isolée soumise à un écoulement va avoir tendance à s'étirer étant donnés les frottements visqueux exercés par le solvant de viscosité η_s. Cet étirement visqueux sera limité par la tendance entropique de la chaîne à retrouver son aspect de pelote statistique. Le modèle de Rouse consiste à ne prendre en compte que ces deux contributions, c'est-à-dire considérer le frottement visqueux comme s'appliquant sur chaque monomère. La chaîne flexible est considérée comme constituée par une suite de « grains » reliés par des ressorts, immergée dans un solvant de viscosité η_s. Les détails des calculs des expressions finales suivantes du temps de relaxation sont présentés dans [119].

[8]En solution suffisamment diluée, les chaînes sont bien séparées les unes des autres. La conformation d'une chaîne ne dépend alors que du bilan des interactions effectives entre ses propres maillons. En solvant θ, la conformation est idéale (υ=1/2), en bon solvant elle est gonflée (υ=3/5) et en mauvais solvant elle est globulaire (υ=1/3).

En régime dilué, les résultats de Rouse ne sont pas en accord avec les expériences, d'où l'introduction du modèle de Zimm [120] qui prend en compte à la fois les interactions de volume exclu et les interactions hydrodynamiques entre monomères de manière simplifiée. Ce qui permet de définir un temps de relaxation de Zimm :

$$\tau_{Zimm} = \frac{\eta_s R_G}{K_B T} \tag{3-13}$$

3.2. Différentes méthodes de dépôts de PE et résultats expérimentaux

3.2.1. Films multicouches

3.2.1.1. Les différents types d'interaction

Comme pour les polyélectrolytes en solution et en écoulement, lors de la construction des films multicouches sur une surface, plusieurs types d'interactions sont mis en jeu entre les espèces anioniques et cationiques, combinées avec d'autres types d'interactions qui ont également une influence sur l'épaisseur et la morphologie finale **[121]** : les liaisons hydrophobes et les liaisons hydrogènes. La nature et la répartition de ces interactions dépendent de la nature des polyélectrolytes utilisés et des propriétés physico-chimiques et morphologiques des films multicouches.

Une étude par onde de Love et par AFM a été menée pour comprendre le rôle des interactions électrostatiques et de leurs combinaisons avec d'autres types d'interactions lors du dépôt des films.

d. Interactions électrostatiques

L'existence de charges électrostatiques le long de la chaîne macromoléculaire induit des interactions électrostatiques fortes et de longue distance qui s'ajoutent aux interactions à moyenne et à courte distance. Ces effets électriques peuvent être annulés par écrantage dans une solution contenant des ions (sel, électrolyte).

On peut recenser plusieurs types d'interactions électrostatiques en compétition : interaction entre les monomères d'un polyélectrolyte, interaction entre polyélectrolytes et contre –ions, interaction entre polyélectrolytes et co-ions.

L'énergie potentielle entre deux ions est calculée par l'équation suivante :

$$F = \frac{z_1 z_2 e^2}{4\pi\varepsilon_0 r} \tag{3-14}$$

Avec :

e : la charge élémentaire ($1{,}60218.10^{-19}$C)

ε_0 : la constante diélectrique du vide ($8{,}85419.10^{-12}$ $C^2.J^{-1}.M^{-1}$)

ε_r : la constante diélectrique relative (sans unité)

Z : la valence des ions.

e. Interactions hydrophobes

Plusieurs études, dont celles menées par Wang *et al* **[122],** ont montré la possibilité de construire des films multicouches en alternant des polymères neutres qui interagissent par des liaisons hydrogènes. A faible pH la stabilité du film est assurée par des liaisons hydrogènes, puis par les interactions électrostatiques lorsque le pH augmente. Les polyélectrolytes hydrophobes peuvent former des films stables **[123]**.

3.2.1.2. Principe de la technique LbL

La technique LbL permet la construction de films de multicouches de polyélectrolytes par adsorptions successives de polyélectrolytes alternativement chargés positivement ou négativement. Cette technique constitue à elle seule, un secteur de recherche très convoité par sa simplicité et ses applications diverses. La technique LbL est un outil puissant pour la fonctionnalisation de surface (or, ITO, silice, nanoparticules, etc.). Ces multicouches sont très stables et se fixent sans agitation ni ultrason. Le rendement moyen après chaque cycle d'adsorption est très élevé (95-98%) ce qui autorise l'adsorption d'un grand nombre de couches avec un taux d'agrégation réduit au minimum [122].

Le dépôt couche par couche peut être appliqué à de nombreux polyélectrolytes, comme le poly (styrènesulfonate) (PSS) ou le poly (allylaminehydrochloride) (PAH) utilisés au cours de ces travaux. Le film formé par ces deux polyélectrolytes permet de fixer rapidement et aisément les cellules eucaryotes ou procaryotes.

L'épaisseur de dépôt varie typiquement de 0,5 à 5 nm et dépend de la surface et de la composition de la solution contenant le polyélectrolyte. Lorsque la surface tend vers la neutralité, le phénomène de dépôt du polyélectrolyte s'arrête naturellement.

Il existe de nombreuses interactions dans le système du fait que ces polymères sont chargés. En effet, comme présenté en première partie du chapitre, en plus des interactions classiques de polymère à courte portée telles les interactions de volume exclu ou de Van der

Waals, s'ajoutent des interactions à plus longue portée, les interactions électrostatiques. Celles-ci peuvent, en outre, être partiellement écrantées par la présence d'ions en solution ou par les chaînes elles-mêmes lorsqu'elles sont en concentration assez élevée.

3.2.2. Dépôt en cellule hydrostatique et suivi en temps réel par ondes de Love

3.2.2.1. Protocole de dépôt

Les premiers essais de dépôt de films PE avec suivi en temps réel par capteur à ondes de Love ont été réalisés en cellule ouverte, à la micropipette ou configuration hydrostatique.

Pour les mesures effectuées avec le protocole statique, les volumes utilisés sont de 250µL par cavité. La température a été contrôlée à l'aide d'un bac à sable thermostaté ou d'un système de régulation intégré (résistance chauffante sérigraphiée sur plaque d'alumine et résistance Pt100 intégrée dans la puce de PDMS pour la mesure de température).

Le protocole a consisté à remplir chaque cavité à la micropipette avec 250µl d'une solution de référence de TBS (voir annexe 3) pour constituer la ligne de base du dispositif. La solution tampon TBS constitue un milieu physiologique pour les bactéries qui seront déposées par la suite.

Après stabilisation du signal, la chambre d'analyse est vidée de 240µL (10 µL restent pour limiter la perturbation du capteur et conserver la ligne de base) puis de nouveau complétée avec 240µL de la solution test (solution de polyélectrolytes). Le protocole simplifié de dépôt est présenté sur la Figure 3-6. Comme le substrat de silice présente une surface électronégative à pH de 7,2 ou 9 alors le premier dépôt est le cation (PAH). De même, en prévision de l'immobilisation des bactéries dont l'enveloppe présente une charge globalement négative, la dernière couche déposée sera aussi le cation (PAH).

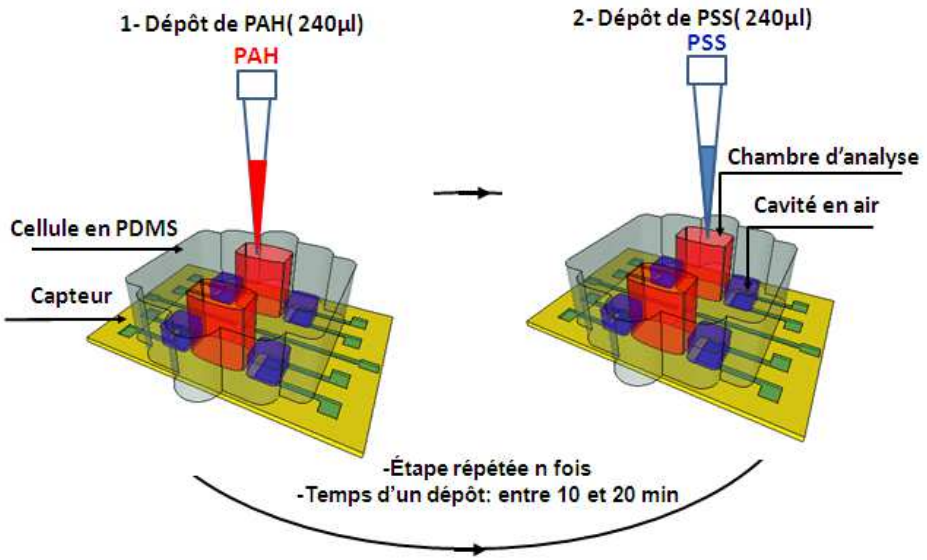


Figure 3-6 : Procédure hydrostatique suivie pour le dépôt des multicouches de polyélectrolytes.

3.2.2.2. Réponse acoustique aux multicouches de PE

La caractérisation en temps réel du dépôt de multicouches de PE repose sur la modification de la vitesse de phase des ondes acoustiques (et donc de la fréquence d'oscillation), en raison de la perturbation de la surface induite par le dépôt. Dans le cas d'une onde de Love, le confinement des ondes à la surface favorise la sensibilité aux variations mécaniques à l'interface (effets gravimétriques et viscoélastiques), avec une limite de détection rapportée à moins de 20 pg/mm^2 [124], de sorte que de tels dispositifs pourraient être qualifiés de « nanobalance », voire « picobalance », par rapport à la microbalance à Quartz (QCM) commercialisée.

La fréquence de résonance dans notre dispositif expérimental est de l'ordre de 116 MHz. En théorie, le changement de fréquence peut être directement relié à la masse déposée. Cependant cette relation s'applique sur des films fins et rigides, dans notre cas nous nous limiterons à une présentation comparative et qualitative des données.

Un exemple typique de réponse est représenté sur la Figure 3-7-a. Cette présentation de la cinétique d'adsorption nous a montré qu'au-delà de 10 minutes de dépôt, la variation de fréquence ne varie plus c'est-à-dire qu'il n'y a plus d'adsorption de polyélectrolytes. Nous avons ainsi décidé de fixer par la suite la durée d'adsorption d'une couche à 10 min au lieu de 20 min classiquement utilisé auparavant. De plus, des essais préalables avec des étapes de rinçage en fin de dépôt de chaque couche, non représentés ici, n'étaient pas nécessaires dans ce ca de dépôt en statique [75].

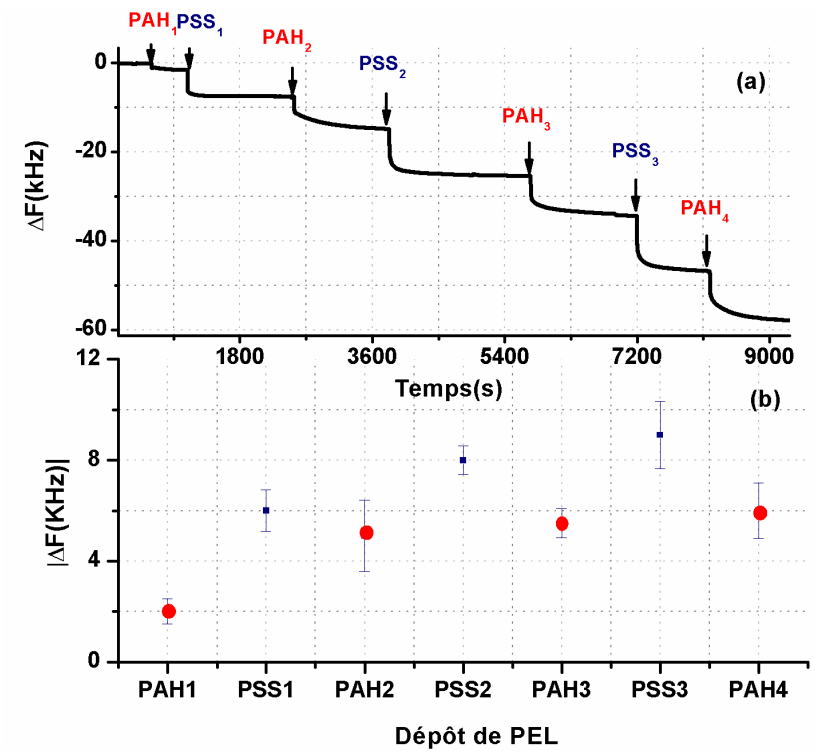


Figure 3-7 : Variation de fréquence du capteur au dépôt de films multicouches de PEM ; a) Exemple typique de réponse en temps réel; b) Variation de fréquence en régime permanent due au dépôt de chaque couche et mise en évidence de la reproductibilité des résultats (calculé à partir de la valeur moyenne de 4 mesures différentes sur 3 capteurs différents (cercles: PAH, carré: PSS).

La variation de fréquence en régime permanent due au dépôt de chaque couche, obtenue pour plus de 5 mesures avec des capteurs distincts, est présentée sur la Figure 3-7-b. Ce graphique montre une assez bonne reproductibilité des résultats. De manière générale, les couches de PSS induisent des variations légèrement plus grandes que les couches de PAH, avec un facteur de 1,2 à 1,3 qui peut être relié aux propriétés mécaniques de chaque PE. En particulier, ce résultat est parfaitement en accord avec le rapport de 1,25 entre les poids moléculaires. De plus, la variation de fréquence est moindre après la première couche de PAH, et tend à augmenter puis se stabiliser avec le nombre de bicouches. Cet effet a été attribué à la faible attraction avec la surface de SiO_2, légèrement électronégative par rapport aux dépôts suivants sur une sous-couche de charge électrique de signe opposée. Après plusieurs dépôts, la variation de fréquence induite tend vers une valeur stable, dans la proportion des poids moléculaires réactifs de chaque PE. Cette stabilité a été vérifiée avec quelques essais de dépôt d'un plus grand nombre de couches, jusqu'à 17 couches.

Ces résultats constituent une référence, à partir de laquelle nous proposons d'explorer deux voies d'amélioration des dépôts des films de PE : d'une part l'utilisation d'une cellule hydrodynamique (3.2.3), d'autre part, l'analyse de l'influence des paramètres physico-chimiques des solutions (3.2.4).

3.2.3. Dépôt en cellule hydrodynamique et suivi en temps réel par ondes de Love

3.2.3.1. Protocole de dépôt

Afin de limiter les manipulations en cellule hydrostatique, en particulier les précautions opératoires lors de changements de liquide, et pour bénéficier des avantages inhérents aux cellules microfluidiques, des tests en hydrodynamique ont ensuite été réalisés. Rappelons que ces expériences sont menées en contrôlant le débit dans la cavité microfuidique à l'aide d'un pousse-seringue aspirant le liquide de test depuis l'accès de sortie. La solution est placée dans un cône positionné sur l'accès d'entrée, en prenant soin de laisser quelques microlitres de liquide pour éviter toute bulle en cours d'essai. Les résultats obtenus, réponse typique au dépôt des PEM et variations de fréquence en régime permanent ont été rapportés sur la Figure 3-8.

3.2.3.2. Réponse acoustique aux multicouches de PE

La variation de fréquence en temps réel (Figure 3-8-a) montre une diminution rapide lors de l'injection de chacun des deux polyélectrolytes suivie d'un plateau signifiant que l'adsorption est terminée. L'étape de rinçage ne provoque aucune variation de fréquence et assure donc l'élimination des PE en solution sans dégradation du film formé.

Un débit optimal a été fixé à 20 µl/min, assurant ainsi le passage de 100 à 200 µL de solution de PE pendant 5 à 10 minutes.

La synthèse des résultats obtenus, sur la Figure 3-8-b, montre que, de nouveau, la variation de fréquence augmente à chaque nouvelle injection du même PE.

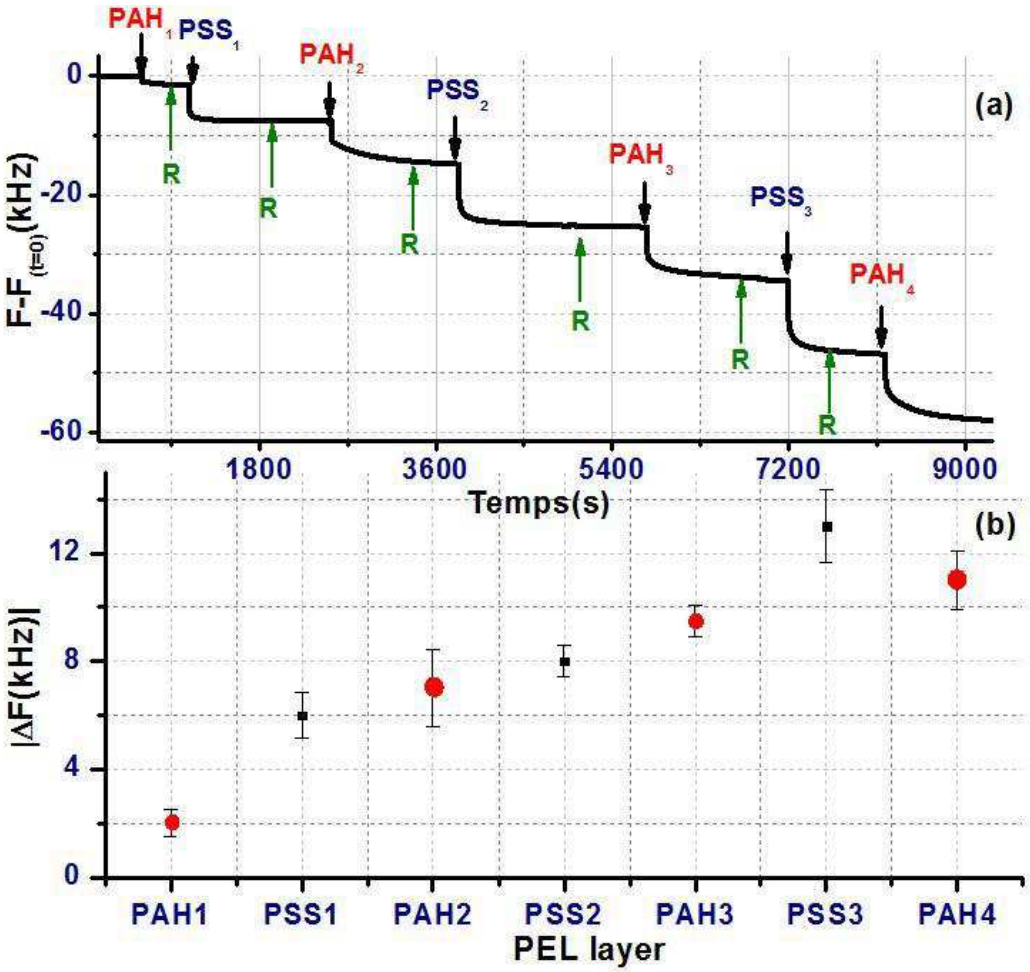


Figure 3-8: Variations typiques de fréquence en temps réel (a) et en régime permanent (b) dues aux dépôts de PEM et reproductibilité des résultats (carrés noirs: PAH, cercles rouges: PSS). Les valeurs moyennes et les barres d'erreur ont été calculées à partir de 5 expériences avec différentes lignes à retard.

Les résultats sont cependant légèrement différents de ceux obtenus en statique avec des variations de fréquence un peu moins importantes ici pour le PAH, un peu plus pour le PSS et qui semblent continuer à augmenter après 4 bicouches alors qu'elles atteignent un palier en statique. Cette dernière constatation serait cohérente avec le fait que la circulation de fluide doit favoriser l'obtention de films plus homogènes et présentant moins d'agrégats.

L'importance du nettoyage a également été vérifiée en suivant l'adsorption des couches en omettant cette étape (Figure 3-9). Il apparaît une stabilisation du film beaucoup moins rapide, et de plus en plus longue au fur et à mesure des dépôts.

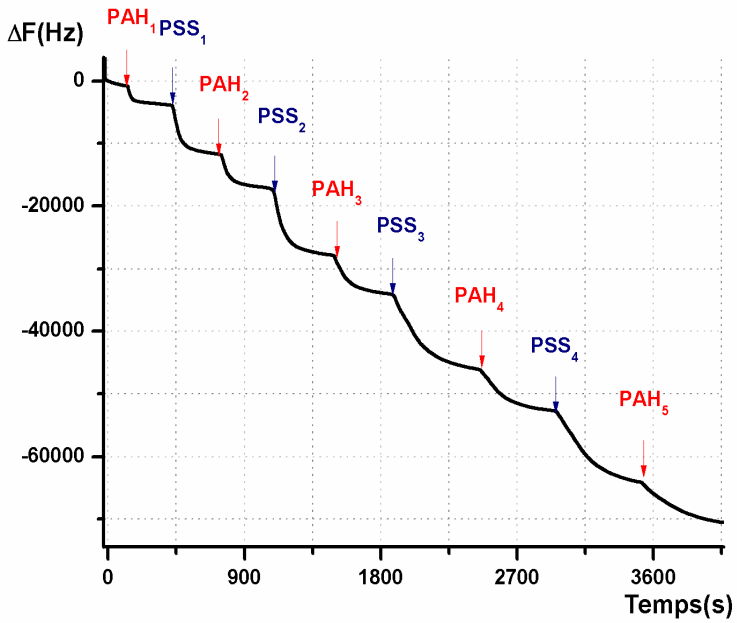


Figure 3-9 : Variations de fréquence pour un dépôt alterné de PAH/PSS sans étape de nettoyage.

Ces premiers essais ont ainsi permis la mise de point de protocoles adaptés pour le dépôt (en statique ou en dynamique) et la caractérisation par onde de Love. Nous avons souhaité approfondir cette étude et analyser l'influence de certains paramètres susceptibles de jouer un rôle important lors du dépôt des PE et en vue de l'immobilisation ultérieure de micro-organismes de reconnaissance. Ces éléments sont présentés dans le paragraphe suivant.

3.2.4. Influence de paramètres physico-chimiques sur la formation de multicouches

Plusieurs paramètres peuvent influencer les caractéristiques des films multicouches. Ainsi, la nature de la charge de surface, la force ionique des solutions, leurs pH, le nombre de couches ou la couche terminale (polyanion ou polycation) vont permettre de moduler l'épaisseur des films, la charge de surfaces ou encore leur rugosité.

Dans cette partie nous souhaitons mettre en évidence l'influence de ces paramètres, à savoir, le poids moléculaire, le pH, et la force ionique sur la formation et l'organisation des films, en mettant en œuvre les techniques de caractérisation par onde de Love et AFM décrites précédemment. Les caractérisations par onde de Love sont présentées ici. Notons qu'ils ont été réalisés avec la cellule hydrostatique pour comparaison avec les résultats de référence présentés en 3.2.2.

3.2.4.1. Effet du poids moléculaire

Rappelons que nous avons déjà noté un rapport similaire entre les variations de fréquence obtenues pour les dépôts de PAH et PSS et les poids moléculaires de ces deux polyélectrolytes (3.2.2.2). Afin de vérifier l'influence uniquement du poids moléculaire, nous avons repris ces essais en utilisant deux masses moléculaires différentes pour le PAH.

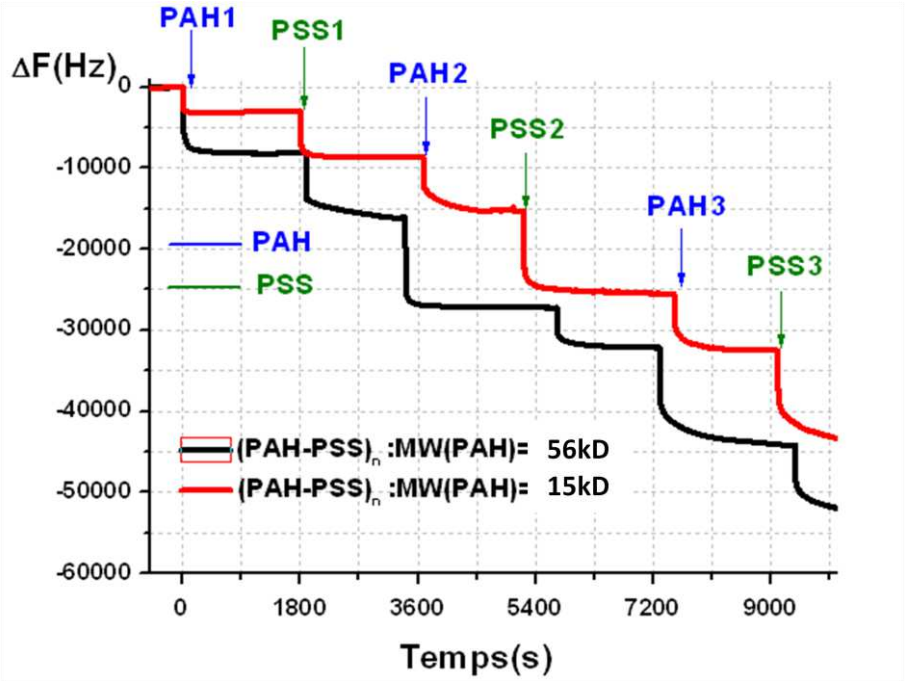


Figure 3-10 : Réponses typiques obtenues avec le capteur à onde de Love, lors des étapes de dépôt de polyélectrolytes pour deux masses moléculaires différentes du PAH (M_W=15 kDa et M_W=15 kDa).

La Figure 3-10 présente la réponse en temps réel du capteur aux dépôts successifs de PAH et PSS, pour deux valeurs de masses moléculaires du PAH, 15 kDa et 56 kDa. Il apparaît que la variation de fréquence augmente avec le poids moléculaire, quoique dans une proportion moindre (proche de 2 en moyenne) que celle du rapport des poids. Cela nous amène à la conclusion que le poids moléculaire influence de manière normale et directe l'effet de masse en surface du capteur mais joue également un rôle sur la croissance même du film multicouche. Cette étude a permis de montrer la dépendance de la croissance du film de type PAH/PSS vis-à-vis de la variation de masse des polyélectrolytes.

3.2.4.2. Effet du pH

Dans cette étude, a été un pH de 9 pour le PAH, c'est-à-dire un pH pour lequel le polycation PAH est légèrement chargé (40% de NH_3^+). Le PSS étant un polyanion fort, il est entièrement chargé négativement quel que soit le pH. Des essais à pH acide égal à 4 ont

néanmoins également été réalisés, mais des résultats similaires ont été obtenus et le pH a été conservé à 7,2 par la suite.

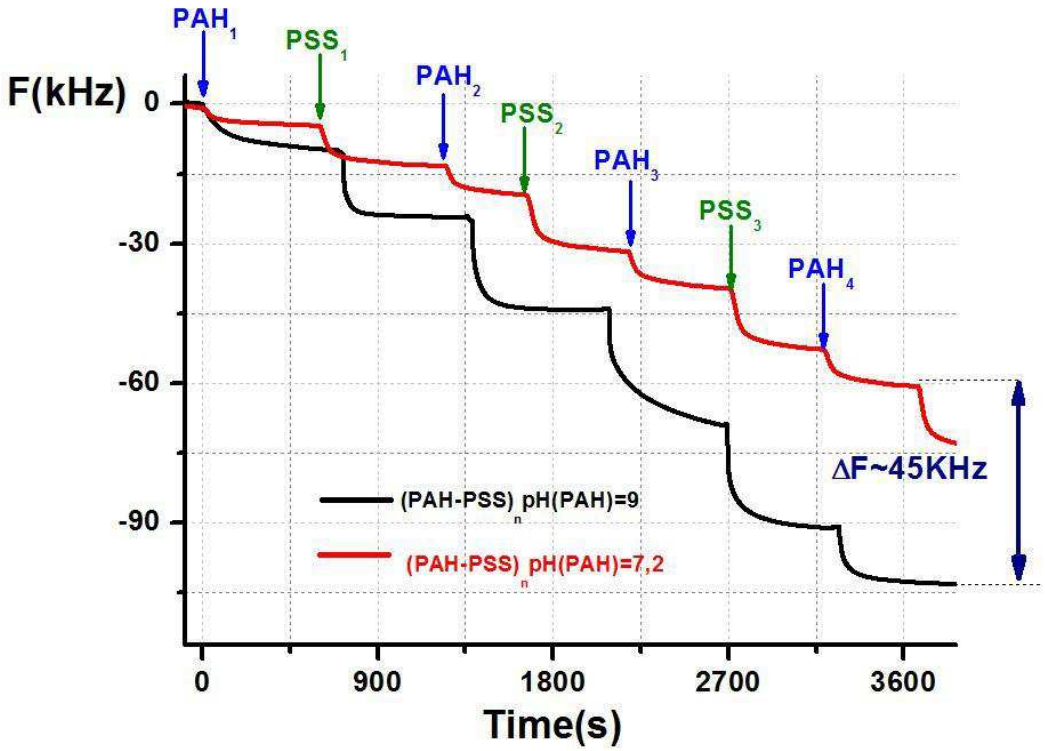


Figure 3-11 : Influence du pH sur la variation de fréquence lors des dépôts de PE (rouge : pH(PAH)=7,2, noir pH(PAH)=9).

Le changement de pH a montré une variation de fréquence importante en comparaison avec les variations pour 3 bicouches à un pH égal à 7,2, avec une augmentation de Δf proche de 40 kHz comme le montre la Figure 3-11.

3.2.4.3. Effet de la force ionique

Une étude sur la force ionique, menée en ajoutant du NaCl à différentes concentrations, a viser à déterminer la concentration optimale permettant d'obtenir des systèmes multicouches denses, homogènes, peu rugueux et sans agrégats.

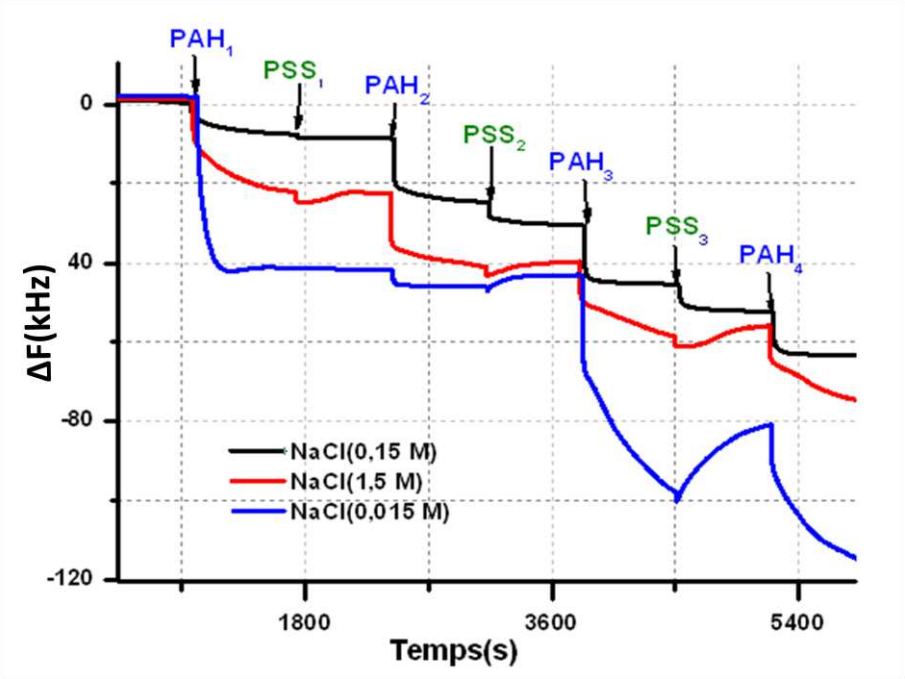


Figure 3-12 : Influence de la force ionique sur les réponses acoustiques pour trois concentrations différentes (1,5 M ; 0,15 M ; 0,015 M).

Il apparaît sur la Figure 3-12 que des réponses plus régulières sont obtenues pour des dépôts à une concentration de NaCl de 0,15 M. En effet seulement à cette concentration, on observe une diminution de fréquence suivie par un plateau après chaque dépôt de PAH ou de PSS. Pour une concentration plus grande, on a une conformation de type « c » (Figure 3-13c) qui favorise la formation des agrégats, les dépôts à une concentration de 1,5 M (Figure 3-12) montrent une variation de fréquence plus élevée mais un film irrégulier et non reproductible. Aussi, la concentration de 0,15 M a été retenue par la suite pour avoir un film suffisamment homogène et peu d'agrégats.

A une force ionique optimisée (Figure 3-13-a), il est reconnu que le système PAH/PSS croît linéairement **[125]**. Ce type de film à croissance linéaire est caractérisé par une épaisseur constante pour chaque paire de couche déposée. Les deux polyélectrolytes de charges opposées interagissent entre eux constituant ainsi la surface externe du film **[112]**. Des analyses réalisées par réflexion de RX et neutrons ont montré que ces films sont « pseudo-stratifiés », en raison de la présence de pics de Bragg en réflectivité de neutrons lorsque les polyélectrolytes sont deutérés. Il existe donc une interpénétration entre couches adjacentes, conférant au film une homogénéité de structure et de distribution de charges **[126, 127].**

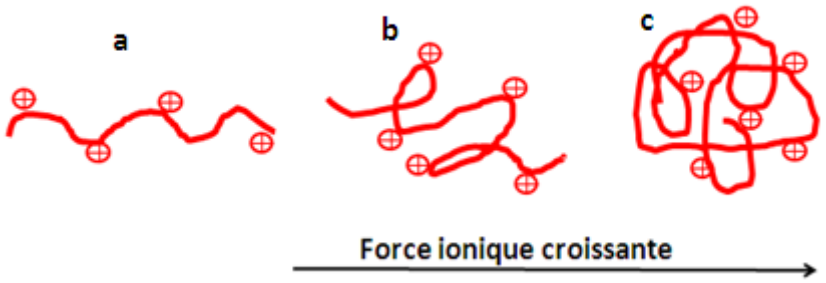


Figure 3-13 : Illustration de la conformation d'une chaîne de polyélectrolytes selon la force ionique du milieu.

Lorsque la force ionique est augmentée (Figure 3-13-b), la croissance du film devient exponentielle. Ce type de croissance appelée « super linéaire » a été attribué à l'augmentation de la rugosité du film après chaque nouveau dépôt **[104, 105]**, due en partie à la conformation des polyélectrolytes dans ce cas. Cela peut s'expliquer par un écrantage plus important des interactions répulsives entre les chaînes de polyélectrolytes qui sont ainsi réduites. Les chaînes forment alors un enchevêtrement de boucles pointant vers la solution, autorisant l'adsorption d'une plus grande quantité de polymère en milieu fortement salin.

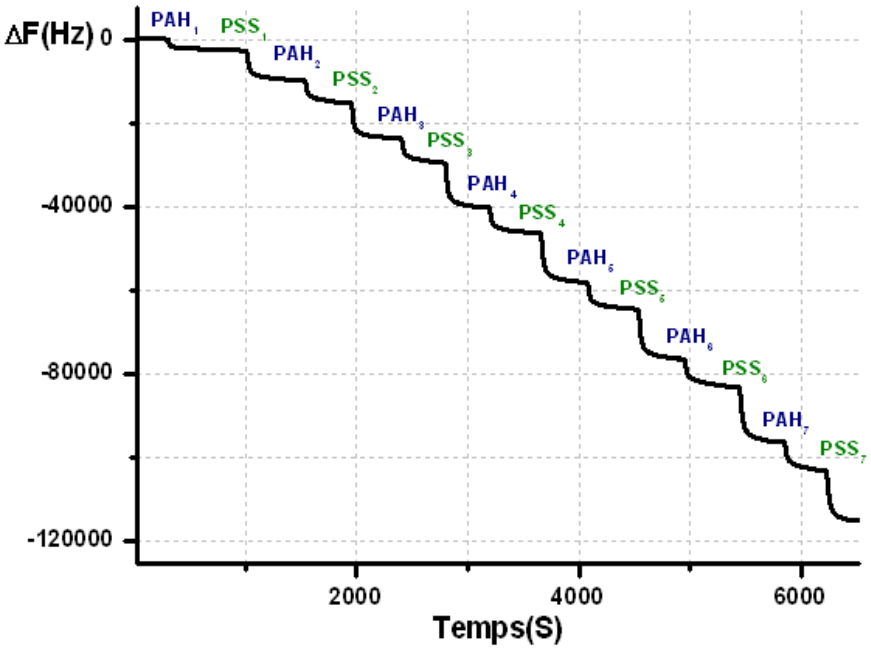


Figure 3-14 : Réponse du capteur acoustique en temps réel au dépôt de 8 bicouches de PAH/PSS (avec cellule hydrodynamique).

La Figure 3-14 reprend la réponse au dépôt de PE jusqu'à 7 bicouches de (PAH-PSS) avec protocole optimisé à concentration 0,15 M et à un pH de PAH égal à 9.

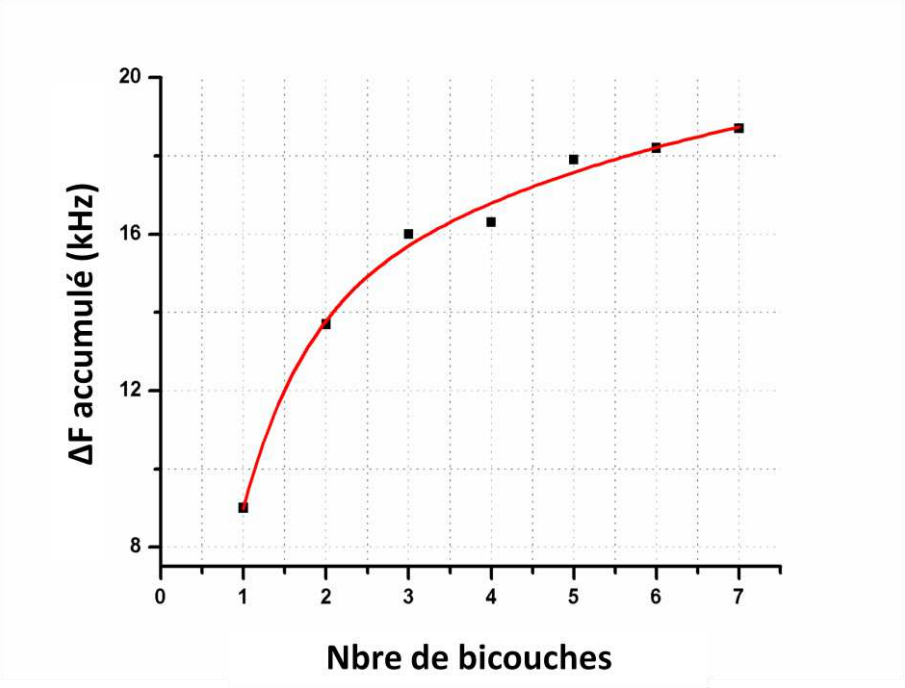


Figure 3-15 : Mode de croissance d'un film de PE à une force ionique égale à 0,15 M et jusqu'à 8 bicouches de PAH/PSS.

La Figure 3-15 synthétise la variation de fréquence cumulée, en fonction du nombre de bicouches. Cette représentation met l'accent sur le caractère exponentiel de la croissance entre 1 et 7 paires de couches à une force ionique égale à 0,15 M, de manière cohérente avec le modèle théorique dans la littérature.

3.3. Analyse de films de multicouches et de leur structure par AFM

Dans cette partie, nous présentons les résultats d'étude par l'AFM qui a permis d'approfondir notre analyse de la formation des films et d'optimiser certains paramètres des protocoles de dépôts. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'effet du pH ainsi que l'influence du rinçage entre les différentes étapes, ce qui nous a donné *a posteriori* la possibilité de s'assurer de l'homogénéité de surface, de l'efficacité des dépôts, de l'adsorption du film,. et finalement la validation de l'immobilisation des bactéries.

En effet l'AFM ne nous donne pas seulement un accès à la topographie (image de hauteur) et à la rugosité de la surface de dépôt mais on peut également remonter aux propriétés mécaniques du film (élasticité, viscosité) à travers les images tribologiques (frottement, en mode contact) ou les images de phase (charges de surface, élasticité en mode tapping). Nous exploiterons aussi des courbes de force (en contact) et courbes approche-retrait (en tapping).

3.3.1. Calibration sur capteur nu

3.3.1.1. Protocole

Pour chaque expérience d'AFM, nous procédons à une étape de calibration sur un échantillon étalon. Dans le cadre de cette étude, le biocapteur nu est notre substrat de référence qui permettra au début de chaque manipulation de calibrer la sonde et constituera l'échantillon référence à comparer aux autres échantillons. La surface sensible du capteur à onde de Love est la couche de silice présente à sa surface et c'est sur cette zone que nous effectuerons la calibration (Figure 3-16).

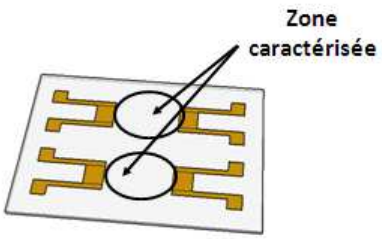


Figure 3-16 : La zone sensible caractérisée par AFM.

Avant de commencer, la surface de silice utilisée doit être extrêmement propre, pour cela nous avons adopté le protocole qui consiste à nettoyer le capteur dans un bain à ultrasons d'acétone puis d'éthanol pendant 5 minutes suivi d'un rinçage à l'eau MilliQ, puis terminé par un lavage à l'isopropanol pour éliminer les traces d'eau. Ainsi, les substrats sont prêts pour les différentes étapes de bio-fonctionnalisations et les caractérisations qui suivront.

Les différentes surfaces à étudier sont amenées au contact d'une pointe nanométrique[9] et caractérisées. Tout d'abord, au début de chaque campagne expérimentale ou pour toute nouvelle sonde, on procède à l'étape de calibration menée sur la surface de SiO_2 (ou sur une autre surface dure comme le mica par exemple), en faisant une courbe de force (mode contact) ou une courbe d'approche-retrait (mode tapping). Très souvent, quatre images différentes sont enregistrées en même temps (image de hauteur « trace et retrace », image topographique ; signal d'erreur (image d'amplitude pour le mode tapping ou image de déflexion pour le mode contact) ; image mécanique (image de phase pour le mode tapping ou

[9] Selon le mode choisi, deux pointes peuvent être utilisées : En nitrure de silicium pour le contact ou en silicium pour le tapping voir annexe pour les informations sur la taille des pointes et les raideurs des micro-leviers. La raideur du levier peut-être estimée par la méthode de bruit thermique décrit dans le paragraphe 3.3.1.

image de frottement pour le mode de déflection). En général et pour un échantillon donné, on sonde différentes zones de sa surface pour vérifier et valider les résultats trouvés.

3.3.1.2. Calibration

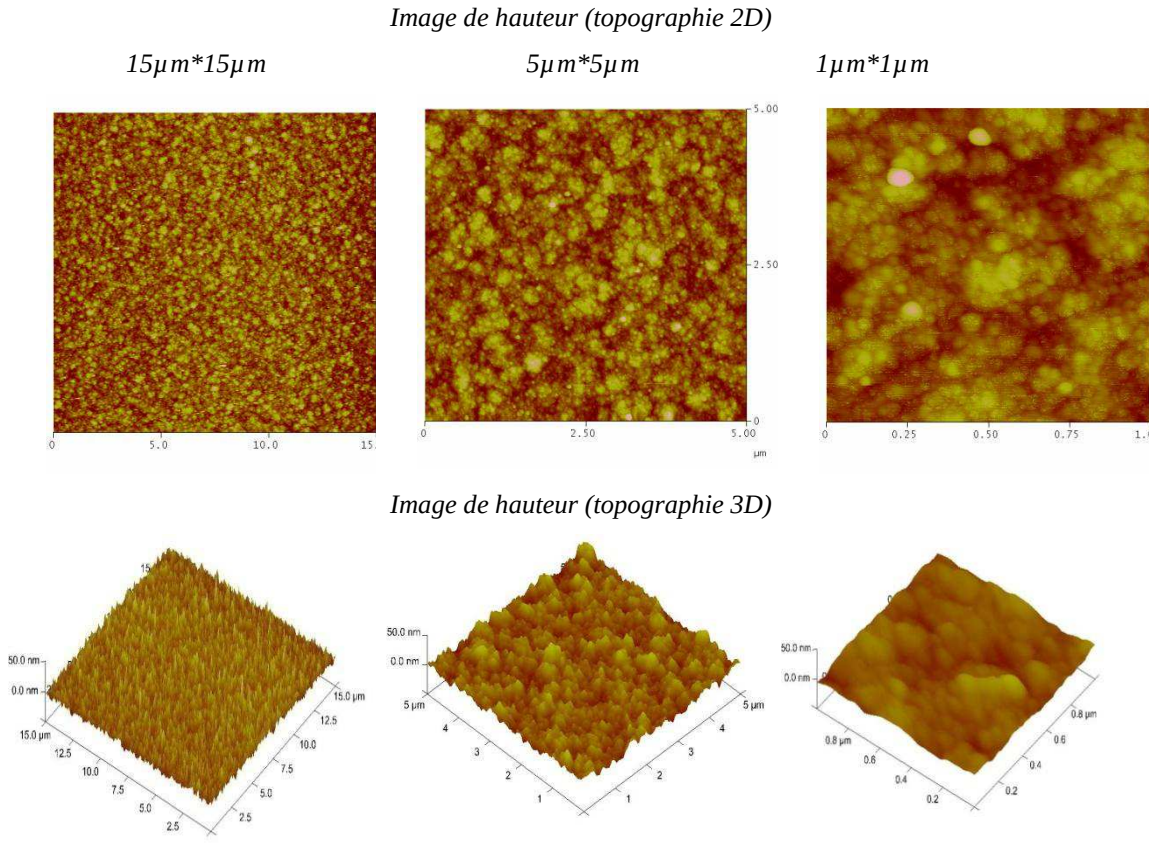


*Figure 3-17 : Résultats d'AFM pour une surface de SiO_2 ; images topographiques 2D et 3D. La rugosité moyenne pour ces surfaces est de 3,32 nm (15 µm*15 µm) et de 2,49 nm (1 µm*1 µm).*

Sur le capteur nu de référence, les images topographiques montrent la présence de petits agrégats avec une rugosité moyenne d'environ 3,3 nm pour une surface de 15*15 μm^2. La calibration se fait à partir de la courbe de force (ou courbe approche-retrait) en réalisant et enregistrant cette courbe et ensuite en mettant sa pente à 1 correspondant au fait que c'est une surface dure.

3.3.2. Mise au point du dépôt pour caractérisation par AFM

3.3.2.1. Dépôt par trempage

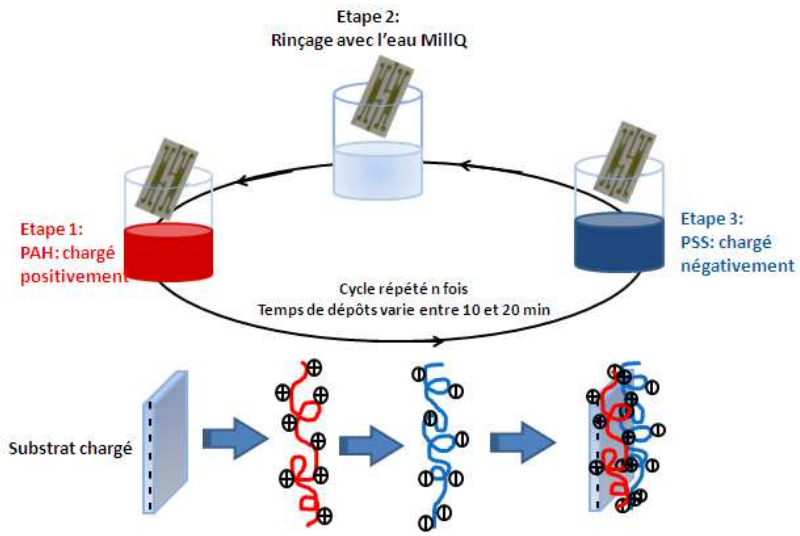


Figure 3-18 : Processus d'un cycle de dépôt de multicouches de PE par trempage

La méthode retenue pour la préparation des échantillons par l'étude AFM consiste à plonger un substrat alternativement dans une solution de polyanions puis une solution de polycations. Cette opération est répétée autant de fois que le nombre de couches souhaité. Cette méthode nous permet de varier facilement les temps de trempage et de rinçage afin de jouer sur les paramètres et optimiser ainsi le protocole.

3.3.2.2. Optimisation de protocole du dépôt de PEM

Nous avons ensuite procédé au dépôt d'une bicouche de PEM juste après le rinçage du capteur et suivant un premier protocole utilisé initialement, puis revu ensuite en tenant compte des résultats obtenus et présentés sur la Figure 3-19. On observe en effet sur cette figure une surface recouverte de cristaux rappelant une structure fractale et liés à une faiblesse de notre protocole, à savoir l'étape de rinçage avec le TBS (ou le NaCl) entre chaque dépôt de monocouche. Nous avons constaté qu'il était difficile d'éliminer ces cristaux, même en rinçant abandonnement avec l'eau MilliQ à la fin du process.

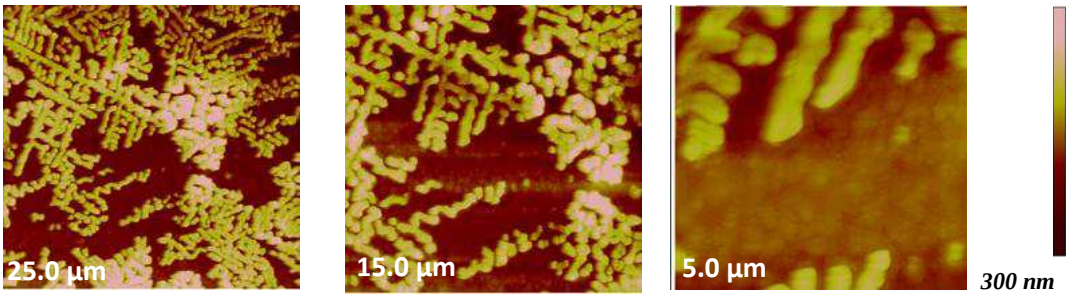


Figure 3-19 : Images topographiques obtenues en mode tapping montrant la formation des cristaux sur un film de multicouches de PEM nettoyé par l'eau milli-Q et après des inter-étapes de rinçage avec le TBS.

Néanmoins, nous avons introduit dans notre protocole une étape de rinçage à l'eau MilliQ pour éliminer les molécules faiblement liées à la surface et enlever au maximum les traces de NaCl pour éviter leur cristallisation sur la surface. Le résultat de cette amélioration est présenté sur la Figure 3-20.

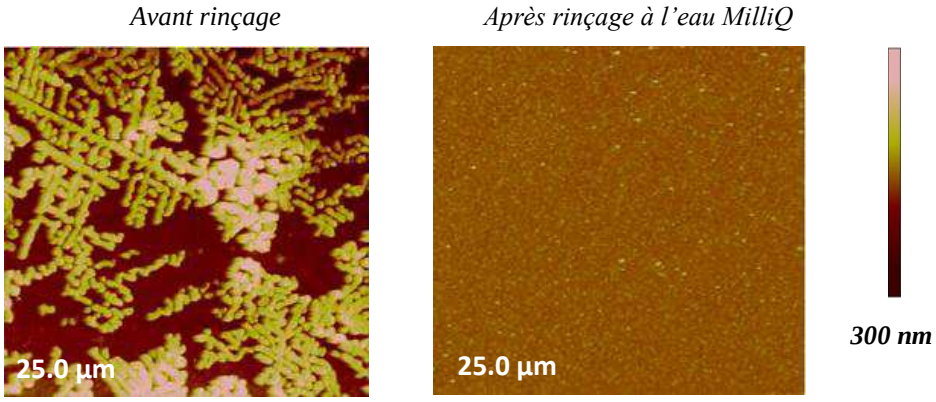


Figure 3-20 : Images topographiques obtenues en mode tapping montrant l'influence du rinçage à l'eau MilliQ sur l'homogénéité du film PEM obtenu

Après ces mises au point nous avons tenté d'optimiser d'autres paramètres dans le cadre du dépôt de PEM.

3.3.2.3. Caractérisation de films PEM

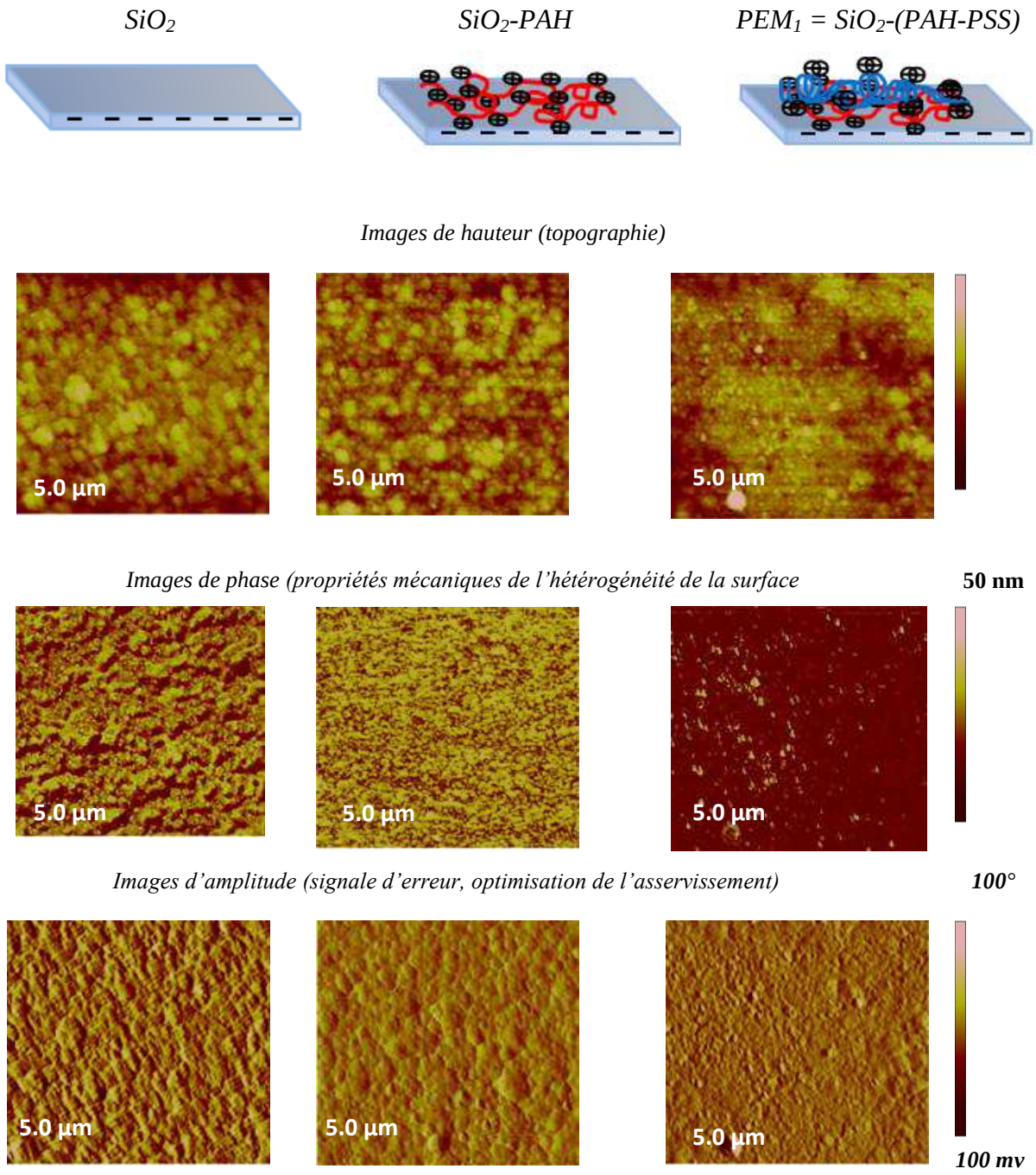


Figure 3-21: Résultats obtenus en mode tapping sur 3 étapes de traitement de surfaces : SiO_2, SiO_2-PAH, SiO_2-(PAH-PSS).

La comparaison des 3 surfaces (Figure 3-21), à savoir la référence (capteur nu), la référence recouverte avec le PAH et enfin la même surface recouverte avec du PAH-PSS, met en évidence des différences visibles, tout d'abord d'un point de vue topographique. La surface PAH-PSS semble être lissée par le film quand on la compare aux deux autres surfaces. Il en

est de même pour les images de phase où l'on voit une inversion du contraste entre le PAH et le PAH-PSS, ce qui paraît normal puisque l'image de phase est sensible à la charge du dépôt et que les deux surfaces ne sont pas sensées posséder la même charge. Cette observation va dans le sens du fait que ces surfaces sont bien recouvertes par les dépôts correspondants (PAH pour l'une et PAH-PSS pour l'autre).

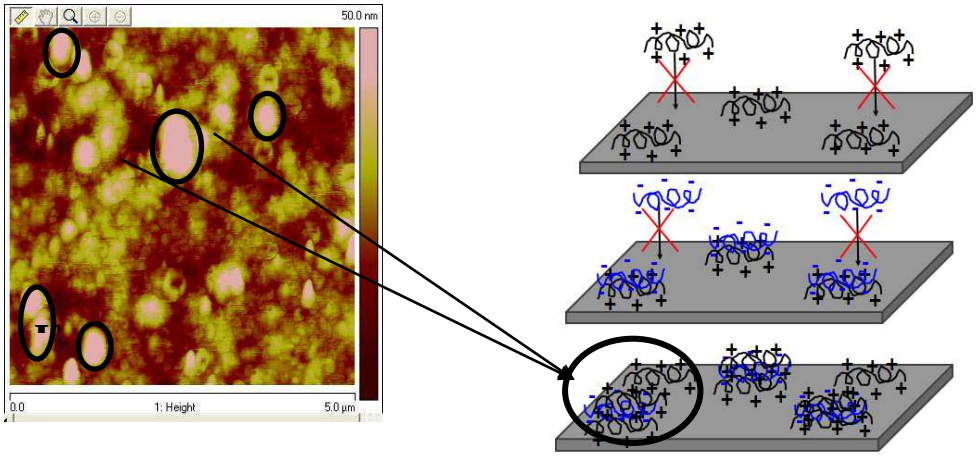


*Figure 3-22 : Irrégularité du film obtenu après le dépôt de multicouches de polyélectrolytes (ici, 3 bicouches de PEM) : image topographique de 5µm*5µm.*

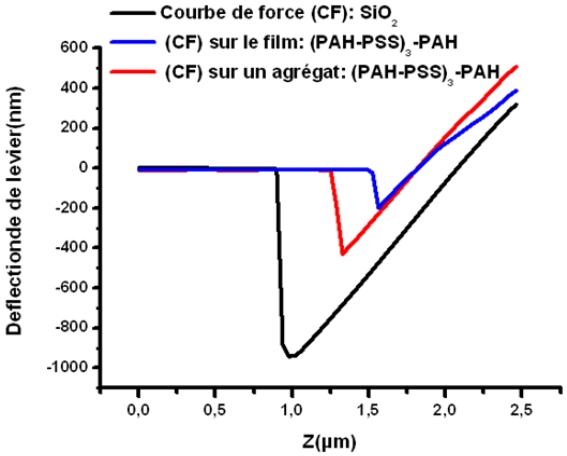


Figure 3-23: Comparaison de courbes de force sur les 3 surfaces : SiO_2, film de PEM et sur un agrégat.

L'analyse d'un dépôt comportant un nombre de couches supérieur par rapport à celui de la Figure 3-21, à savoir 3 bicouches de polyélectrolytes, montre que la surface semble recouverte complètement, avec la présence de grains et de gros agrégats, visibles à une échelle un peu grande (5*5 μm^2, Figure 3-23). Sur les courbes de forces réalisées en mode contact dans le but de déterminer les forces d'adhésion, on remarque que sur une surface de référence silice, la déflexion de levier est de l'ordre de 900 nm, alors que sur une surface de 3 bicouches la déflexion est moins importante et varie selon la zone sondé environ 500 nm sur une partie homogène du film et 200 nm sur un agrégat.

3.3.3. Amélioration du dépôt par optimisation du pH

Nous avons vu avec le dispositif à onde de Love, un effet important du pH lors du dépôt des PEM, le PAH notamment. Nous avons souhaité approfondir l'étude de l'influence de ce paramètre et des résultats obtenus à l'aide de caractérisations par AFM.

3.3.3.1. Influence du pH sur la formation de multicouches

Les images regroupées sur la figure ci-après illustrent les résultats obtenus sur la surface de référence et sur un film de PEM (3,5 bicouches), avec un pH pour le dépôt du PAH de 7,2 et de 9.

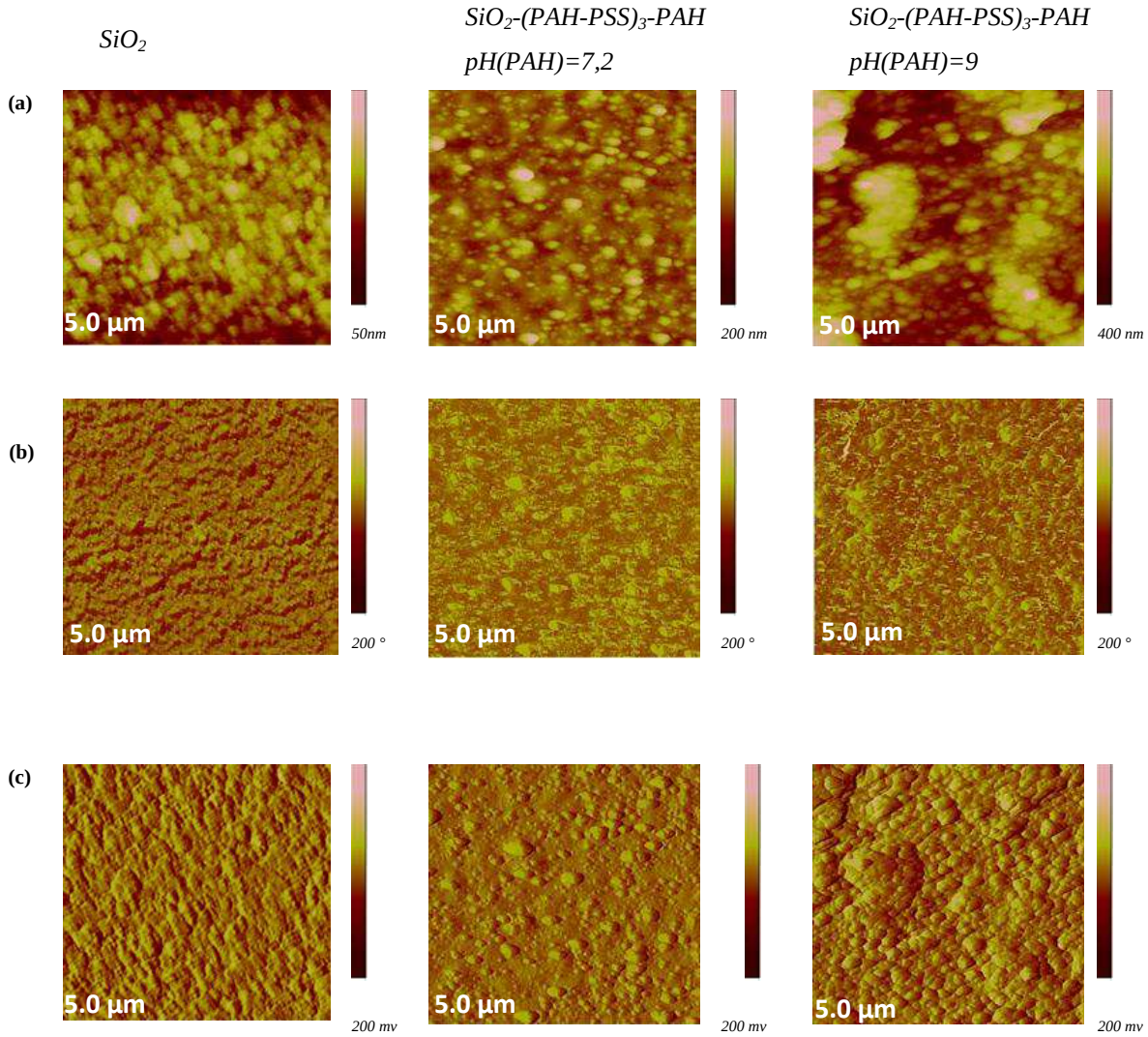


Figure 3-24 : Images topographiques obtenues en mode tapping sur 3 surfaces ((a) : surface de silice, (b) : 3,5 bicouches de PE pour un pH de PAH égal à 7,2, (c) : 3,5 bicouches de PE pour un pH de PAH égal à 9.

Ces résultats montrent des surfaces très différentes, dont la rugosité moyenne, reportée sur le tableau suivant et mesurée à des endroits de l'échantillon où le film était homogène sans agrégats trop importants, varie de manière importante.

Tableau3- 1 : Evolution de la rugosité de surfaces selon le pH utilisés.

Surface	**Surface de SiO_2**	**$(PAH\text{-}PSS)_3$ pH=7,2**	**$(PAH\text{-}PSS)_3$ PAH : pH = 9 / PSS : pH = 4**
Rugosité : R_a(nm)	3,2	18,1	40,6

3.3.3.2. Propriétés du film en fonction du nombre de couches de PEM

Dans ces conditions de pH optimisé, l'évolution de la topographie de la surface d'un film PEM a été suivie en fonction de l'épaisseur pour des paires de couches de PAH/PSS (de 2 jusqu'à 8 bicouches).

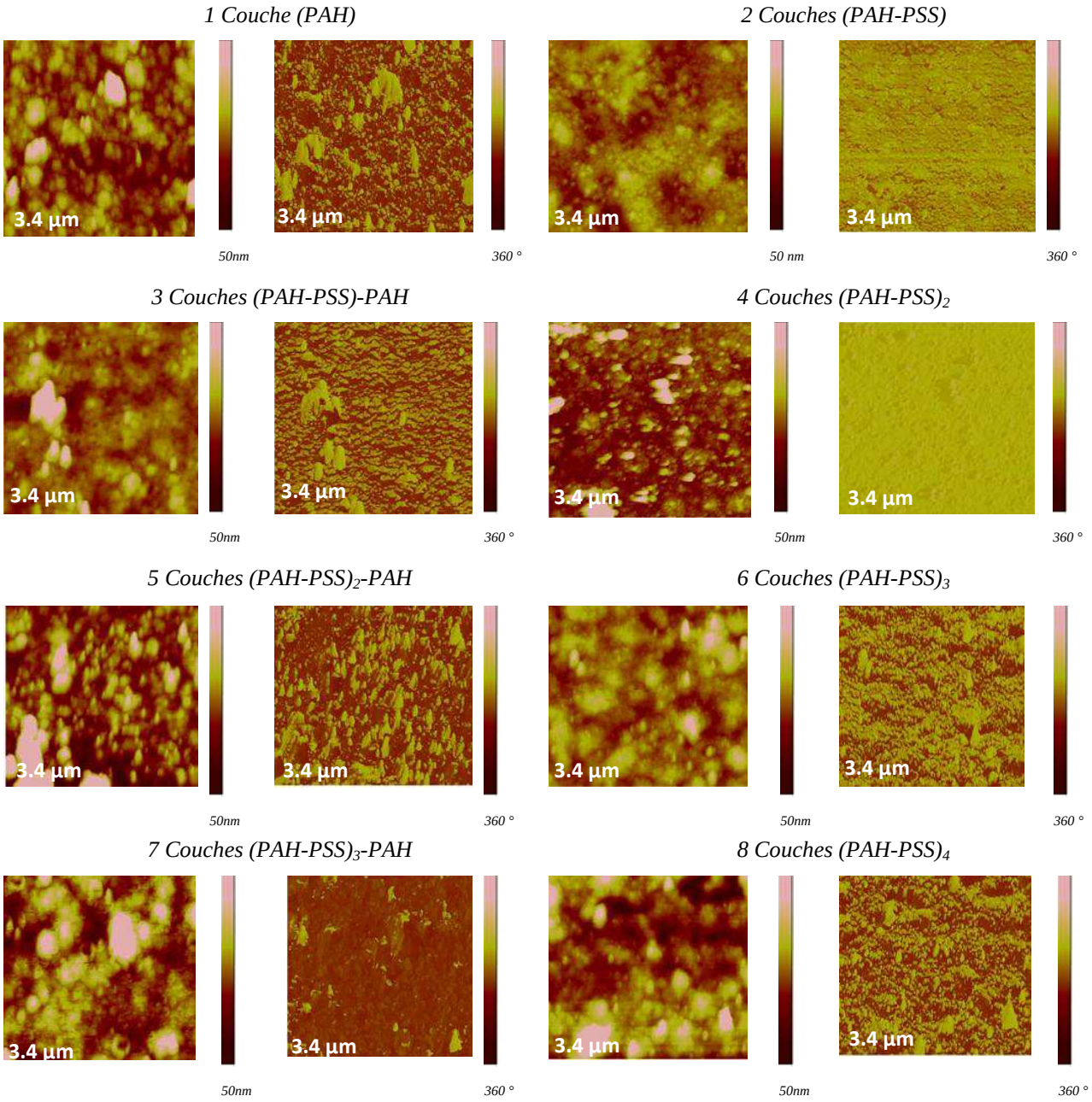


Figure 3-25 : Evolution de la topographie de dépôts en fonction due nombre de couches de PEM (1, 2, 3, 4, 8 bicouches ; pH (PAH) = 9) pour chaque couche est représentée l'image de hauteur (rugosité, agrégats,..) ainsi que celle de la phase (hétérogénéité, charge, etc.)

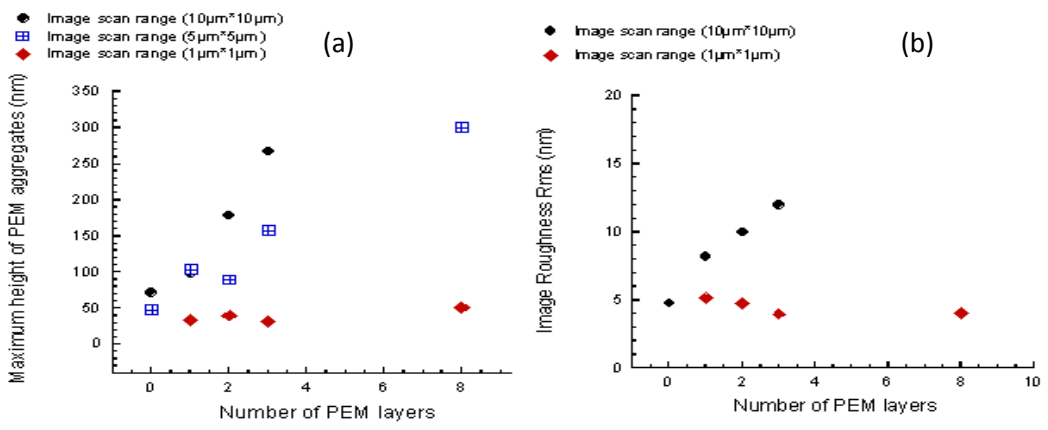


Figure 3-26 : Evolution de la taille des agrégats (Hauteur, (a)) ainsi que celle de la rugosité (Rms,(b)) pour des films auto-assemblés de PAH/PSS.

Cette étude a permis de montrer que la structure de dépôt se présentait sous forme de grains dispersés sur la surface du substrat SiO_2 et que, au-delà de 7 bicouches, ces derniers coalescent entre eux et donnent naissance à un film homogène dont la rugosité varie ensuite peu en fonction du nombre de bicouches déposées (Figure 3-25).

La rugosité moyenne (valeur RMS) et la rugosité maximale (R_{max} représentant la taille des agrégats) présente la Figure 3-26. On remarque que la rugosité moyenne (RMS) augmente avec le nombre de couches pour les zones balayées de grandes tailles (images de 5µm et 10µm) qui tiennent compte des agrégats présents à la surface Il en est de même pour l'évolution de Rmax qui augmente en fonction du nombre de couches. Nous avons aussi mesuré la rugosité/ taille d'agrégats dans des zones plus ou moins homogènes, de petites tailles de1µm*1µm et on constate que lavaleur du Rms est presque stable avec le nombre de couches.

A partir de ces résultats, on constate que les valeurs des hauteurs des agrégats sont plus importantes dans le cas d'une couche terminale de PAH (nombre de couches impair). Ceci peut s'expliquer par le fait que le PSS est entièrement ionisée et possède une conformation étendue ce qui lui permet de s'adsorber à plat sur la dernière couche de PAH. Par contre, le PAH qui a une conformation en boucle s'adsorbe sous forme d'agrégats, dans laquelle la couche suivante de PSS peut diffuser, ce qui abaisse la valeur de la hauteur des « amas ». On peut relier ces résultats à l'hydrophobicité de la surface du film lorsqu'il est terminé par une couche de PAH et son hydrophilie dans le cas de PSS.

3.3.3.3. Détermination de l'épaisseur du film par AFM

L'AFM a également été utilisé afin d'estimer l'épaisseur du film obtenu, ce qui est possible après grattage de la surface par la pointe, en exerçant une force plus importante que celle utilisée pour imager. L'ensemble pointe/ levier devient ainsi comme un râteau et déplaçant la matière sur les bords.

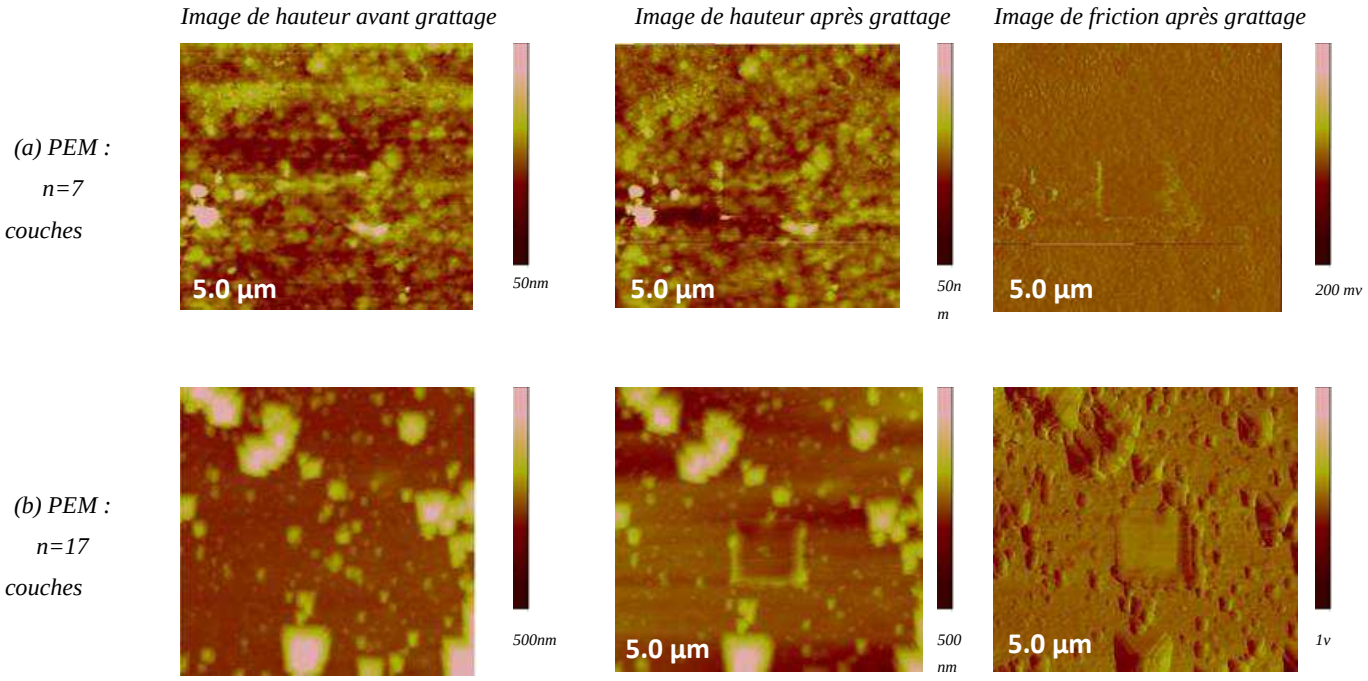


Figure 3-27 *: Résultats des expériences de grattage (avant et après) des trois surfaces : a) SiO_2, b) PEM_3-PAH, c) PEM_8-PAH*

Par cette méthode, nous procédons comme suit : après calibration de l'échantillon, une zone de 5µm de côté est sélectionnée et une image à charge appliquée (force) quasiment nulle permet de sonder l'échantillon et de localiser une zone représentative sans abîmer l'état de surface. Puis, on effectue un zoom de 1µm, en appliquant une force un peu plus importante et on balaye cette zone pendant 2 heures, A la fin de l'expérience, un zoom arrière permet de refaire une image de 5 µm (à une force faible) pour observer le résultat de grattage.

Cette technique a été mise en œuvre sur deux types de surface (l'une avec 7 couches et l'autre 17 couches) préparées et déposés selon le protocole décrit précédemment. Les paramètres physico-chimiques utilisés (pH, force ionique, poids moléculaire) sont ceux qui ont été optimisés.

On remarque que, sur l'image du substrat revêtu de 17 couches (Figure 3-28) le grattage peut être observé, il apparaît un « trou » au niveau de la zone de 1 µm zoomée, ainsi qu'un déplacement de la matière sur les deux bords de la zone grattée.

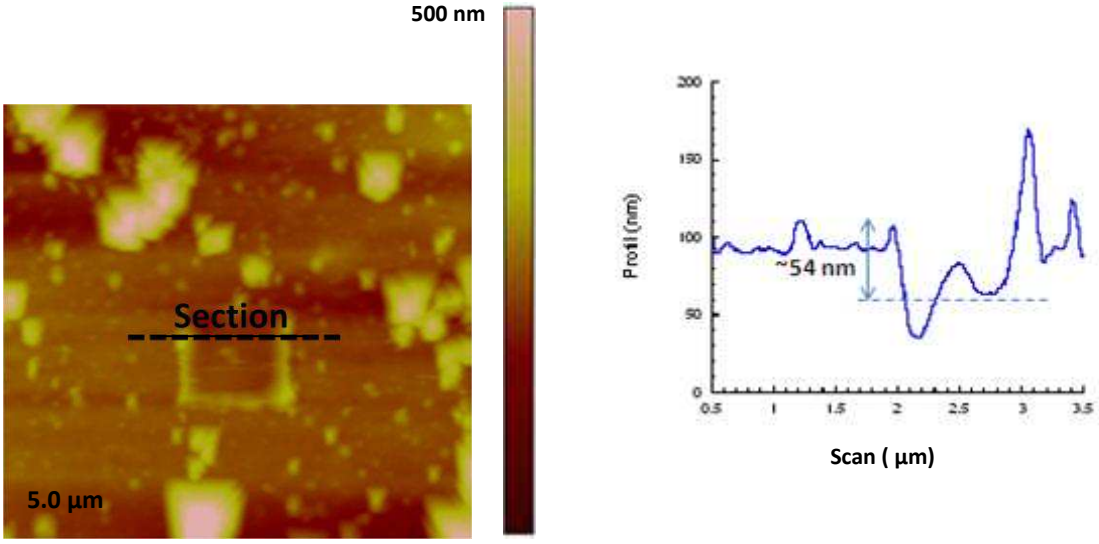


Figure 3-28 : Visualisation d'une section sur la zone grattée d'une surface de 17 couches PEM.

Ces observations sont confirmées, en faisant une section sur la zone grattée. Sur la première surface, il n'est pas possible d'avoir d'informations sur l'épaisseur du film alors que pour la surface à 17 couches, une hauteur de 54 nm après un second grattage a pu être mesurée, conduisant à estimer une épaisseur du dépôt de PE proche de 3 nm dans notre cas.

3.3.4. Application : immobilisation des bactéries

Enfin, l'AFM comme outil de caractérisation complémentaire a été utilisé sur le film de bactéries, en étudiant leur immobilisation, ainsi que leur morphologie et leur comportement sur différentes surfaces et à l'air, dans un premier temps.

3.3.4.1. Effet du pH

Pour cela, nous avons déposé les bactéries *E. coli* sur trois surfaces différentes, SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$ (pH=9), SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH (pH=7,2) et SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH (pH=9). Ces bactéries sont préparées dans leur milieu physiologique TBS, puis bien lavées avec l'eau MilliQ après incubation quelques heures sur la surface du capteur. Les résultats topographiques à l'air en mode tapping sur la surface optimisée sont présentés sur la Figure 3-29.

Image de topographie 2D ***Image de topographie 3D***

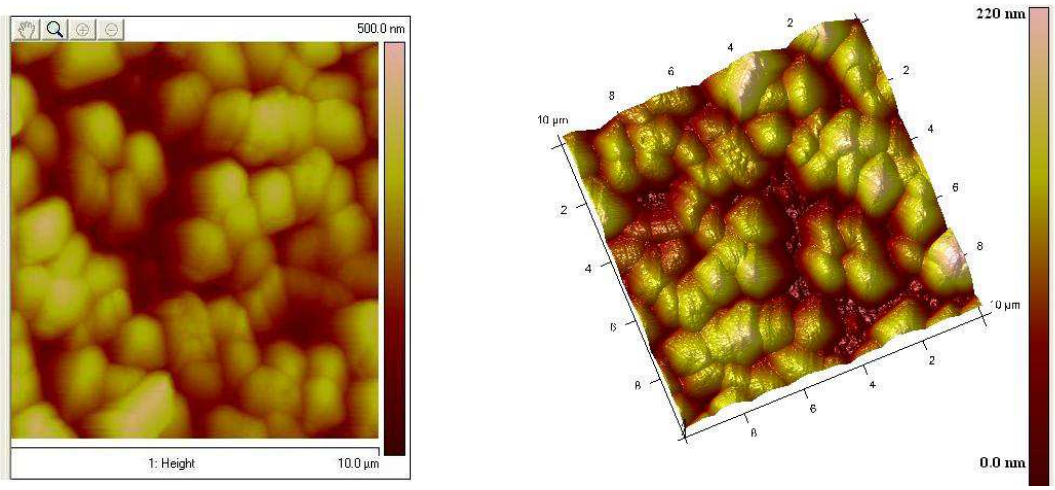


Figure 3-29 : Image topographique d'AFM pour des bactéries immobilisées sur une surface SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH (pH=9).

Les résultats ont montré une population bactérienne très dense dans le cas d'une surface optimisée, avec une forme majoritairement ovale de taille comprise entre 1 et 2 µm et un taux de recouvrement de la surface occupée par les bactéries de l'ordre de 86%. Si on compare ces résultats à ceux obtenus sur une surface de PEM déposés avec des paramètres physico-chimiques classiques (Figure 3-30), on remarque tout d'abord, un changement dans la structure et la forme des cellules bactériennes. En effet, avec des paramètres physico-chimiques classiques, les bactéries ont des formes rondes, quelques-unes elliptiques, et le taux de couverture de la surface du capteur est de l'ordre de 37% seulement.

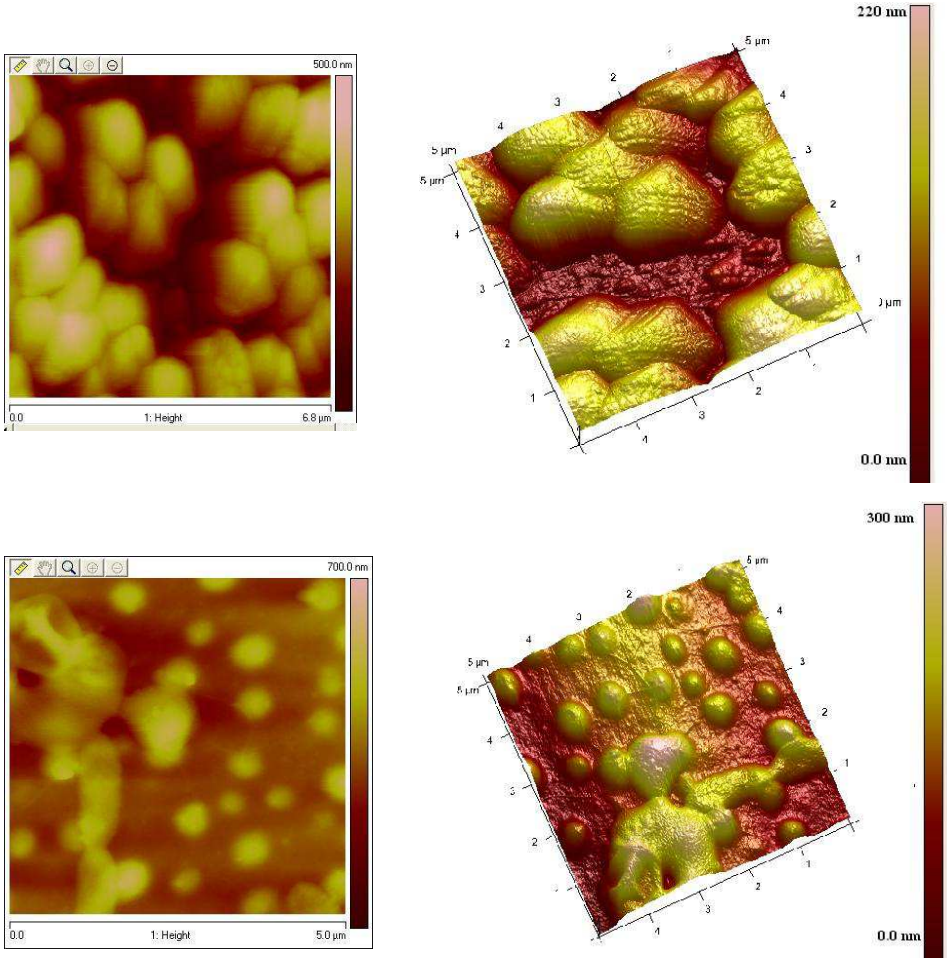


Figure 3-30 : Comparaison entre les images topographiques d'AFM pour des bactéries immobilisées sur une surface SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH (pH=9, en haut) et une surface de SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH (pH=7,2, en bas).

3.3.4.2. Effet d'une couche terminale de PSS

Un autre type de surface a été testé pour observer l'effet de la charge de la couche superficielle de polyélectrolytes. On remarque que lorsque cette couche terminale est formée de PSS, portant des charges négatives, il est logique du point de vue électrostatique d'obtenir un faible nombre de bactéries déposées sur la surface (Figure 3-31), alors que pour des multicouches terminées par un polyélectrolyte cationique, le PAH (Figure 3-29), un grand nombre de bactéries sont immobilisées sur le support. Comme précédemment évoqué, ceci est lié au fait que la bactérie *Escherichia coli* possède une charge cytoplasmique globalement négative.

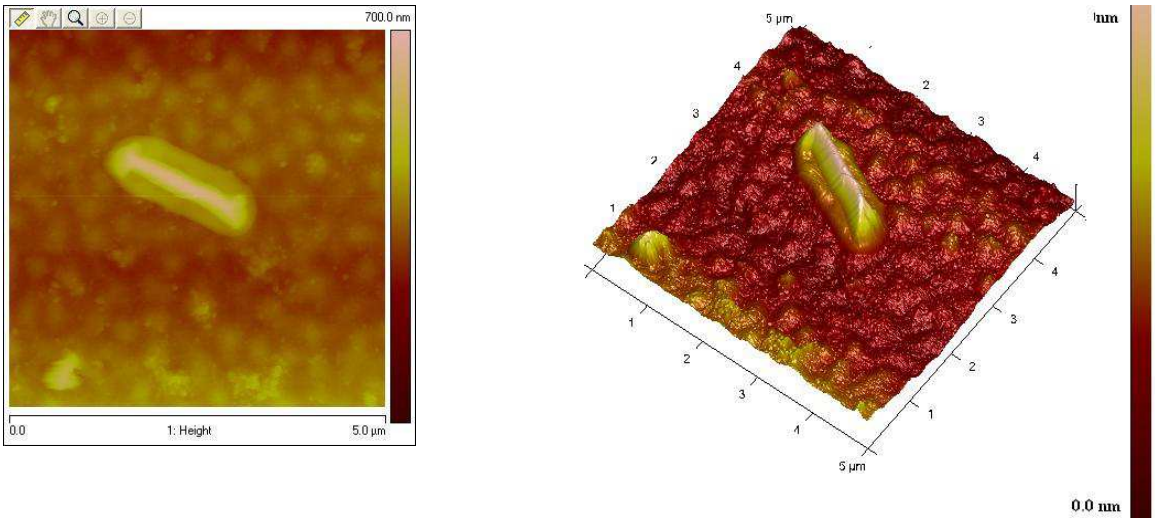


Figure 3-31 : Image d'une bactérie déshydratée sur une surface de SiO_2-$(PAH\text{-}PSS)_3$ (pH=9)

3.4. Conclusion

Finalement, nous avons obtenu des résultats intéressants sur la structuration des multicouches alternées de polyélectrolytes, en étudiant le système (PAH/PSS). Nous avons mis en évidence l'influence de la force ionique et du pH, sur la formation et l'organisation de ces multicouches ainsi que l'influence de ces paramètres sur la structure de notre film hybride bio-inspiré. Ces résultats ont pu être corrélés à des paramètres et des mécanismes abordés théoriquement, ils nous semblent suffisants pour avoir un biofilm bactérien capable de donner des résultats de détection des toxiques souhaités.

4. Détection des métaux lourds

De nombreuses équipes travaillent aujourd'hui sur le développement d'un biocapteur permettant de détecter des polluants tels que les métaux lourds et les pesticides. Pour mettre en jeu un tel dispositif, le choix du biorécepteur est capital. Différents biorécepteurs ont été fixés sur des transducteurs tels qu'une enzyme, par exemple l'uréase [128,129] et la phosphatase alcaline [130] ou des cellules procaryotes comme l'*Escherichia coli.* Cette dernière a été immobilisée dans une matrice sol-gel [**131**,**132**] par des polymères cationiques [133] ou encore par le complexe avidine–biotine [134]. De même plusieurs types de transducteurs ont été testés pour ce genre de détection, tels les capteurs optiques [135,136]**,** piézoélectriques [137] et conductimétriques **[3].** Des éléments plus détaillés ont été présentés en état de l'art (chapitre 1). Globalement, il en ressort des limites en termes de seuil de détection et/ou de temps de réponse, souvent associés à une nécessaire préparation d'échantillon.

Nous présenterons dans ce chapitre les résultats expérimentaux sur l'application de deux types de biocapteurs, électrochimique et acoustique, à base de bactéries immobilisées par la méthode couche par couche (LbL) pour la détection des métaux selon les méthodes dont la mise au point a fait l'objet du chapitre précédent. Nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus par électrochimie, qui ont permis l'optimisation de la concentration bactérienne. Ensuite, nous décrirons le protocole utilisé par onde de Love pour différents modes de détection : hydrostatique et hydrodynamique. Nous poursuivrons en exposant les résultats expérimentaux obtenus pour la détection de cadmium et de mercure et leur reproductibilité. Nous présenterons aussi les différents résultats obtenus par AFM, à l'air et en milieu liquide, montrant l'effet des métaux lourds sur les bactéries et confortant ainsi l'analyse des réponses du capteur. Nous concluons ce chapitre par la présentation d'une amélioration du capteur à ondes de Love équipé d'une couche mince d'oxyde de titane TiO_2 ajouté sur la couche guidante de SiO_2 d'un capteur classique, afin d'en augmenter sa sensibilité et sa durée de vie. En effet, l'analyse par AFM a montré l'existence d'une activité biologique des bactéries immobilisées sur la surface d'un capteur pendant plusieurs semaines.

4.1. Résultats de détection par électrochimie

4.1.1. Optimisation de la concentration bactérienne

La concentration bactérienne nécessaire pour une meilleure détection, a été optimisée à l'aide d'une cellule électrochimique classique à trois électrodes. La cellule électrochimique est conçue pour assurer une distance constante entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Elle est formée de trois cols ou trois ouvertures, l'une pour l'électrode de référence qui est dans notre cas une électrode au calomel saturé (Hg /Hg_2Cl_2/KCl), les deux autres pour permettre des ajouts sans déconnecter la cellule, ce qui permet d'assurer une bonne stabilité et une bonne reproductibilité des mesures. L'électrode de travail (dans notre cas en or) et la contre-électrode (en platine) sont mises en contact avec la solution électrolytique à travers deux orifices et des joints toriques de faibles diamètres permettant de les maintenir et d'assurer l'étanchéité.

Dans cette étude la souche bactérienne utilisée est l'*Escherichia coli* PHL818 porteur de la mutation *ompR234*, de la collection de l'équipe « Biofilms » de l'INSA de Lyon. C'est une dérivée de la souche MG1655 d'*Escherichia coli* K-12. Il s'agit d'un plasmide qui contient un promoteur de l'opéron csgBA du gène codant pour la « Green Fluorescent Protein » (GFP) de la méduse *Aequorea victoria*.

Les métaux lourds cibles utilisés sont le cadmium ($Cd(NO_3)_2$. $(H_2O)_4$, CAS 7790-84-3, Sigma-Aldrich) et le mercure ($Hg(NO_3)_2$.(H_2O), CAS 783-34-8, ACROS).

Des capteurs équipés de trois bicouches et demi de polyélectrolytes (surface Au-$(PEM)_3$-PAH) ont été incubés avec des solutions bactériennes de différentes concentrations, puis testés pour la détection du métal Cd^{2+}, pour une concentration nominale de 10^{-9} M.

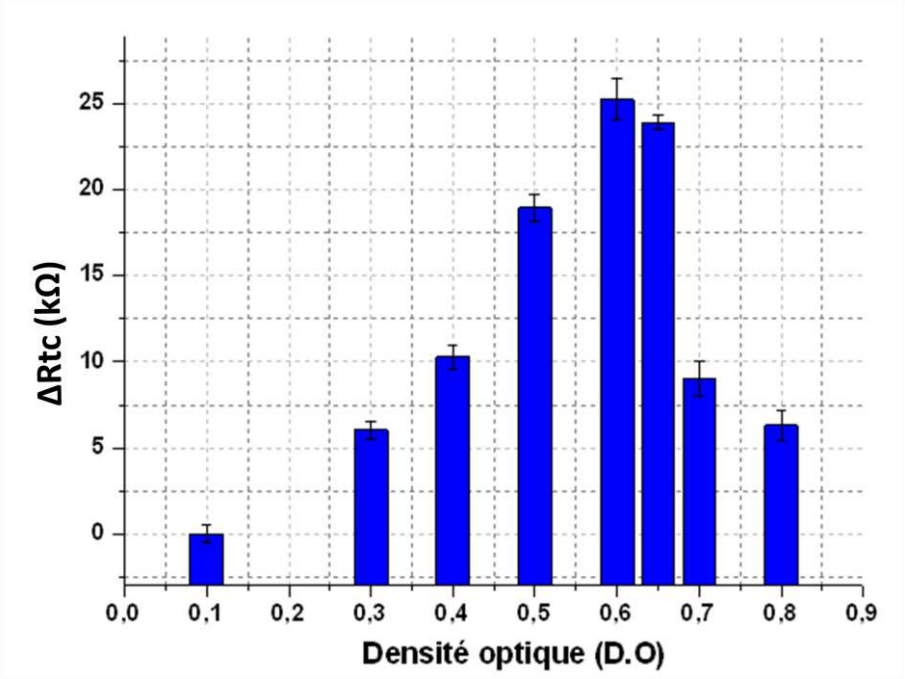


Figure 4-1 : Réponse du capteur électrochimique à l'ion Cd^{2+} (10^{-9} M) pour différentes concentrations d'E.coli : la variation de la résistance de transfert de charge est maximale pour une densité optique proche de 0,6.

Les résultats ont été reportés sur la Figure 4-1, sous la forme de la variation de la résistance de transfert de charge équivalente, en fonction de la Densité Optique (D.O) de la solution de bactéries. Il apparaît que, dans ces conditions, une sensibilité maximale est obtenue pour une densité optique égale à *0,6*. Au-delà, l'effet inhibiteur de ce métal sur l'activité enzymatique de la bactérie *E.coli* est moins visible, ce qui pourrait s'expliquer par le grand nombre de bactéries immobilisées sur la surface à forte D.O.

Etant donnés ces résultats, les tests expérimentaux seront systématiquement conduits, sauf indication contraire, avec une concentration de la solution bactérienne à D.O=0,6.

4.1.2. Caractérisation de la détection des métaux lourds

4.1.2.1. Détection de l'ion cadmium Cd^{2+}

Les spectres d'impédance sont représentés sur la Figure 4-2 pour différentes concentrations de 10^{-9} à 10^{-1} M de Cd^{2+}. On retrouve toujours la forme d'un demi-cercle aux hautes fréquences, caractéristique d'une résistance en parallèle avec une capacité. Par ailleurs, le diamètre du demi-cercle varie en sens inverse de l'ajout du métal lourd : la résistance de transfert de charge, dont les valeurs extraites à partir des courbes sont indiquées sur le Tableau 4-1, diminuent avec la concentration de métal, ce qui prouve la modification du biofilm bactérien formé sur l'électrode (Au-PEM_3-PAH) au fur et à mesure de la détection.

Avec l'altération des bactéries, la surface libre de l'électrode augmente, entraînant ainsi une diminution de l'impédance d'interface et par conséquent, une augmentation de la conductivité électrique à l'interface d'électrode. Ceci entraîne apparemment une diminution de la densité d'occupation bactérienne de l'interface de l'électrode provoquant une diffusion aux basses fréquences.

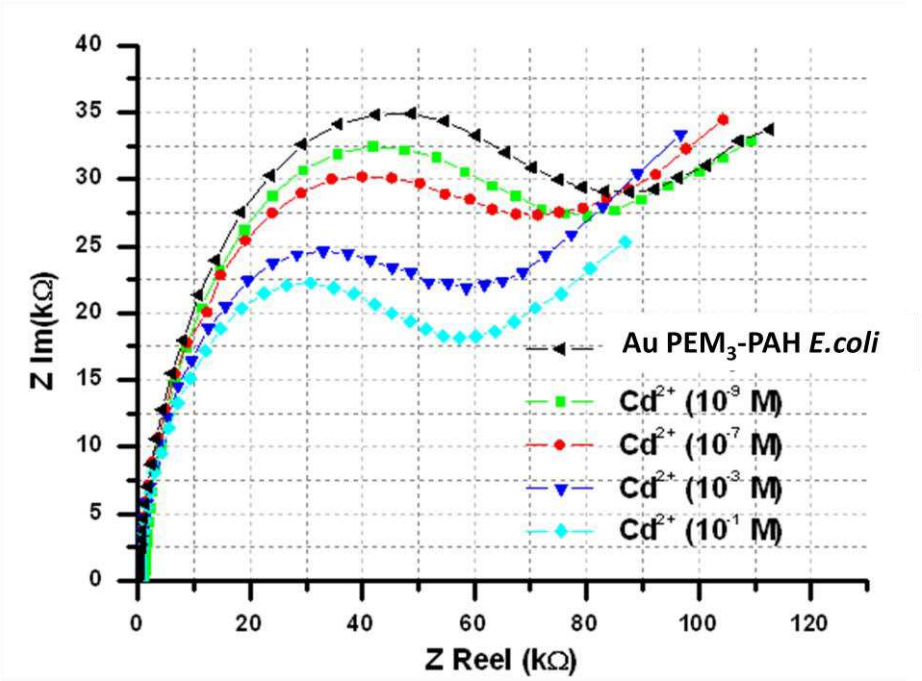


Figure 4-2: Spectres de Nyquist montrant la variation de l'impédance en fonction de la concentration de Cd^{2+}

Tableau 4-1 : Valeurs de la résistance de transfert de charge Rtc et de sa variation en fonction des ajouts de Cd^{2+}.

Concentration de Cd^{2+} (M)	**R_{tc} (kΩ)**	**$\Delta R_{tc} = R_{tc0} - R_{tc}$ (kΩ) ***
10^{-9}	72.296	25.26
10^{-6}	67.465	29.857
10^{-3}	58.682	38.64
10^{-1}	53.378	43.944

* R_{tc0} = 97.322 kΩ : Résistance de transfert de charge de l'électrode [Au-$(PEM)_3$-PAH-*E.coli*] avant l'ajout du Cadmium (Cd^{2+}).

La représentation de ΔR_{tc} en fonction de log (Cd^{2+}), permet d'évaluer, en première approximation, un modèle sous la forme d'une droite $y = a.x + b$, avec : a=1,28 kΩ; b=0,22 kΩ (Figure 4- 3).

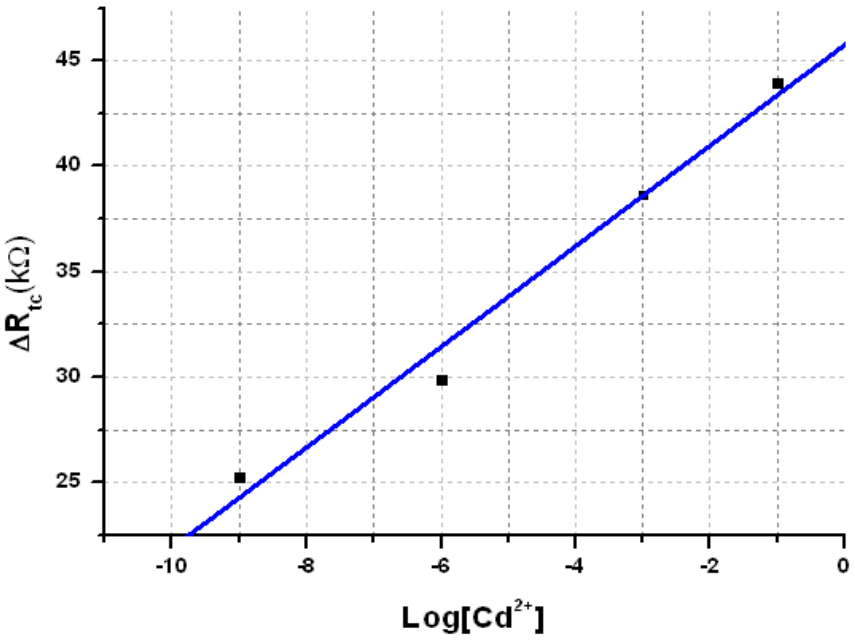


Figure 4- 3 : Variation de la résistance de transfert de charge en fonction de la concentration de Cd^{2+}.

4.1.2.2. Détection de l'ion mercure Hg^{2+}

Une expérience similaire est reproduite pour détecter l'ion mercure Hg^{2+} par immobilisation des bactéries sur l'électrode de travail en or. Les résultats obtenus sont représentés en Figure 4- 4 **.** Ceux-ci montre un comportement relativement analogue pour des concentrations inférieures à 10^{-6} M. Au-delà, le mercure attaque l'électrode en or et de ce fait la détection n'est plus possible. Ainsi, comme on pouvait s'y attendre, l'électrode en or n'est pas appropriée pour détecter l'ion mercure pour des concentrations supérieures à 10^{-6} M, et subirait probablement un vieillissement accéléré.

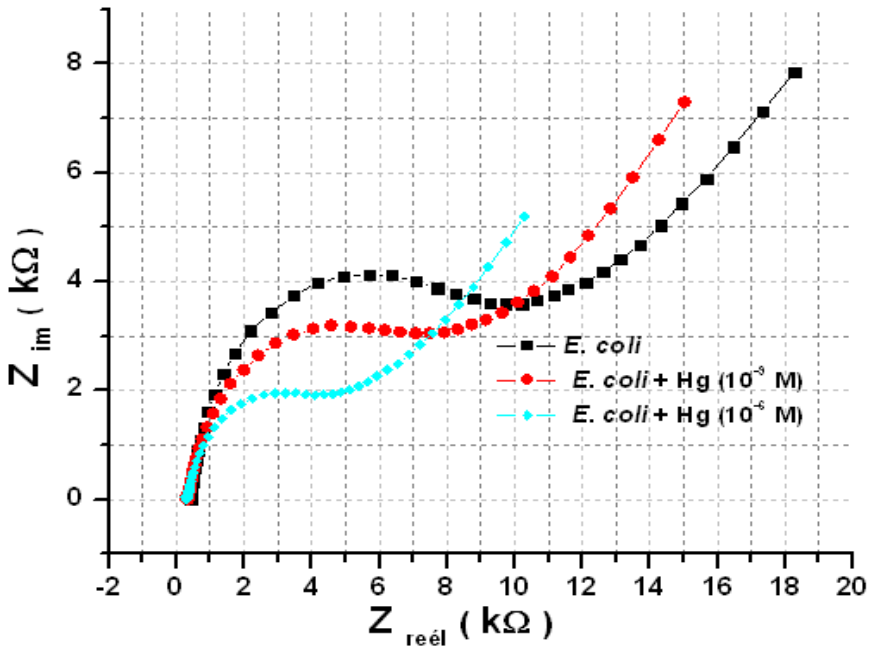


Figure 4- 4 : Diagrammes de Nyquist montrant l'effet de l'ion Hg^{2+} sur la bactérie Escherichia coli par la réponse du capteur électrochimique.

4.2. Résultats de détection par onde de Love

4.2.1. Mesures hydrostatiques

4.2.1.1. Préparation des capteurs

Les deux polyélectrolytes, le PAH (MW=56kDa) et le PSS (MW=70kDa), sont préparés dans une solution de TBS (5 mg/l dans de TBS) et alternativement déposés sur les deux lignes à retard d'un dispositif à ondes de Love, à l'aide d'une micropipette. Pour cela, une ligne de base est assurée à l'aide d'un dépôt préalable de 250 µl de TBS. Ensuite des dépôts de PAH et de PSS (240 µl pendant 10 à 20 min) sont réalisés alternativement. Dans ces mesures hydrostatiques, une étape de nettoyage ne paraît pas nécessaire. En effet, l'influence de cette étape n'est pas visible sur la réponse en fréquence, néanmoins cette étape a été conservée ici, suite aux études menées par AFM, pour éviter la formation d'agrégats. Comme décrit précédemment et comme représenté sur la Figure 4-5, les couches de polyélectrolytes sont alternées jusqu'à l'obtention d'un film $(PAH\text{-}PSS)_3$-PAH terminé par une couche de polycation PAH en vue de favoriser l'immobilisation des bactéries, et par une étape de nettoyage (même protocole utilisé en électrochimie). Puis, un volume de 150µl de suspension bactérienne est placé dans la chambre d'analyse de la ligne de mesure, pour immobilisation par adsorption physique suite aux interactions électrostatiques avec le film polyélectrolyte.

Ces dépôts ont été réalisés en utilisant la cellule de PDMS décrite dans le chapitre 2 et possédant une chambre d'analyse centrée entre les IDTs, sur chaque ligne d'un dispositif double.

Après immobilisation des bactéries, un volume de 200 µL de TBS est injecté dans chaque cavité de la puce PDMS, puis aspiré. Cette opération est renouvelée trois fois pour assurer le nettoyage de la surface en enlevant les bactéries non adsorbées sur la partie sensible du capteur.

Pour chaque capteur, une ligne peut être réservée à un contrôle. Dans notre cas le contrôle est une ligne avec uniquement des polyélectrolytes, pour s'assurer que la détection de métal est due à un effet sur la bactérie.

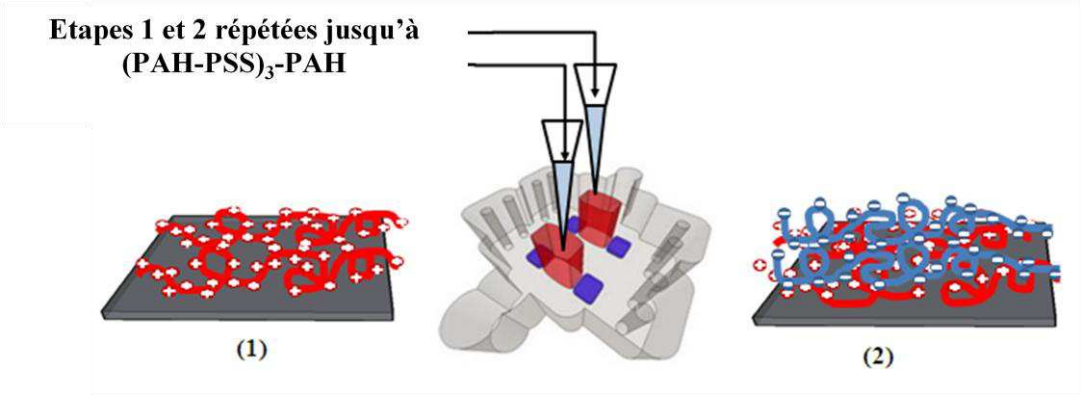


Figure 4-5 : Etapes de dépôt de polyélectrolytes en configuration statique, chaque étape est suivie d'un nettoyage sous milieu tampon de sorte à éliminer les particules non immobilisées.

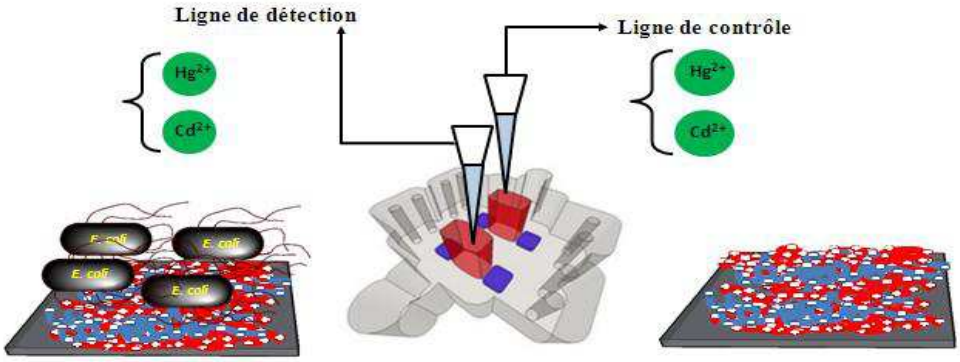


Figure 4-6 : Etapes de détection de métaux lourds en statique en présence d'une ligne de contrôle.

4.2.1.2. Détection des ions Hg^{2+} et Cd^{2+}

Après les étapes précédentes, les mesures de détection des métaux dans des solutions ont été réalisées. Les variations de fréquence des deux dispositifs sont enregistrées pendant le

dépôt des bactéries et les tests de détection à des concentrations différentes. Les résultats sont présentés en Figure 4-7.

Les effets des ions de métaux lourds sur les cellules bactériennes ont été évalués en comparant les réponses en temps réel du capteur, images du comportement des bactéries, lors de l'exposition au cadmium et au mercure (ions Cd^{2+} et Hg^{2+}), dans la gamme de 10^{-12} à 10^{-3} M voire 10^{-1} M. Après un délai de 3 min environ après l'injection de métal dans la chambre d'analyse, la fréquence augmente rapidement avec l'augmentation des concentrations de métaux lourds jusqu'à 10^{-3} mol.l^{-1}. Une limite de détection inférieure à 10^{-12} mol.l^{-1} est obtenue. À des concentrations plus élevées, une diminution de fréquence importante peut être observée.

Ces résultats ont été attribués à des changements dans les propriétés viscoélastiques, liées à des modifications dans le métabolisme bactérien, et non à un effet de masse classique qui aurait entraîné une diminution de fréquence. En effet, les métaux lourds interagissent avec les constituants de la membrane et inhibent les activités enzymatiques de la cellule, induisant une diminution de sa viabilité [138]. Le processus de l'inhibition enzymatique à de faibles concentrations de métaux lourds est bien décrit comme étant fondé sur l'interaction entre les ions toxiques et les groupements thiols présents dans les chaînes latérales cystéine ainsi que la fixation de ces ions métalliques sur les sites actifs des enzymes. Ainsi, à de faibles concentrations, les métaux lourds ont tendance à remplacer les nutriments comme le calcium, le magnésium, le zinc, le manganèse et le cuivre, inhibant ou éliminant ainsi l'activité de l'enzyme résultant de ces minéraux.

Lors de l'introduction d'une dose élevée de métaux lourds, il y a une altération de la structure des acides nucléiques : la fixation des cations métalliques sur les groupements phosphates des acides nucléiques peut entraîner des variations de structure empêchant la transcription ou la traduction des gènes. Les espèces oxygénées réactives issues des processus cellulaires respiratoires peuvent interagir avec les métaux et former des radicaux libres, qui endommagent différents constituants cellulaires, les bactéries se vident alors de leur continu sur la surface [139, 140].

Ainsi, la diminution significative de la fréquence de plusieurs kilohertz observée au-delà d'une concentration limite, obtenue à 10^{-3} mol. l^{-1}, peut être due à un phénomène purement mécanique non lié à la détection cellulaire. Celle-ci n'intervient alors plus dans les mécanismes mis en jeu au niveau du capteur en présence des métaux lourds. Il est à noter qu'un résultat similaire a été observé avec un autre type de biorécepteur (Micro-algue, dans les travaux de thèse de N.TEKAYA [141]) et également sur une surface différente, de TiO_2 au

lieu de SiO_2, présentée en dernière partie de ce chapitre, à une concentration limite parfois distincte (10^{-1}M). Ce même effet de diminution de fréquence a été observé en l'absence de bactéries sur les PEM, dès les faibles concentrations de métaux, confirmant une réponse liée à des phénomènes purement physiques provoquant l'équivalent d'un effet de masse.

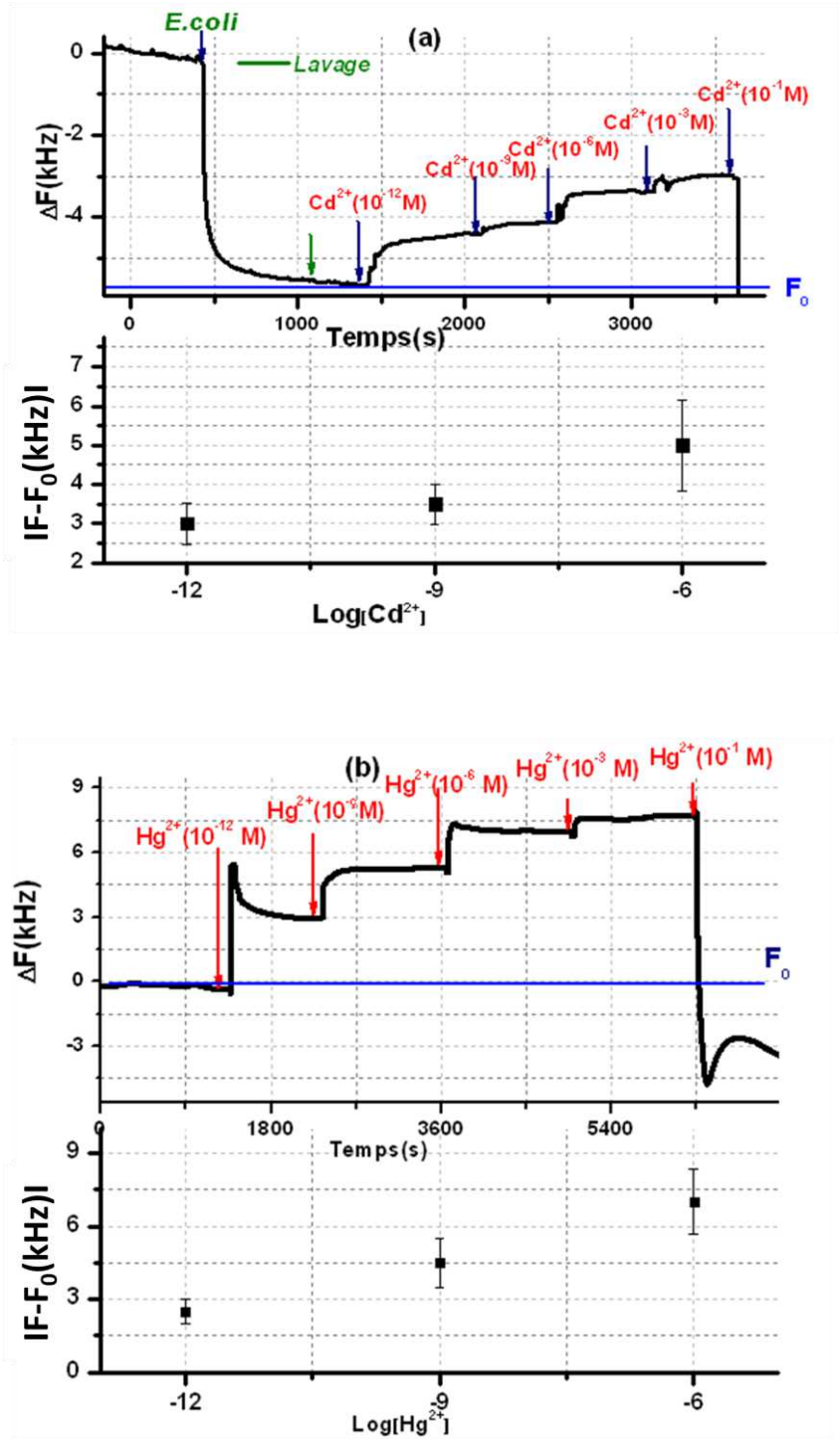


Figure 4-7 : *Variation de la fréquence en temps réel de l'oscillateur à ondes acoustiques en fonction de la biodétection bactérienne pour des concentrations croissantes (a) de cadmium et (b) de mercure ; la reproductibilité est indiquée par des barres d'erreur représentant l'écart-type autour de la valeur moyenne, pour 4 tests effectués avec des capteurs différents.*

Enfin, lors du retrait des métaux lourds du réservoir PDMS et lavage avec une solution tampon, les signaux ne sont pas revenus à leur ligne de base (résultats non montrés). Il a ainsi été remarqué que les cellules ne retrouvent pas leur capacité initiale après avoir été mises en présence de ces ions métalliques.

Ces mesures ont été reproduites plusieurs fois : des réponses analogues ont été obtenues, avec toutefois une reproductibilité moyenne, comme indiqué par les barres d'erreur sur les courbes de synthèse des variations de fréquence en régime permanent (courbes du bas pour chaque métal).

4.2.2. Mesures hydrodynamiques

4.2.2.1. Préparation des capteurs

Le même protocole de préparation des polyélectrolytes et des bactéries a été utilisé pour des mesures en mode hydrodynamique, visant notamment à améliorer la continuité du fluide sur le capteur et à mieux contrôler son déplacement au voisinage de la surface.

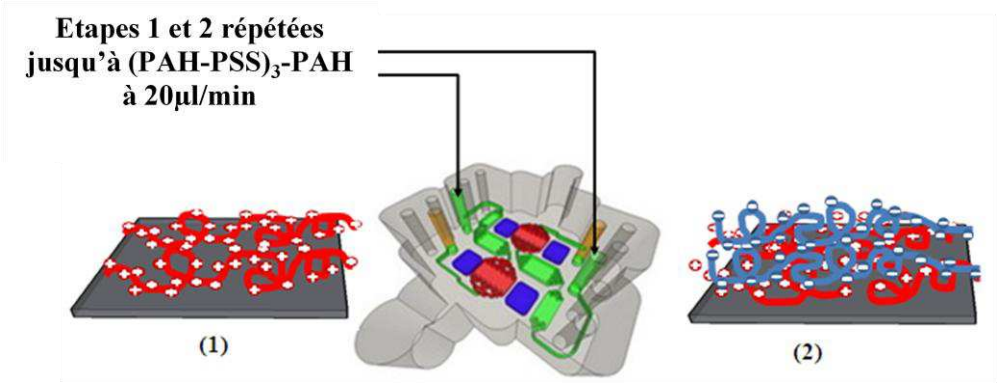


Figure 4- 8: Etapes de dépôt de polyélectrolytes en configuration hydrodynamique.

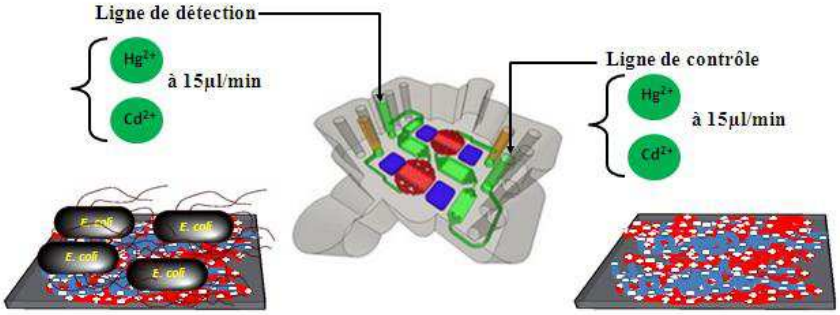


Figure 4-9 : Etapes de détection de métaux lourds en hydrodynamique en présence d'une ligne de contrôle.

La variation de fréquence en temps réel nous a permis d'optimiser le débit d'écoulement, en effet on a choisie à chaque fois un débit qui permet à la fois d'avoir une meilleure variation de fréquence ΔF sur temps le plus court. On discutera dans la suite les différents résultats obtenus pour les différentes étapes d'élaboration et de réalisation de ce biocapteur.

Les dépôts de PEM et de bactéries ont été suivis en temps réel par leur effet sur la vitesse des ondes acoustiques (et donc la fréquence d'oscillation) et la perturbation de surface induite par le dépôt. La réponse aux polyélectrolytes et la reproductibilité des résultats ont été présentés dans le chapitre 3. Un débit optimal a été trouvé à 15 µl/min pour les bactéries, avec une diminution de fréquence après quelques minutes, conduisant à l'observation directe de leur immobilisation et à un signal électronique stable après 20 min environ. Une variation de fréquence de 3 à 5 fois plus grande a été observée par rapport à celle obtenue pour l'immobilisation en statique des bactéries (Figure 4-10), pouvant être liée à une meilleure densité de bactéries en surface, ou un comportement mécanique équivalent différent en surface et laissant espérer une augmentation de la sensibilité du biocapteur aux métaux lourds.

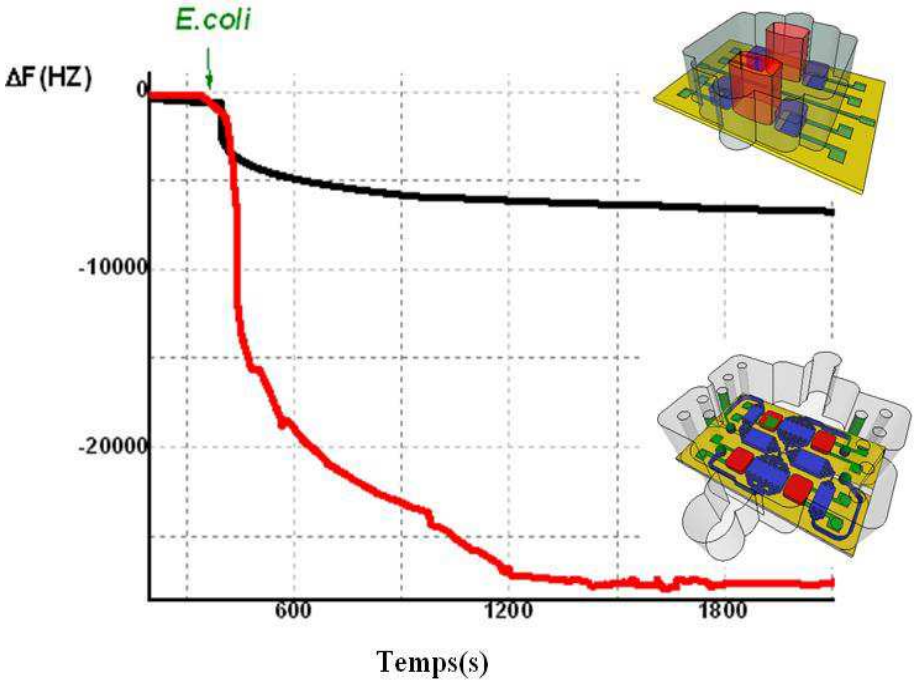


Figure 4-10 *: Comparatif des réponses fréquentielles aux bactéries entre les deux protocoles, statique et microfluidique.*

4.2.2.2. La détection des ions Hg^{2+} et Cd^{2+}

Les réponses en temps réel à différentes concentrations de Cd^{2+} et Hg^{2+} ont ensuite été étudiées (Figure 4-11). Un débit optimal de 15µl / min a aussi été retenu pour la détection des métaux lourds, chaque étape de détection à une concentration donnée étant suivie par une

étape de nettoyage au TBS avant introduction de l'échantillon à une nouvelle concentration. Comme en statique, les courbes montrent une fréquence croissante en présence de métaux lourds et augmentant avec leur concentration, jusqu'à 10^{-3} mol.l^{-1}, avec un seuil de détection très inférieur à 10^{-12} mol.l^{-1}. A noter qu'il n'a pas été jugé opportun d'effectuer des tests de détection à des concentrations inférieures à 10^{-12} M, pour l'application considérée et du fait du risque de contamination rapide de l'échantillon par rapport à des valeurs aussi faibles.

Ainsi, les résultats trouvés en dynamique sont qualitativement similaires aux résultats observés précédemment par mesures en régime statique. Quantitativement, le système microfluidique, comme attendu, a permis une amélioration des caractéristiques : le temps de réponse a été significativement réduit avec une détection efficace en 60 secondes, et la sensibilité a été améliorée, comme le montrent les résultats synthétisés dans le Tableau 4-2. Ainsi, la géométrie des chambres d'analyse, plus petites (100 à 300 microns de hauteur), et la circulation du fluide, ont permis une meilleure distribution du liquide, améliorant l'efficacité des interactions entre les bactéries et la couche sensible, également entre les ions métalliques et les bactéries.

Sont également à relever les éléments illustrant la reproductibilité des résultats, sur les graphiques du bas de la Figure 4-11, étudiée à partir des réponses de quatre expériences similaires avec différentes lignes à retard. Comme en régime statique, il apparaît des écarts-types qui augmentent avec la concentration de l'ion métallique. Ce phénomène peut s'expliquer par le cumul des incertitudes suite à chaque nouvelle injection de solution, de concentration croissante, et du fait de la variabilité de la réponse des bactéries, renforcée par la plus longue durée d'exposition, puisque les concentrations élevées sont introduites après passage par des concentrations plus faibles, mais néanmoins ressenties par elles.

Ces résultats sont à rapprocher d'autres, publiés récemment, par exemple un capteur microfabriqué de bismuth ayant permis la détection d'une concentration minimale de cadmium de $2{,}8.10^{-8}$ M, très supérieure à celle démontrée dans le cadre de nos travaux.

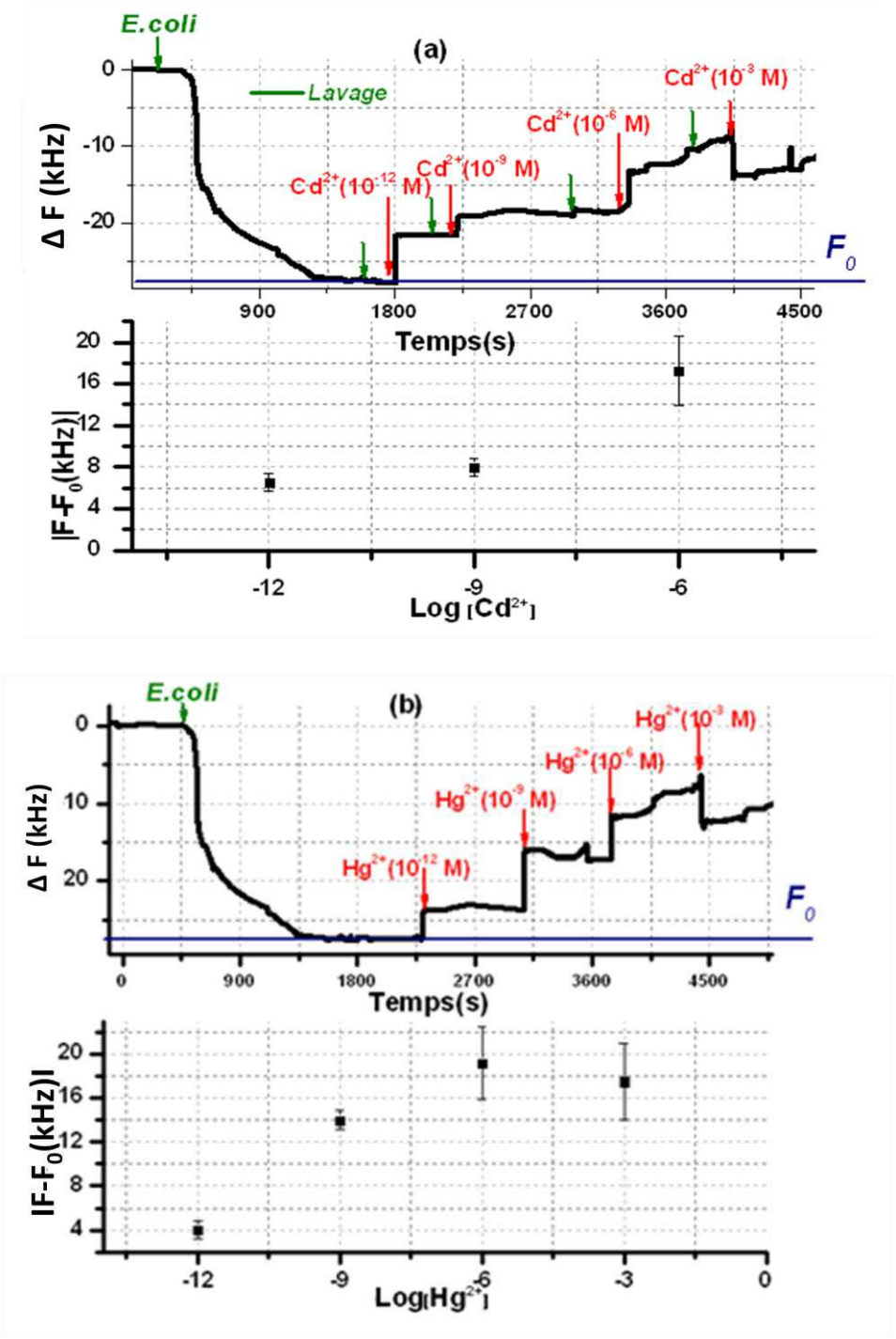


Figure 4-11: Réponse du capteur acoustique à l'immobilisation de E. coli (biorécepteur) et l'ajout de concentrations croissantes (a) de cadmium Cd (II) et (b) de mercure Hg (II) Courbes du haut : Variation typique de fréquence en temps réel (fréquence de résonance: 116 383 MHz) Courbes du bas : Réponses en régime permanent et reproductibilité des résultats ; les valeurs moyennes et les barres d'erreur représentant l'écart-type ont été calculées à partir de 4 expériences avec différentes lignes à retard

Tableau 4-2 : Comparaison des valeurs de la variation de fréquence cumulée à l'état stationnaire | F-F0 | (en kHz), pour la détection des métaux lourds avec les deux protocoles : statique et hydrodynamique.

	$[M^{2+}](M)$	**10^{-12}**	**10^{-9}**	**10^{-6}**	**10^{-3}**
	Métal lourd				
Mesure statique	**Cd^{2+}**	3±0.52	3.5±0.51	5±1.15	6±1.42
	Hg^{2+}	2.5±0.5	4.5±1	7±1.32	7.5±0.86
Mesure dynamique	**Cd^{2+}**	6.5±0.84	8±0.88	17±3.30	14±3.5
	Hg^{2+}	4±0.85	14±0.86	19±3.32	17±3.51

4.3. Etude par AFM

4.3.1. Etape de calibration : Etude en milieu physiologique (et non agressif)

En parallèle de l'étude effectuée par AFM à l'air sur les bactéries (chapitre 3) et avant d'étudier l'effet de la toxicité des métaux lourds, nous avons tout d'abord mis en place une sorte d'étape de calibration de l'expérience qui consiste à analyser ces échantillons « in vitro et en milieu non agressif » autrement dit, en milieu liquide et plus précisément physiologique, le TBS sans métaux lourds.

La préparation des échantillons pour ce type d'expérience consiste tout d'abord à immerger le capteur traité (substrat de référence SiO_2 recouvert de 3 bicouches de PEM en finissant par une couche de PAH) dans une suspension bactérienne d'*E.coli à* D.O = 0,6, puis à incuber pendant une durée de 4 heures à une nuit à une température de 37 °C. L'échantillon est ensuite nettoyé abondamment avec de l'eau milliQ et déposé dans une chambre de test AFM avec 25 µl de TBS.

Comme indiqué auparavant (chapitre 2), nous n'utilisons en milieu liquide que le mode contact et, pour chaque expérience, nous calibrons tout d'abord la sonde (pointe-levier) en caractérisant le substrat de référence (le capteur nu) ainsi que le capteur recouvert de PEM et enfin nous pouvons démarrer l'étude du biocapteur (en présence de bactéries). Pour chaque expérience et pour pouvoir suivre l'évolution des surfaces, plusieurs informations sont enregistrées : la topographie (image en hauteur, trace et retrace), l'image de déflexion (signal d'erreur) ainsi que l'image de friction correspondante. Nous essayons, pour chaque échantillon, de sonder plusieurs zones afin d'en avoir une vision la plus représentative.

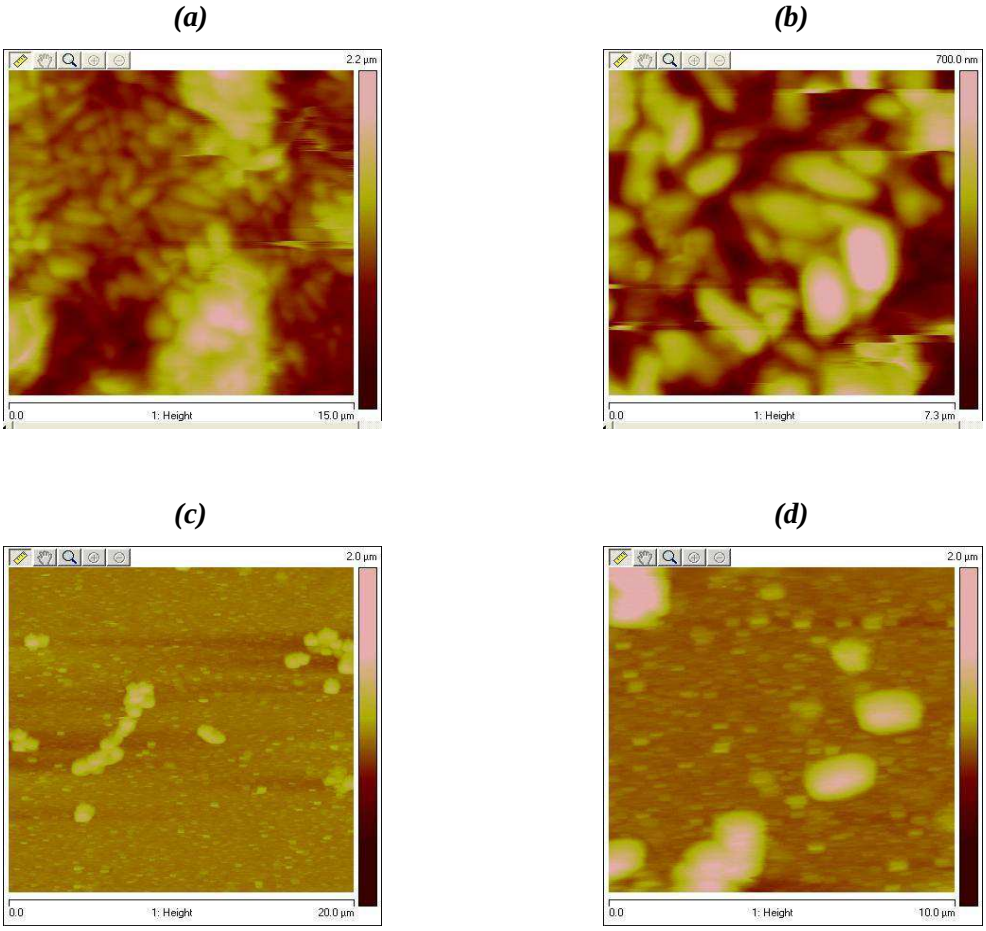


Figure 4-12 : Résultats obtenus en mode contact et en milieu liquide sur deux zones différentes de la surface les plus caractéristiques d'une population bactérienne. Ne sont reportées que les images de hauteur (images topographiques).

Parmi les nombreux résultats obtenus, nous avons reporté sur la Figure 4-12 deux exemples extrêmes mais typiques de ce qui peut être obtenu avec ce type d'échantillon. Ces résultats montrent la présence de populations bactériennes avec des densités très variables. Pour l'un (Figure 12a et 12b), la population est fortement dense et bien immobilisée sur le substrat, sous forme d'une matrice, avec des regroupements en micro-colonies. Pour l'autre (Figure 12c et 12 d), la densité est beaucoup moins importante, les bactéries étant parfois isolées et d'autres regroupées à l'image d'un « chapelet ».

Pour l'ensemble de ces échantillons, les bactéries ont une forme elliptique, intermédiaire entre la forme allongée de bâtonnets ou celle de sphères.

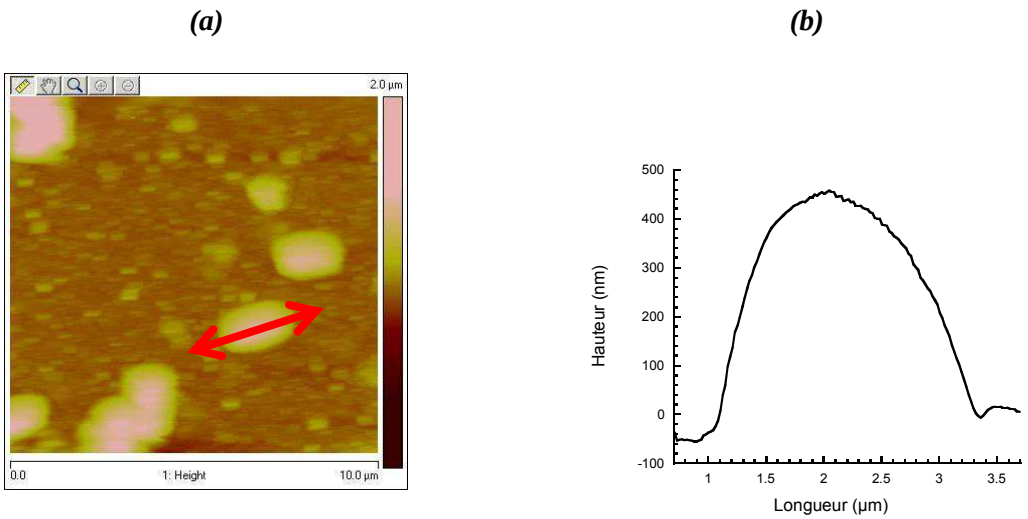


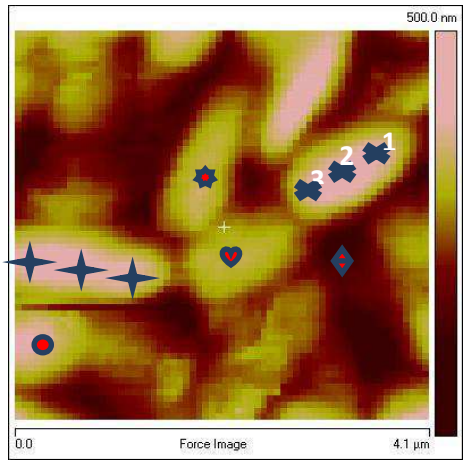
Figure 4-13 : a) Image topographique de bactéries isolées b) Section effectuée sur une bactérie isolée de caractéristiques typiques: longueur ~1,8 µm ; largeur à mi-hauteur ~ 1 µm ; Hauteur ~ 500 nm.

En ce qui concerne le dépôt le plus dense et après avoir effectué une étude statistique sur plusieurs images « grand champ », un taux de recouvrement du biocapteur par les bactéries de l'ordre 80 % a pu être estimé. Ce taux dépend bien évidemment du prétraitement du biocapteur (nombre de couches PE, pH, etc.) mais aussi et comme nous le montrerons plus loin, de la durée séparant le temps de préparation du dépôt des bactéries et le temps où les expériences AFM sont effectuées.

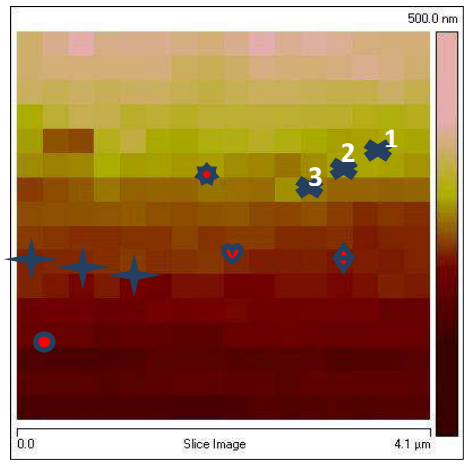
Pour compléter l'étude, une analyse systématique des propriétés mécaniques des bactéries pour chaque dépôt a été menée, pour les corréler aux propriétés du biocapteur en fonction des différents paramètres testés. Cela a été effectué, soit via des mesures de courbes de forces, soit via des images « force volume », images où l'on a, à la fois, la topographie de la zone sondée et la courbe de force correspondante, comme représenté en Figure 4-14. L'objectif, dans le cadre de cette analyse, vise une première approche qualitative.

Les courbes représentées en figure 4-14-c et 4-14-d montrent respectivement une comparaison des comportements de la bactérie par rapport au substrat et sur trois zones d'une même bactérie (centre et bords). Des résultats équivalents ont été obtenus sur quartes bactéries différentes suivies.

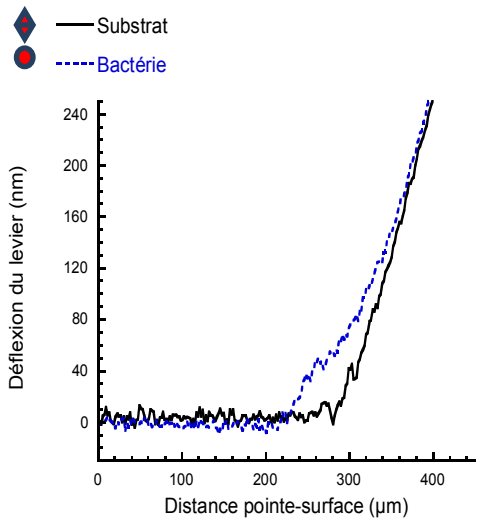
(a) Image de hauteur (Topographie)



(b) Image spectroscopique (Force)



(c) Comparaison des CF entre le substrat et sur le côté de la bactérie



(d) Différentes courbes de forces obtenues au milieu de la même bactérie mais à différentes zones

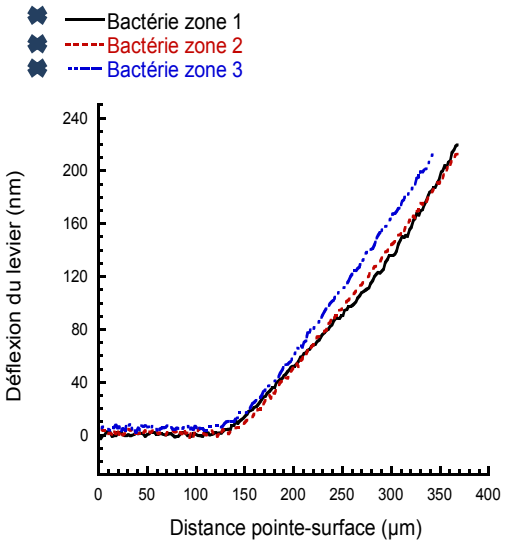


Figure 4-14 : Expérience de force volume effectuée sur une population bactérienne (population dense) sur une surface SiO_2 de capteur.

Les trois zones différentes de la bactérie (Figure 4-14-d), montrent un comportement élastique et une morphologie identiques.

4.3.2. Surveillance du stress bactérien en présence de métaux lourds par AFM en milieu liquide

Pour suivre l'effet des métaux lourds, nous avons tout d'abord calibré la pointe sur le substrat de référence, en milieu liquide (capteur nu, puis recouvert d'un film de PE) via des expériences couplées (images et mesures de force) et nous avons ensuite procédé à la caractérisation des échantillons en présence de population bactérienne avant et après injection de Cadmium.

L'exemple présenté sur la Figure 4-15a est typique des résultats obtenus en milieu physiologique non agressif (solution de TBS) en utilisant le protocole mis en place. Une analyse brève de cette figure montre que, dans notre cas, et en l'absence de substances toxiques, les trois bactéries ont une forme elliptique et semblent être bien fixées sur la surface. En effet, la perturbation sur ces bactéries liée au balayage de la pointe est quasiment nulle. Nous nous proposons, par la suite, de suivre le comportement de ces trois bactéries, sans, et en présence, de toxiques.

L'étape suivante consiste à injecter une solution de métaux lourds (Cd^{2+}), à une concentration égale à 10^{-3} M.

(a) Avant injection de métaux lourds *(b) Après injection de métaux lourds*

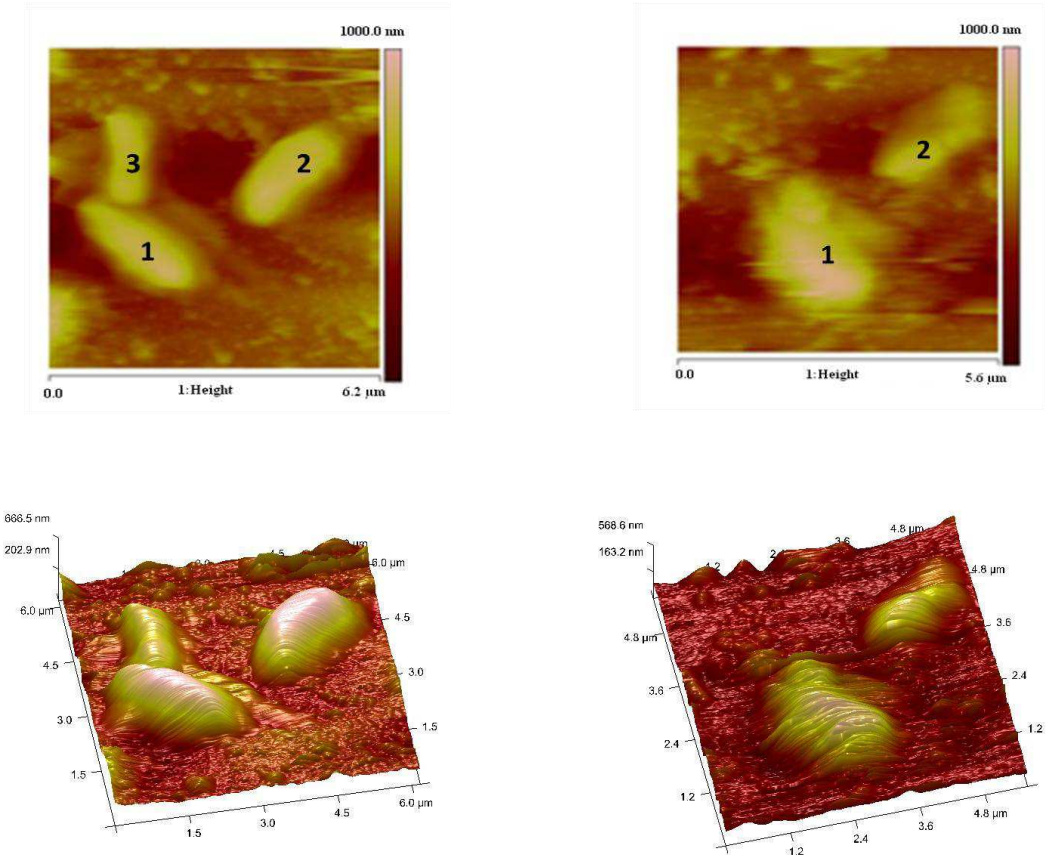


Figure 4-15 : Suivi du comportement d'une population de 3 bactéries (1 à 3), avant et après injection de cadmium (AFM en mode contact, en milieu liquide), images 5×5 μm^2 : 2D (haut), 3D (bas). On remarque que la bactérie n°3 a disparu et que les bactéries n°1 et 2 ont changé de morphologies.

La caractérisation après injection nécessite une phase de thermalisation, après la mise en place d'un protocole adapté et correspondant à une durée de l'ordre de quelques minutes. En effet, la solution injectée n'est pas nécessairement à la même température que le bain dans lequel se trouve initialement la sonde, ce qui peut induire des dérives empêchant l'expérience d'être menée dans de bonnes conditions à savoir le suivi d'une même bactérie, et peuvent même induire la dégradation de la zone sondée (évolution de la force appliquée avec dérive).

Dès le système à nouveau thermalisé, la reprise de l'analyse de la surface a permis d'observer l'évolution de 3 bactéries. Ainsi, il est visible sur les images de la Figure 4-15, que l'exposition aux métaux lourds, additionnée aux perturbations provoquées par le mouvement de la pointe AFM, ont impliqué le déplacement d'une partie importante de la bactérie voire même le détachement du substrat de certaines d'entre elles (bactérie n°3) suite au balayage de la pointe. Ces bactéries retournent bien évidemment dans la solution. Les bactéries restées

fixées (n°1 et 2), ont évolué, avec, entre autres, des contours devenus « accidentés » et flous. Cette moins bonne définition des contours suggère une modification de l'intégrité de la bactérie ainsi que, probablement de ses propriétés adhésives.

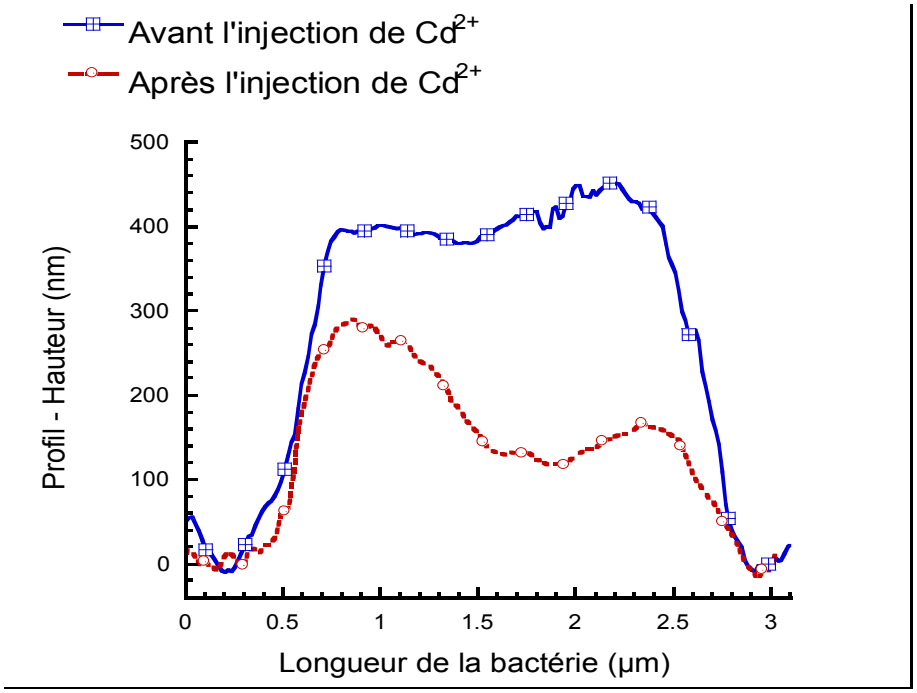


Figure 4-16 : Suivi du comportement de la bactérie numéro 2 par l'évolution de son profil (section longitudinale), avant et après exposition au cadmium (AFM en mode contact et en milieu liquide).

La Figure 4-16 porte une section (profil) effectuée sur la même bactérie, avant et après injection de Cd^{2+}. Ce graphe rend bien compte de ce qui s'est passé, ne serait-ce que d'un point de vue qualitatif, à savoir l'évolution de la morphologie de la bactérie, ainsi que de la réduction de son volume. En effet, la surface projetée de la bactérie est restée sensiblement la même alors que la hauteur de la bactérie a fortement diminué (voir annexe). Ce constat permet de faire l'hypothèse que la bactérie a pu se vider de son contenu (phénomène de lyse), ce qui semble confirmer les hypothèses émises.

Par ailleurs, des expériences effectuées en mode force (courbe de force) ont permis de donner des résultats tout à fait cohérents avec l'ensemble des observations précédentes, déduites des données topographiques.

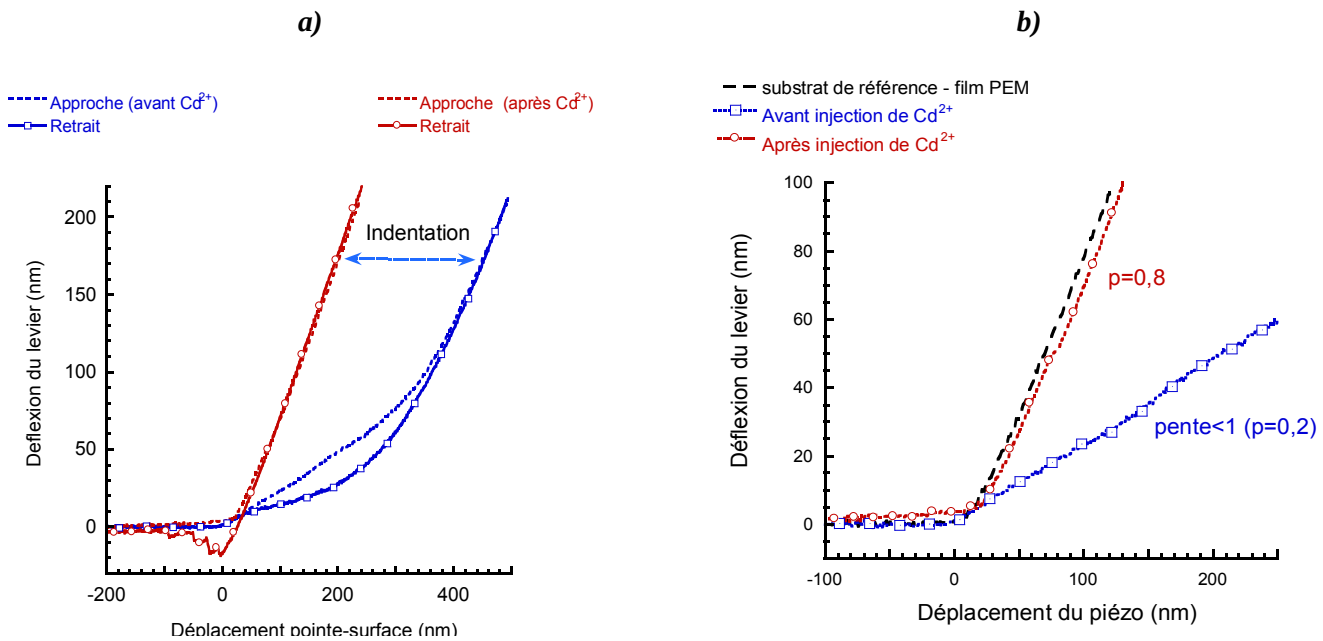


Figure 4-17 : Suivi du comportement d'une population bactérienne avant et après ajout de cadmium (mode contact et en milieu liquide) ; (a) Courbes de force « approche et retrait » effectuées sur la même bactérie avant et après l'addition de Cd^{2+} ; (b) Zoom de ces courbes force en approche, qui met en évidence le fait que l'élasticité de la bactérie dégradée par le Cd^{2+} est similaire à celle du substrat (pente= 0,8 alors que pour la bactérie saine elle est de 0,2).

En effet, et d'après l'exemple de la Figure 4-17, plusieurs constatations peuvent être faites. Tout d'abord, la courbe de force obtenue sur la bactérie avant injection de Cd^{2+} est non linéaire avec une pente faible p ($p< 1$), sachant que $p=1$ sur un substrat dur, le substrat de référence, suggérant ainsi un comportement « élastique et mou » de la bactérie saine. Nous observons aussi pour cette même courbe une hystérésis entre les courbes approche et retrait, correspondant à un comportement viscoélastique de la bactérie. En effet, la pointe AFM après avoir indenté la bactérie (lors de l'approche) la comprime induisant une modification de sa raideur effective locale, ce qui implique une augmentation légère de la pente et par conséquent fait apparaître l'hystérésis. Un module élastique peut être extrait de ces courbes mais il faut veiller à calibrer la mesure de la force et à respecter le protocole expérimental pour ce genre de manipulations. Nous n'avons pas cherché, dans le cadre de cette thèse, à extraire une information quantitative mais plutôt qualitative.

Par ailleurs, on constate que la pente de la courbe de force après injection de Cd^{2+} augmente pour tendre vers celle du substrat (film de PE sans bactérie), suggérant ainsi que le comportement élastique de la bactérie a beaucoup évolué en lien avec la toxicité du milieu et correspond à celui du substrat, comme si la bactérie n'avait plus de corps cellulaire, ce qui rejoint les observations topographiques (Figure 4-15- b). Par conséquent, cette modification de l'élasticité cellulaire peut être corrélée à la dégradation des bactéries.

Et enfin, après avoir analysé un grand nombre de résultats expérimentaux obtenus en présence de métaux lourds, il est apparu que les réponses mécaniques des bactéries (courbes de forces, notamment les courbes de retrait) n'étaient pas similaires pour différents échantillons (et pour différentes bactéries d'un même échantillon) ni même très reproductibles pour la même bactérie d'un échantillon donné, contrairement aux expériences effectuées sur les bactéries avant injection de métaux lourds. En effet, quand la pointe AFM se retire après avoir indenté la bactérie « dégradée » elle se contamine par le contenu de la cellule bactérienne dégradée et cela se retrouve dans les déflexions négatives et les multi-ruptures (Figure 4-17) ce qui est lié à des états variables des cellules dégradées.

4.4. Amélioration du capteur à onde de Love par ajout d'une couche mince mésoporeuse de TiO_2

Enfin, de manière totalement parallèle aux travaux menés avec l'AFM, nous avons envisagé l'ajout d'une couche de TiO_2 mésoporeux sur la couche guidante de SiO_2 en surface du capteur à ondes de Love, entre les transducteurs interdigités, pour notre application. La caractérisation des propriétés mécaniques de films minces mésoporeux par onde acoustique a fait l'objet des travaux de thèse de L. Blanc. (2011) qui ont été menés en collaboration avec le LCMCP (Laboratoire de Chimie et de la Matière Condensée de Paris, CNRS-UMR 7574) où sont réalisées les solutions mésoporeuses de TiO_2. L'utilisation de ce type de matériau, dans le développement de couches sensibles, est due à sa surface active importante, autorisant un nombre élevé de sites disponibles pour la sorption, avec la possibilité d'être fonctionnalisé, assurant ainsi la spécificité du dispositif de détection. Ils constituent de ce fait d'excellents candidats pour les applications capteurs **[142].** Par ailleurs, une comparaison entre la silice et le titane menée par Bass *et al.* **[143]** a montré, d'une part, que l'utilisation de solution saline sur des surfaces de silice engendre à long terme la dégradation de cette dernière, et d'autre part, que le TiO_2 mésoporeux possède une bonne stabilité mécanique et chimique pour des applications biologiques. L'ensemble de ces caractéristiques, conjuguées au savoir-faire disponible, nous a encouragés à utiliser la solution mésoporeuse de TiO_2 réalisée.

L'étude a été menée avec une plate-forme à ondes de Love recouverte d'un film mésoporeux de TiO_2, selon un procédé décrit en détail dans **[144]**. Brièvement, il s'agit d'un dépôt sol-gel à basse température, ayant permis d'obtenir un film mince de 100 nm environ d'épaisseur, avec des pores dont la taille varie entre 6 nm et 9 nm environ.

Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le premier dispositif « classique » (Quartz-SiO_2). Les tests avec ce nouveau capteur ont été réalisés avec la cellule de test en régime statique, qui représente notre référence pour la validation d'améliorations apportées au biocapteur. Les protocoles de préparation et de dépôt des éléments ont été présentés précédemment et ne sont pas repris ici.

4.4.1. Réponse acoustique au dépôt du biofilm

Une comparaison de la réponse en temps réel des capteurs sans et avec couche de titane à l'immobilisation des PEM et des bactéries est présentée sur la Figure 4-18. Une diminution de fréquence plus importante dans le cas du capteur modifié a été observée systématiquement, au dépôt de la première bicouche de PEM, 9,7 kHz au lieu de 3,4 kHz en moyenne, tandis que la réponse cumulée à l'ensemble de la multicouche reste sensiblement la même. Cette amélioration de la réponse à la bicouche (PAH_1-PSS_1) peut être expliquée par un meilleur ancrage du film de polyélectrolytes sur la surface de TiO_2, présentant une plus grande surface apparente avec des pores de quelques nanomètres de diamètres, et une charge électrique de surface opposée à celle du PAH. Les pores une fois remplis, la suite du multicouche n'induit pas nécessairement une différence de réponse sensible.

Puis, une augmentation de réponse à l'immobilisation des bactéries est également observée, avec une diminution d'environ 18 kHz au lieu de 6 kHz, et une bonne reproductibilité du signal comme nous le verrons sur la figure suivante. Cette augmentation de la réponse, peut, à son tour, être justifiée par un film PEM plus rigide car mieux ancré sur la surface de TiO_2, et ainsi susceptible de mieux propager l'énergie élastique ; ce film peut également présenter une charge surfacique électrique plus élevée, qui favorise l'interaction avec la cellule bactérienne puisque l'adhésion de la bactérie *E. coli* est principalement attribuée aux liaisons de Van der Waals non spécifiques et à l'attraction électrostatique entre les charges positives de PAH et les charges négatives externes des bactéries.

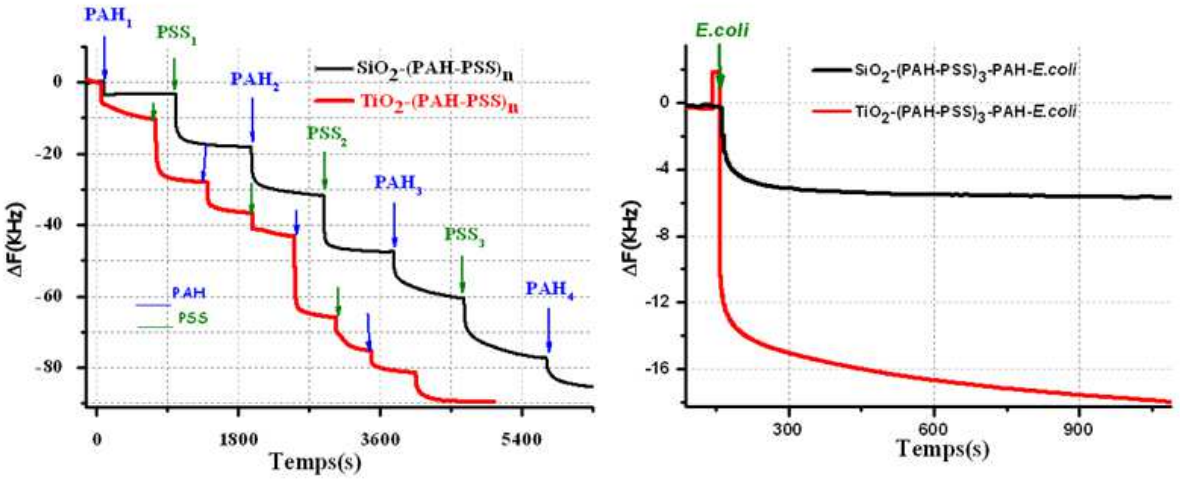


Figure 4-18 *: Comparaison de la variation de fréquence en temps réel de l'oscillateur à ondes acoustiques au dépôt du biofilm PEM (a) et bactéries (b) sur SiO_2 (4 µm) et SiO_2 (4 µm) + TiO_2 (100 nm).*

4.4.2. Réponse acoustique pour la détection du cadmium

Une réponse typique en temps réel d'un dispositif à ondes de Love modifié par une couche d'oxyde de titane mésoporeux biofonctionnalisée par des bactéries sur matrice de PEM, à différentes concentrations de cadmium croissantes, de 10^{-12} à 10^{-3} M, est présentée sur la Figure 4-19-a. La Figure 4-19 -b illustre la comparaison des variations de fréquence en régime permanent, ainsi que la reproductibilité des résultats, au dépôt des bactéries puis en fonction de différentes concentrations de Cd (II), sur les deux types de capteurs : Quartz+SiO_2 et Quartz+SiO_2+TiO_2 (100 nm).

Quelques minutes après ajout du cadmium, il est observé sur la Figure 4-19 -a, une variation de fréquence positive aux faibles concentrations, qui devient négative à une concentration plus forte. Un effet similaire avait été observé sur le dispositif « classique », avec une transition qui se produit ici à partir d'une concentration de 10^{-3} M au lieu de 10^{-1} M. De nouveau, ces résultats sont attribués à des changements dans les propriétés viscoélastiques, liés à des modifications dans le métabolisme bactérien expliquées précédemment. Les dommages apparaissant aux fortes concentrations ont conduit les bactéries à se vider de leur contenu sur la surface, induisant une réponse du capteur très différente, analogue à une augmentation de masse surfacique équivalente ou à une diminution de rigidité apparente (aux fréquences de travail).

Il apparaît sur la Figure 4-19 -b, que les variations de fréquence dues à la présence de cadmium en solution sont plus importantes lors de l'utilisation de la couche mésoporeuse. Ces résultats valident l'amélioration de la sensibilité du capteur à l'aide de ce film mésoporeux, comme nous l'espérions.

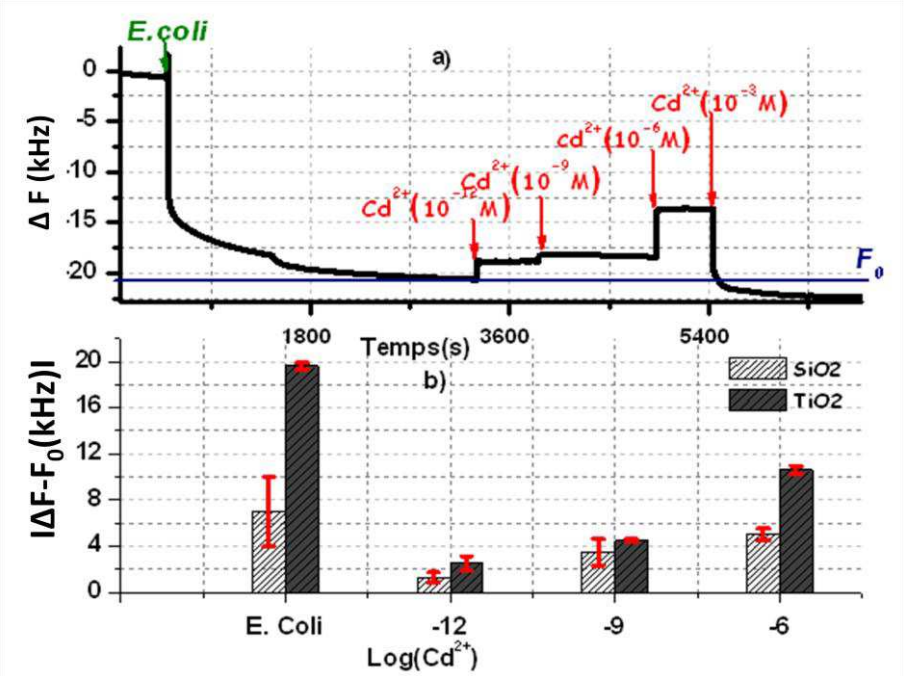


Figure 4-19 : Réponse en fréquence du capteur à ondes acoustiques (SiO_2 + TiO_2 (100 nm)) au Cd (II) a) Variations de fréquences en temps réel (fréquence de résonance : 119,451 MHz) relatives à l'immobilisation de E. coli (biorécepteur) et l'ajout de concentrations croissantes de Cd (II), b) Variation de fréquence en régime permanent et reproductibilité des résultats, les valeurs moyennes et les barres d'erreur ont été calculées à partir de 4 expériences avec différentes lignes à retard sur les deux types de capteurs (Quartz+SiO_2 et Quartz+SiO_2+TiO_2 (100 nm).

4.4.3. Etude par AFM de la durée de vie du capteur

Afin d'étudier l'immobilisation bactérienne et la durée de vie des capteurs, la préparation d'un dispositif pour des tests acoustiques a été doublée de la même préparation sur un autre capteur, destiné à des caractérisations par AFM. Après incubation du dispositif avec la suspension cellulaire de bactéries *E.coli* (D.O de 0,6) suivie d'un rinçage minutieux, l'échantillon séché sous flux d'azote a été contrôlé par AFM. Un suivi de l'évolution de la surface du capteur a été réalisé tous les 7 jours ; avec stockage à 4°C dans l'eau MilliQ.

Nous nous sommes intéressés à deux capteurs : le capteur optimisé, celui avec un film de TiO_2 (100 nm) et le capteur classique à base de SiO_2 (4 µm).

Nous avons opté, dans le cadre de cette étude, pour effectuer des expériences AFM à l'air et en mode tapping sur des échantillons qui sont bien évidemment vivants. Notons que l'analyse par ce mode puisqu'il est effectué à l'air a été choisie pour éviter des artefacts et afin de minimiser les forces de cisaillement.

Nous avons suivi l'évolution, en fonction du temps, de la morphologie des bactéries, de leur volume, de leur densité et d'autres caractéristiques. Nous présenterons principalement des données topographiques (images de hauteur) mais nous reporterons aussi, lorsque nécessaire, les images d'amplitude pour révéler certains détails qui ne seraient pas visibles sur les images topographiques.

La Figure 4-20 montre les résultats obtenus par AFM sur les deux biocapteurs à base de bactéries, avec et sans TiO_2, 7 jours après l'immobilisation des bactéries.

Dans les deux cas du capteur à base de TiO_2, on observe la coexistence de deux formes de bactéries sur le même échantillon : des bactéries, « sphériques », et des bactéries de grande taille, « elliptiques » (Figure 4-20-a, b, c). Les dimensions mesurées sont typiquement de l'ordre de 1,4 µm de longueur, 340 nm de hauteur et 0,6 µm de largeur en moyenne pour les bactéries elliptiques, et pour les sphériques, environ 1 µm de diamètre et 400 nm de hauteur. En outre, et comme le montre la Figure 4-20-a, certaines cellules semblent être reliées entre elles de bout en bout ou côte à côte et il n'y a pas d'orientation privilégiée des bactéries sur cet échantillon.

Dans le cas du second échantillon, le capteur classique à base de SiO_2, l'image topographique sur 20µm (Figure 4-20-c) montre des bactéries de formes proche que celle qui apparaissent sur le premier échantillon mais la figure 4-20-f montre qu'elles sont aplaties par rapport à celles sur le TiO_2 de la figure 4-20-c. En comparant les deux capteurs, on observe sur les images topographiques de 20 µm une bonne homogénéité de la répartition des bactéries sur la surface de TiO_2 mésoporeuse par rapport à la surface de SiO_2.

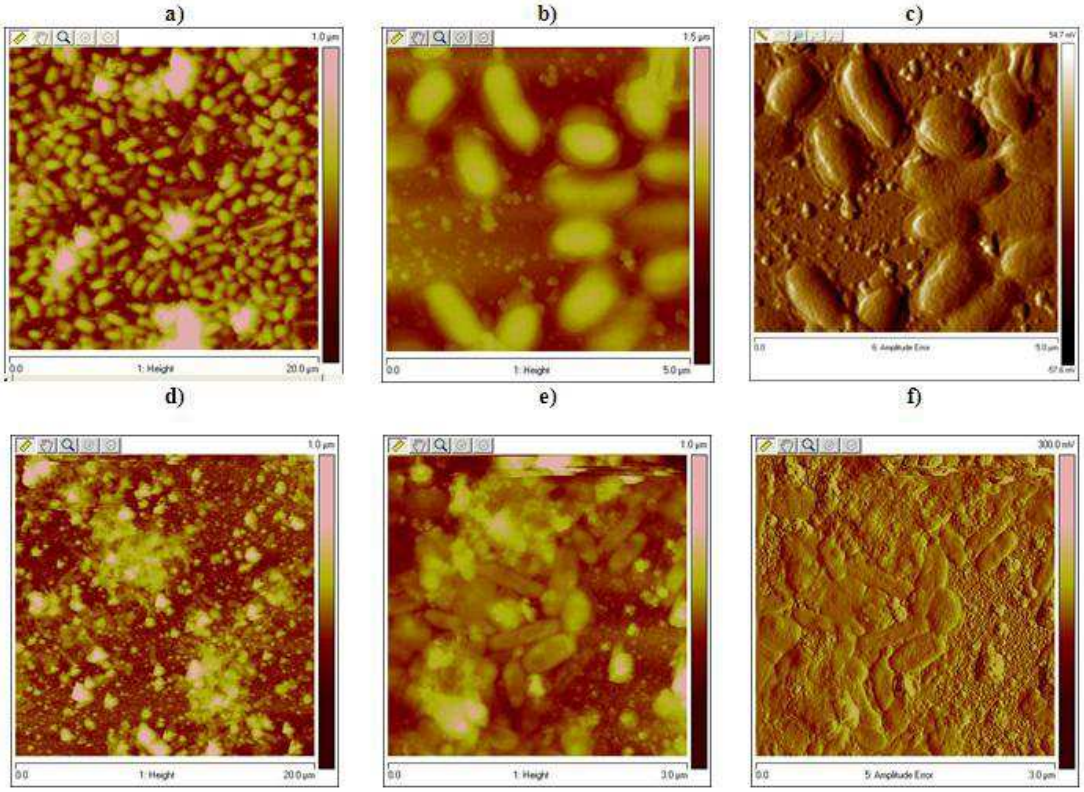


Figure 4-20: Images AFM obtenues en mode tapping et à l'air sur un dépôt d'E. coli après 7 jours (a et b) TiO_2 mésoporeux ; (c) signal d'erreur correspondant (image d'amplitude) ; (d et e) SiO_2 : images topographiques (f) signal d'erreur correspondant (image d'amplitude).

Ainsi, l'image d'amplitude (signal d'erreur) nous fournit des informations sur de petits changements dans la morphologie des bactéries qui peuvent ne pas être visibles sur l'image topographique en raison de l'importance de l'échelle en z.

L'étude de la durée de vie du capteur a été réalisée sur un mois, une première observation par AFM la première journée (J1 = jour1), une seconde le jour 7 (J7), une troisième le jour 15 (J15) et enfin la dernière, le 29ème jour (J29). En se basant sur les résultats typiques présentés dans la Figure 4-21 et d'un point de vue qualitatif, nous pouvons faire les premières observations suivantes. Au début, après le premier jour, nous observons que les bactéries ne couvrent pas toute la surface du capteur et sont pour la plupart de forme plutôt sphérique (selon une étude statistique réalisée sur les images en grand champ).

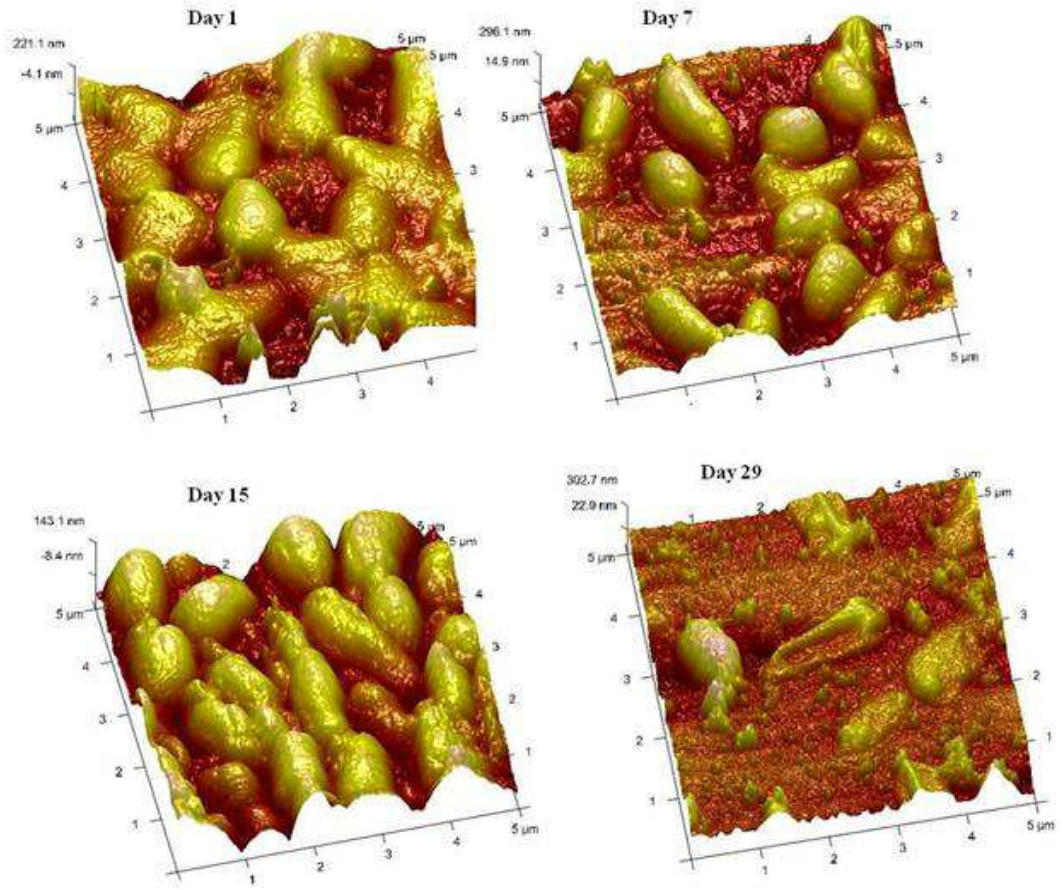


Figure 4-21: Images d'AFM (3D) de bactéries (E. coli) sur le capteur TiO_2 aux 1er, 7ème, 15ème et 29ème jours de la durée de vie du biocapteur (stockage à 4 °C dans de l'eau MilliQ entre deux expériences AFM).

7 jours plus tard, l'intégrité de la cellule bactérienne est encore préservée et la densité de couverture de la surface du capteur par les bactéries évolue légèrement. Mais, le plus important, c'est que nous commençons à observer le changement dans la forme des cellules et la taille, la forme « elliptique » devient dominante. Les mesures faites le 15ème jour confirment ces observations. En effet, nous constatons une augmentation de la surface occupée par les bactéries de l'ordre de 60% (53% au 7ème jour; 86% au 15ème jour et 48% à J29 (Figure 4-21). Ainsi, il apparaît que, malgré un stockage non favorable à la multiplication des bactéries, un biofilm avec une forte densité a été conservé pendant plus de 15 jours. Cela peut être expliqué par le fait que les bactéries continuent à faire la synthèse de leurs protéines à partir de substances azotées. Cet azote peut provenir d'une simple réaction avec la couche de PAH (NH^{3+}). Dans tous les cas et jusqu'au 15ème jour, les bactéries semblent maintenir un aspect hydraté sans effondrement de la paroi cellulaire. Au 29ème jour, les images sont très différentes : deux morphologies cellulaires distinctes ont été observées, pouvant être

attribuées à des cellules en train de mourir (stressées, déshydratées ou lysées), d'autres semblent encore résister. En effet, à partir du 29ème jour, une grande partie de la population bactérienne présente sur le capteur de TiO_2, soit une forme aplatie avec des bords relevés, soit un centre gonflé avec des bords réduits. En analysant de grands domaines de surface de ce biocapteur, on observe encore quelques cellules qui semblent avoir la morphologie initiale (quasi-sphérique).

Apparemment, cette forte adhérence de *E. coli* sur la surface de TiO_2-PEM est sensiblement médiatisée par les interactions de ses groupes présentés sur la surface, la force d'adhérence peut être proportionnelle au nombre de liaisons hydrogène formées, des interactions de Van der Waals, en particulier les forces attractives électrostatiques.

La Figure 4-22 compare le volume occupé par les bactéries sur les deux surfaces en fonction des jours, montrant de nouveau une densité plus élevée dans le cas du TiO_2.

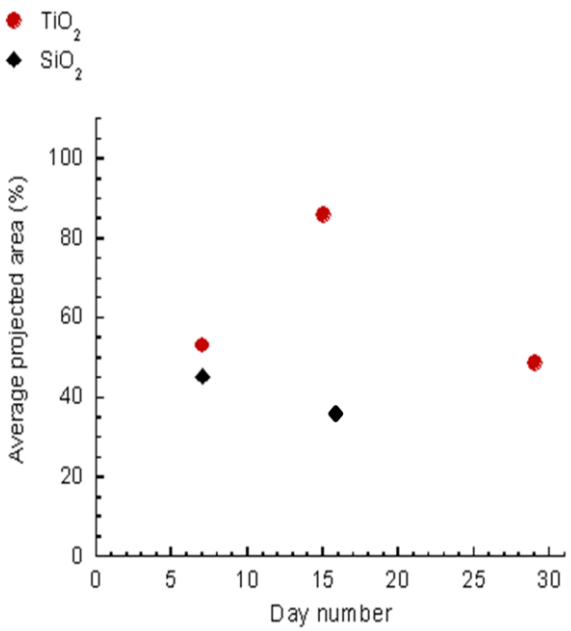


Figure 4-22: Diagramme de dispersion comparant le volume projeté des bactéries et la durée de vie sur deux surfaces différentes (Noir: SiO_2, Rouge: TiO_2).

Ces résultats sont confirmés par une analyse statistique en exploitant ces images AFM, à partir desquelles a été déduit le volume moyen des bactéries et son évolution dans le temps. Les images ont été traitées et les bactéries ont été dimensionnées avec deux logiciels (Gwiddion, Nanoscope analysis) et à l'aide de la formule de calcul du volume **[145,146].** La densité de bactéries par échantillon a été évaluée à partir des paramètres géométriques déduits des images AFM. Les dimensions des cellules ont été estimées après l'application à chaque

image d'une fonction de seuil et d'un filtre de netteté pour identifier le bord de la cellule (il s'applique également à la résolution désirée et à la méthodologie de comptage et de dimension des bactéries).

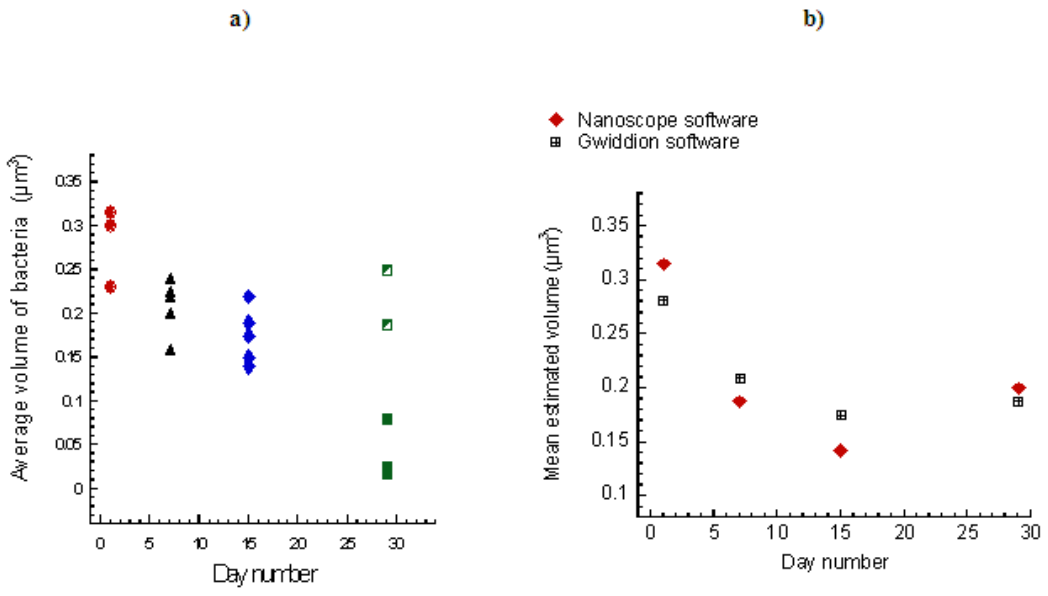


Figure 4-23: Diagramme de dispersion montrant l'évolution du volume des bactéries en fonction du temps a) volume moyen pour 5 bactéries distinctes b) volume moyen estimé calculé avec deux logiciels (Noir: Gwiddion, Rouge: l'analyse Nanoscope).

Les résultats ont été reportés sur le graphe de la Figure 4-23, qui montre une diminution du volume au fil du temps, ce qui paraît normal et cohérent avec nos observations, et permet d'identifier deux types de populations de bactéries. Nous supposons que ces différences entre le 15ème jour et 29ème jour peuvent être dues à des effets de déshydratation qui impliquent des changements dans la rigidité de la cellule. Ainsi ceci peut être expliqué par la formation du biofilm qui se déroule en quatre étapes **[147].** Tout d'abord, l'accès à la surface, dépend du mode qui permet à une cellule bactérienne d'atteindre la surface. Ce mode de transport peut se faire par la diffusion (mouvement brownien ou de sédimentation) après un processus, essentiellement physico-chimique, ce qui peut être réversible. Puis, les appendices cellulaires (fibrilles, polymères, etc) forment des liens solides entre la cellule et les liaisons superficielles et qui peuvent être irréversibles dans la colonisation sur la surface : c'est la formation du biofilm. Une fois le biofilm obtenu, les bactéries survivent dans un milieu sans nutriments. En effet, les bactéries gèrent la sécrétion des enzymes en fonction de leurs moyens, par exemple lorsqu'elles manquent de nutriments, elles bloquent la fonction de la croissance et la synthèse

des protéines «défenses» contre la dégradation comme la superoxyde peroxydase. C'est ce qui a dû arriver à nos échantillons à la fin du mois. Cela constitue une des hypothèses émises suite à nos observations et qu'il serait intéressant de vérifier par une étude plus approfondie.

4.5. Conclusion

Ainsi, les mesures par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) et en particulier les mesures d'impédances ont été utilisées pour démontrer la validité d'un biocapteur à base de bactéries. Elles ont permis une optimisation de la concentration bactérienne nécessaire pour avoir la meilleure sensibilité aux métaux lourds, cette méthode reste pour le moment limitée puisque les mesures ne se font pas en temps réel.

L'application de ce type de biocapteur, validé par électrochimie, sur le capteur à onde de Love nous a permis de détecter les ions Cd^{2+} et Hg^{2+} en solution, à une concentration très faible de 10^{-12} M et de valider les résultats obtenus par impédance, ceci en un temps très réduit (moins de 60 s), avec un suivi en temps réel, et en considérant deux types de systèmes, l'un hydrostatique, l'autre hydrodynamique. Cela permet dans l'avenir d'envisager l'élaboration d'un microsystème en tant qu'outil d'alarme précoce.

L'AFM paraît comme une bonne technique complémentaire dans cette étude. En effet, nous avons pu observer la dégradation des cellules en temps réel suivant l'injection des métaux lourds, à partir des images topographiques et des courbes de forces sur les bactéries *E. Coli*, confirmant ainsi les hypothèses formulées sur la base des résultats obtenus avec des ondes de Love et l'impédance.

Dans la troisième partie de ce chapitre, l'efficacité de couches minces de TiO_2 mésoporeux (100 nm) a été validée. Avec ce film utilisé comme une surcouche au-dessus de la couche guidante de SiO_2 du capteur, il a été montré que la sensibilité avait été améliorée. Nous avons supposé que cela était lié à la porosité et la taille des pores de la couche d'oxyde de titane, ce qui entraîne une bio-fonctionnalisation plus efficace sous forme du film hybride (polyélectrolyte multicouche - bactéries). D'autres investigations avec des porosités différentes pourraient étayer cette hypothèse. En outre, des résultats d'AFM ont été utilisés pour déterminer la stabilité de la membrane bactérienne. Une durée de vie de plusieurs semaines a été observée, ce qui démontre la bonne stabilité du capteur modifié.

Suite à ces travaux, nous pouvons conclure que l'étude de ce dispositif est particulièrement intéressante car elle permet de concilier l'aspect pratique du développement de systèmes

directement utilisables pour des applications industrielles (surveillance de la pollution) et l'aspect recherche fondamentale au niveau de l'étude des interactions biochimiques entre l'espèce à détecter et le métabolisme cellulaire. La combinaison de ces deux éléments a été essentielle pour une meilleure progression des travaux.

Conclusion générale

De nombreux domaines liés aux activités humaines et à l'environnement nécessitent de développer de nouvelles technologies de détection ultra-sensible et rapide des polluants. Le biocapteur est devenu aujourd'hui très intéressant du fait de ses nombreuses applications dans divers domaines.

Dans un premier temps, l'état de l'art nous a permis de contextualiser notre problématique vis-à-vis des recherches actuelles concernant les biocapteurs, et de souligner les avantages et inconvénients des différents types de transducteurs les plus utilisés pour la réalisation de biocapteurs dédiés à la détection d'une multitude d'analytes. Ainsi, en comparaison des travaux existants, nous avons choisi de mettre en place un système simple, sensible, efficace et fonctionnalisable pour la détection d'un spectre large d'analytes, à un moindre coût.

Dans sa première partie, ce travail a nécessité la mise au point d'une méthode d'immobilisation des bactéries *Escherichia Coli* sur des supports solides modifiés par un film multicouche de polyélectrolytes (PEM).

Dans une seconde partie, fonctionnalisation, immobilisation des bactéries et détection de cadmium et de mercure ont été effectuées en utilisant deux techniques de détection : les mesures impédimétriques, réalisées à Monastir, et le suivi par capteur à onde acoustique de Love, à Bordeaux. Ce dispositif a notamment permis de mettre en évidence des seuils de détection extrêmement bas (détection de cadmium et de mercure) par rapport à ceux présentés dans la littérature, et proches des seuils normatifs. Deux configurations de cellules de test ont été réalisées, l'une en statique (injection de fluide sur le capteur par une micropipette), l'autre en dynamique (réseau microfluidique associé au microcapteur). Cette configuration a permis de gagner un facteur important sur le temps de réponse.

Des caractérisations plus systématiques des réponses en temps réel du dispositif acoustique en configuration dynamique, et de l'état de surface aux différentes étapes du protocole par microscopie à force atomique, à l'air et en milieu liquide, ont été menées. La comparaison des résultats obtenus par ces deux techniques complémentaires, grâce à l'expertise du LOMA dans l'étude de surfaces notamment biologiques par AFM, a permis de mieux comprendre les différents phénomènes d'interaction mis en jeu, tant pendant l'immobilisation de la couche sensible que lors de la détection. Les influences du poids moléculaire, du pH et de la force ionique des solutions sur le dépôt des PEM ont également été étudiées.

Concernant le matériau guidant, des résultats nous ont permis de montrer l'intérêt potentiel d'utiliser des couches mésoporeuses de TiO_2 en surface du capteur acoustique utilisé pour la biodétection.

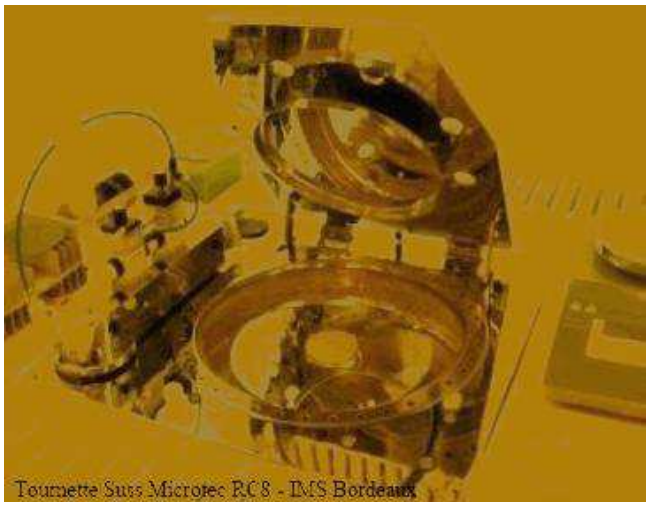
Nous avons réalisé des prototypes de microcapteurs impédimétriques sérigraphiés (technologie alternative au silicium et beaucoup moins coûteuse), qui pourront à terme remplacer avantageusement les modules électrochimiques volumiques. Une étape de faisabilité a été menée, les modules ont été conçus de sorte à pouvoir être testés avec les mêmes cellules de test que les dispositifs acoustiques. Une puce microfluidique compatible avec cette cellule et adaptée à ces microcapteurs a été conçue et réalisée.

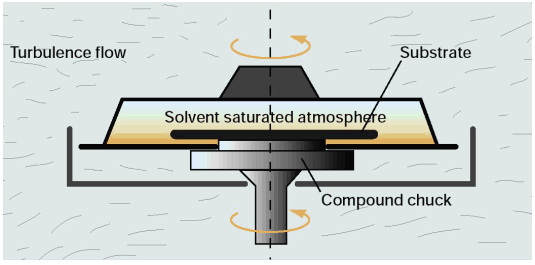
Finalement, il est apparu que le biocapteur proposé dans ce travail a des performances satisfaisantes pour la détection des métaux lourds testés dans la gamme de concentration proposée.

Dans l'avenir et à court-terme, il serait intéressant de réaliser les détections en microfluidique avec le capteur acoustique équipé du biofilm réalisé sur PEM « optimisé » (influence du pH mise en évidence dans le cadre de ces travaux). De même, le microcapteur sérigraphié serait à fonctionnaliser et tester en détection sous circulation microfluidique, l'enjeu étant d'obtenir un microcapteur réalisable à partir de technologies bas coût, et susceptible de permettre un suivi en temps réel avec un conditionnement de signal aujourd'hui miniaturisable. Une limitation à étudier, et susceptible d'être amoindrie par une mise en œuvre adaptée, pourrait être la durée de vie des électrodes, selon le milieu de fonctionnement. A moyen terme, le test de la réponse à d'autres toxiques tels que des éléments traces et des pesticides ne devrait pas comporter de difficulté majeure et pourrait présenter un intérêt certain, de même que le suivi d'une modification de la surface lors de la constitution d'un biofilm par exemple, avec de nombreuses applications potentielles.

Annexe 1 : Matériel salle blanche

Tournette : Tournette Suss Microtec RC8 - IMS Bordeaux





Système « GYRSET® » :

Couvercle: atmosphère saturée en solvants

Dépôt plus uniforme, moins d'effets de bord

Limite la quantité de résine

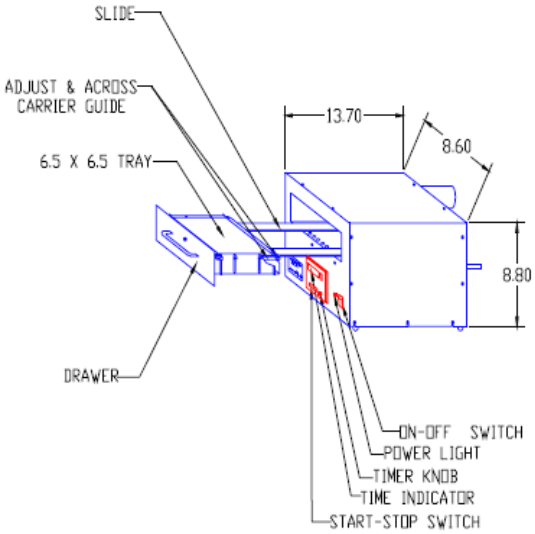
Maximum Substrate Size	
RC8 GYRSET 3	up to 3" Ø/2" □
RC8 GYRSET 5	up to 5" Ø/4" □
RC8 GYRSET 8	up to 8" Ø/6" □
Maximum Speed (10 rpm steps)	
RC8 GYRSET 3	7 000 rpm
RC8 GYRSET 5	5 000 rpm
RC8 GYRSET 8	3 000 rpm
RC8 standard plate	7 000 rpm
Maximum acceleration	5 000 rpm/s

Control	
Time Range	0 - 999 s
Speed Regulation	Tachometric
Speed Control	Galvanometric
Power Requirements	
Power	110/230 AC
Consumption	0.3 kW
Frequency	47 - 63 Hz

Utilities	
Vacuum	–0.6 ba
Air pressure	4 - 9 ba
Nitrogen	4 - 9 ba
Exhaust	600 l/mi
Conforming to:	
European Machine Norms CE certification	
EMC Electro magnetic capability	
SEMI specifications	

Pousse-seringues: modèle BS-9000-8

Insoleuse UV-Ozone: modèle 42 JELIGHT, JELIGHT COMPANY INC



Spécifications:

Size (Max) : 9” Wide X 18” Long X 9.5” High

Power Requirements : 115 Volts, 60 Hz. 3 Amps

Lamp Type : Low Pressure Mercury Vapor Grid

Lamp Output : 28,000 Micro Watts Per Cm^3 @ 254 Nm (From 6mm Dist.)

Tray Size : 6.5” X 6.5” Ozone Cleaning Area

Annexe 2 : Encres

Electro-Science Laboratories, Inc.
416 East Church Road • King of Prussia, PA 19406-2625, U.S.A
610-272-8000 • Fax: 610-272-6759 • www.ElectroScience.com • Sales@ElectroScience.com

8886
8886-A

CERMET GOLD CONDUCTOR

ESL 8886 and 8886-A are fritless gold conductors based on a new concept. They are designed for screen printing applications as are conventional thick film materials, but provide a dense film of approximately 1.0 μm thick. Using 2 layers of 8886 or 8886-A, the fired film can be etched to a very fine line pattern without exhibiting discontinuities. ESL 8886 and 8886-A are suitable for printing on the top of most high temperature underglazes such as ESL Code 129-C and are compatible with organometallic golds such as ESL D-8084. The 8886-A can be refired up to 6 times without blistering.

ESL# 8886 and 8886-A are not suitable for use on bare alumina substrates.

PASTE DATA

VISCOSITY: (Brookfield RVT, 10 rpm, No. 4 spindle, 25.5°C±0.5°C)	15-25 Pa·s

PROCESSING

SCREEN MESH/EMULSION:		325-400 mesh/0.0 μm
DRYING: (125°C)		15 minutes
FIRING TEMPERATURE RANGE:		
	OPTIMUM:	850°C
	TIME AT PEAK:	10-12 minutes
	TOTAL CYCLE:	45 minutes to 1 hour
RESISTIVITY:		
1 layer		< 50 mΩ/sq.
2 layers		< 30 mΩ/sq.
WIRE BONDABILITY: (On glazed substrates)		1 mil Au wire or Al wire

8886 & 8886-A 9607-B

ESL Affiliates
Japan: ESL-Nippon Company, Ltd. • Sukegawa Bldg. • 6th floor • 3-4 Yanagibashi 1-chome • Taito-ku • Tokyo 111, Japan • Tel: (011-81)-3-3864-8521 • Fax: (011-81)-3-3864-9270
NipponSales@ESLNippon.com
China: Shanghai Agmet Electro-Science Laboratory Ltd. • Second Floor Bldg. 12A1 • #223 North Fe Te Road • Waigaoqiao Free Trade Zone • Shanghai, China
Tel: (011-86)-21-5866-0497 • Fax: (011-86)-21-5866-0497 • ShanghaiSales@ShanghaiESL.com
Europe: Agmet, Ltd. • 8 Commercial Road • Reading, Berkshire, England RG2 0QZ • Tel: (011-44)-118-987-3139 • Fax: (011-44)-118-986-7331 • Sales@ESLEurope.co.uk
See Caution and Disclaimer on other side.

Electro-Science Laboratories, Inc.
416 East Church Road • King of Prussia, PA 19406-2625, U.S.A
610-272-8000 • Fax: 610-272-6759 • www.ElectroScience.com • Sales@ElectroScience.com

CERMET SILVER CONDUCTOR 9912

ESL 9912 is a mixed bonded silver paste developed for general applications for the consumer market. The 9912 can be fired from 625°C on porcelain enameled steel to 930°C on alumina and beryllia. The recommended firing temperature for 96% alumina is 850°C, while for beryllia it is 930°C. This material exhibits excellent adhesion and aged bond retention as well as excellent solderability and solder leach resistance with 62 Sn/36 Pb/2 Ag solder, especially on alumina or beryllia.

PASTE DATA

RHEOLOGY:	Thixotropic, screen printable paste
VISCOSITY: (Brookfield RVT, ABZ Spindle, 10 rpm, 25.5°C±0.5°C)	200±25 Pa· s
BONDING MECHANISM:	Mixed
SHELF LIFE: (25°C)	6 months

PROCESSING

SCREEN MESH/EMULSION:	325/25 μm
LEVELING TIME: (25°C)	5-10 minutes
DRYING AT 125°C:	10-15 minutes
FIRING RANGE:	625°C-930°C
ALUMINA:	850°C
BERYLLIA:	930°C
TIME AT PEAK:	10-12 minutes
RATE OF ASCENT/DESCENT:	60°C-100°C/minute
SUBSTRATE OF CALIBRATION:	96% alumina
THINNER:	ESL 401

9912 9710-B

ESL Affiliates
Japan: ESL-Nippon Company, Ltd. • Sukegawa Bldg. • 6th floor • 3-4 Yanagibashi 1-chome • Taito-ku • Tokyo 111, Japan • Tel: (011-81)-3-3864-8521 • Fax: (011-81)-3-3864-9270
NipponSales@ESLNippon.com

China: Shanghai Agmet Electro-Science Laboratory Ltd. • Second Floor Bldg. 12A1 • #223 North Fe Te Road • Waigaoqiao Free Trade Zone • Shanghai, China
Tel: (011-86)-21-5866-0497 • Fax: (011-86)-21-5866-0497 • ShanghaiSales@ShanghaiESL.com

Europe: Agmet, Ltd. • 8 Commercial Road • Reading, Berkshire, England RG2 0QZ • Tel: (011-44)-118-987-3139 • Fax: (011-44)-118-986-7331 • Sales@ESLEurope.co.uk

See Caution and Disclaimer on other side.

Electro-Science Laboratories, Inc.
416 East Church Road • King of Prussia, PA 19406-2625, U.S.A
610-272-8000 • Fax: 610-272-6759 • www.ElectroScience.com • Sales@ElectroScience.com

CERMET PLATINUM CONDUCTOR 5545-LS

For Heating Elements

ESL 5545-LS is a screen printable, fritted platinum conductor designed for use as a heating element. This material is thin printing and has TCR characteristics approaching that of bulk platinum. The TCR is the most positive when the material is fired at 1300°C. Customers who fire in the range of 850°C to 1300°C obtain excellent performance on prefired ceramics.

PASTE DATA

RHEOLOGY:	Thixotropic, screen printable paste
VISCOSITY: (Brookfield HBT Cone/Plate Viscometer, at 38.4 sec^{-1}, 23°C±0.2°C)	60-90 Pa·s
BONDING MECHANISM:	Fritted
SHELF LIFE:	6 months

PROCESSING

SCREEN MESH/EMULSION:	325/25 μm
LEVELING TIME:	5-10 minutes
DRYING:	10-15 minutes, 90°C-125°C
DRIED THICKNESS:	9±3 μm
FIRING RANGE:	850°C-1300°C
CALIBRATION:	850°C
TIME AT PEAK:	10-12 minutes
SUBSTRATE OF CALIBRATION:	96% alumina

5545-LS 0304-A

ESL Affiliates
Japan: ESL-Nippon Company, Ltd. Sukegawa Bldg. 6th floor 3-4 Yanagibashi 1-chome Taito-ku Tokyo 111, Japan Tel: (011-81)-3-3864-8521 Fax: (011-81)-3-3864-9270 NipponSales@ESLNippon.com
China: Shanghai Agmet Electro-Science Laboratory Ltd. Second Floor Bldg. 12A1 #223 North Fe Te Road Waigaoqiao Free Trade Zone Shanghai, China Tel: (011-86)-21-5866-0497 Fax: (011-86)-21-5866-0497 ShanghaiSales@ShanghaiESL.com
Europe: Agmet, Ltd. 8 Commercial Road Reading, Berkshire, England RG2 0QZ Tel: (011-44)-118-987-3139 Fax: (011-44)-118-986-7331 Sales@ESLEurope.co.uk
See Caution and Disclaimer on other side.

Annexe 3 : Composés chimiques

Le polydiméthylsiloxane (PDMS), fiche de sécurité internationale

POLYDIMETHYLSILOXANE
$(C_2H_6OSi)n$

N° CAS : 9016-00-6
N° RTECS : TQ2690000
N° ICSC : 0318

TYPES DE RISQUES/ EXPOSITIONS	RISQUES/ SYMPTOMES AIGUS	PREVENTION	PREMIER SECOURS/ AGENTS D'EXTINCTION
INCENDIE	Combustible.	PAS de flammes nues.	Poudre, AFFF, mousse, dioxyde de carbone.
EXPLOSION			
CONTACT PHYSIQUE			
• INHALATION		Ventilation.	Air frais, repos.
• PEAU		Gants de protection.	Retirer les vêtements contaminés. Rincer la peau abondamment à l'eau ou prendre une douche.
• YEUX	Rougeur. Douleur.	Lunettes de protection.	Rincer d'abord abondamment à l'eau pendant plusieurs minutes (retirer si possible les lentilles de contact), puis consulter un médecin.
• INGESTION	Diarrhée.	Ne pas manger, ne pas boire ni fumer pendant le travail. Se laver les mains avant de manger.	Rincer la bouche.

DEVERSEMENTS & FUITES	STOCKAGE	CONDITIONNEMENT & ETIQUETAGE
Recueillir autant que possible dans des récipients hermétiques le liquide répandu. Absorber le liquide restant avec du sable ou avec un absorbant inerte et emporter en lieu sûr.		

VOIR IMPORTANTES INFORMATIONS AU DOS

ICSC: 0318

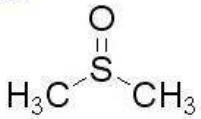
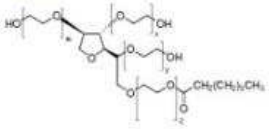
Préparé dans le cadre de la coopération entre le Programme International sur la Sécurité Chimique et la Commission Européenne (C) 1993

DONNEES IMPORTANTES	**ASPECT PHYSIQUE; APPARENCE:** LIQUIDE HUILEUX, INCOLORE. **DANGERS PHYSIQUES:** **DANGERS CHIMIQUES:** La substance se décompose en chauffant fortement (>150°C), produisant du formaldéhyde en petite quantité. **LIMITES D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE (LEP):** Pas de TLV établie.	**VOIES D'EXPOSITION:** La substance peut être absorbée par l'organisme par inhalation. **RISQUE D'INHALATION:** Aucune indication ne peut être donnée sur la vitesse à laquelle une concentration dangereuse dans l'air est atteinte lors de l'évaporation de cette substance à 20°C. **EFFETS DES EXPOSITIONS DE COURTE DUREE:** La substance est irritante pour les yeux. **EFFETS DES EXPOSITIONS PROLONGEES OU REPETEES:**
PROPRIETES PHYSIQUES	Densité relative (eau = 1) : 0.97 Solubilité dans l'eau : nulle	Point d'éclair : >200°C
DONNEES ENVIRONNEMENTALES		

Les tampons salins TBS et PBS

P3813 **Phosphate buffered saline**
Sigma powder, pH 7.4

Customers Also Purchased

D2650	P3563	T6664	P1379
	No Image Available	No Image Available	
Dimethyl sulfoxide Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7%	**Phosphate buffered saline** pH 7.4, contains TWEEN 20, dry powder	**Tris Buffered Saline** pH 8.0, powder	**TWEEN® 20** viscous liquid

Details | Related Products | References | Reviews

Description

Packaging Foil pouches

Reconstitution Contents of one pouch, when dissolved in one liter of distilled or deionized water, will yield 0.01 M phosphate buffered saline (NaCl 0.138 M; KCl - 0.0027 M); pH 7.4, at 25 °C.

Propriétés

form powder

pH 7.4

Sécurité

Safety Statements 22-24/25

WGK Germany 1

94158 **Tris Buffered Saline**
Sigma BioUltra, tablets (for 500 mL), pH 7.6

Details | Related Products | References | Reviews

Description

Reconstitution	1 tablet dissolved in 500 mL of deionized water yields: 0.15 M sodium chloride; 0.050 M TRIS-HCl buffer; pH 7.6 at 25°C

Propriétés

product line	BioUltra
form	tablets (for 500 mL)
pH	7.6

Sécurité

Symbol	GHS07
Signal word	Warning
Hazard statements	H319-H335-H315
Precautionary statements	P305+P351+P338
Personal Protective Equipment	dust mask type N95 (US), Eyeshields, Gloves
WGK Germany	1

PAH : Poly(allylamine hydrochloride)

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

FICHE DE DONNÉES DE SÉCURITÉ

conformément au Règlement (CE) No. 1907/2006
Version 5.0 Date de révision 26.10.2012
Date d'impression 04.05.2013

1. IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE/ DU MÉLANGE ET DE LA SOCIÉTÉ/ L'ENTREPRISE

1.1 Identificateurs de produit

Nom du produit	:	Poly(allylamine hydrochloride)
Code Produit	:	283223
Marque	:	Aldrich
No.-Index	:	612-191-00-3
No.-CAS	:	71550-12-4

1.2 Utilisations identifiées pertinentes de la substance ou du mélange et utilisations déconseillées

Utilisations identifiées	:	Substances chimiques de laboratoire, Fabrication de substances

1.3 Renseignements concernant le fournisseur de la fiche de données de sécurité

Société	:	Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l L'Isle D'Abeau Chesnes F-38297 ST. QUENTIN FALLAVIER
Téléphone	:	+33 (0)4 74 82 28 40
Fax	:	+33 (0)4 74 95 68 08
Adresse e-mail	:	eurtechserv@sial.com

1.4 Numéro d'appel d'urgence

Numéro d'Appel d'Urgence	:	I.N.R.S.:+33 (0)1 45 42 59 59

2. IDENTIFICATION DES DANGERS

2.1 Classification de la substance ou du mélange

Classification en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]
Sensibilisation cutanée (Catégorie 1)
Toxicité aiguë, Oral(e) (Catégorie 4)

Classification conformément aux Directives UE 67/548/CEE ou 1999/45/CE
Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau. Nocif en cas d'ingestion.

2.2 Contenue d'etiquette

Etiquetage en accord avec la réglementation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]

Pictogramme

Mention d'avertissement	Attention
Mention de danger	
H302	Nocif en cas d'ingestion.
H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
Conseils de prudence	
P280	Porter des gants de protection.
Informations Additionnelles sur les Dangers	aucun(e)

Selon la Directive 67/548/CEE, comme modifiée.

Symbole(s) de danger

PSS : Poly-(4-styrènesulfonate de sodium)

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

FICHE DE DONNÉES DE SÉCURITÉ

conformément au Règlement (CE) No. 1907/2006
Version 5.0 Date de révision 17.05.2012
Date d'impression 04.05.2013

1. IDENTIFICATION DE LA SUBSTANCE/ DU MÉLANGE ET DE LA SOCIÉTÉ/ L'ENTREPRISE

1.1 Identificateurs de produit

Nom du produit : Poly-(4-styrènesulfonate de sodium)

Code Produit : 243051
Marque : Aldrich
No.-CAS : 25704-18-1

1.2 Utilisations identifiées pertinentes de la substance ou du mélange et utilisations déconseillées

Utilisations identifiées : Substances chimiques de laboratoire, Fabrication de substances

1.3 Renseignements concernant le fournisseur de la fiche de données de sécurité

Société : Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l
L'Isle D'Abeau Chesnes
F-38297 ST. QUENTIN FALLAVIER

Téléphone : +33 (0)4 74 82 28 40
Fax : +33 (0)4 74 95 68 08
Adresse e-mail : eurtechserv@sial.com

1.4 Numéro d'appel d'urgence

Numéro d'Appel d'Urgence : I.N.R.S.:+33 (0)1 45 42 59 59

2. IDENTIFICATION DES DANGERS

2.1 Classification de la substance ou du mélange

N'est pas une substance ni un mélange dangereux conformément au règlement (CE) No. 1272/2008.
Cette substance n'est pas classée comme dangereuse au sens de la Directive 67/548/CEE.

2.2 Contenue d'etiquette

Attention - Substance non encore testée complètement.

2.3 Autres dangers - aucun(e)

3. COMPOSITION/ INFORMATIONS SUR LES COMPOSANTS

3.1 Substances

Synonymes : Poly(4-styrenesulfonic acid) sodium salt

Formule : [-CH2CH(C6H4SO3Na)-]n

4. PREMIERS SECOURS

4.1 Description des premiers secours

En cas d'inhalation
En cas d'inhalation, transporter la personne hors de la zone contaminée. En cas d'arrêt respiratoire, pratiquer la respiration artificielle.

En cas de contact avec la peau
Laver au savon avec une grande quantité d'eau.

En cas de contact avec les yeux
Rincer les yeux à l'eau par mesure de précaution.

Annexe 4 : AFM

Pointes utilisées

Tableau 5-1 : Pointes utilisées en mode tapping

Type	Epaisseur *T (µm)*	Longueur *L (µm)*	Raideur *k (N/m)*	Fréquence f_0 *(kHz)*
TAP 150A	1,5-2,5	115-135	5	123-157
PPP-NCL-50	7±1	225±10	21-98	150

Tableau 5-2: Pointes utilisées en mode Contact

Type	Epaisseur *T (µm)*	Raideur *k (N/m)*	Fréquence f_0 *(kHz)*
SNL-10	0,5-0,7	B-*k*=0,12 D-*k*=0,06	B-f_0=14-26 D-f_0=12-24

Mesure de la raideur d'un microlevier

La connaissance de la raideur *k* du microlevier est un élément important dans l'analyse des résultats d'AFM, or, sa valeur est susceptible de varier fortement du fait des incertitudes de fabrication, en particulier sur l'épaisseur obtenue. Parmi les techniques de mesure de la raideur d'un microlevier **[148,149,150,151]**, nous présentons ici les éléments de base de celle qui s'appuie sur l'exploitation du bruit thermique d'un microlevier libre **[152]** et qui est utilisée depuis des années pour calibrer la raideur d'un levier d'AFM.

Comme tout système mécanique nano et micrométrique, les effets de l'agitation thermique sur les leviers sont mesurables dès que la raideur autorise la détection des fluctuations en flexion.

Commençons par présenter brièvement la modélisation mécanique d'un levier en considérant qu'à tout instant, le rayon de courbure correspondant à sa flexion est grand devant sa longueur, ou de façon équivalente, que le déplacement de son extrémité libre est petit par rapport à cette longueur. Ces faibles sollicitations sont décrites par l'approche d'Euler-Bernoulli stipulant que le levier peut être réduit à un objet unidimensionnel et subit une

flexion sans cisaillement. Ce qui nous intéresse en particulier est de savoir de quelle façon l'énergie thermique totale stockée va agir sur la déflexion en bout de levier grâce à l'estimation faite, pour mesurer la raideur par bruit thermique à partir du théorème d'équipartition de l'énergie qui permet de donner la fluctuation quadratique moyenne, en bout de levier, de chaque mode et donc de remonter à la raideur *k* du levier**:**

$$k = \beta^2 \frac{12 k_B T}{\alpha_1^4 \langle V_1^2 \rangle}$$

Avec k_B la constante de Boltzmann ($1.38.10^{-23}$ J/K), *T* la température ambiante (K), et la $\langle V_1^2 \rangle$ moyenne du déplacement au carré du cantilever.

Le bruit thermique de déflexion *SV (f)* et le facteur de conversion β = *dV/dz* entre le signal quatre-quadrants et la déflexion sont mesurés ; un ajustement (« fit ») sur la première résonance avec un modèle d'oscillateur harmonique avec couplage visqueux (OHV), et une intégration de cette courbe permettent d'obtenir l'écart quadratique des fluctuations du signal de déflexion.

Le calcul du bruit thermique pour une pointe de forme pyramidale avec un rayon de courbure de 10 nm en tête de pointe, a par exemple permis d'estimer une valeur de *k* égale à 52 N/M $\langle V_1^2 \rangle$

Les forces mises en jeu en microscopie de force

Nous décrivons ici les principales forces qui interagissent sur la pointe lors d'une expérience à l'air ambiant sont décrites en annexe (force de Van der waals, de capillarité, électrostatiques, de répulsion où sont également présentés les principaux modes de fonctionnement utilisés (modes contact ou mode intermitent).Les forces de Van der Waals

Ce sont des forces attractives, elles exercent leur influence en attirant le microlevier et résultent de trois effets : des effets d'orientation (moments multipolaires permanents entre deux molécules), des effets d'induction vers des molécules non polaires et des effets de dispersion (polarisation instantanée due aux fluctuations de positions des électrons autour du noyau). Elles agissent sur de grandes distances, pouvant atteindre plusieurs centaines de nanomètres. Pour une pointe sphérique faisant face à un solide plan, le potentiel de Van der Waals est donné par Israelachvili *et al* [153] :

$$V_{vdW} = -\frac{A_H R^2}{6z} \qquad (2\text{- }20)$$

Avec A_H la constante de Hamaker qui dépend du type de matériau (densité et polarisabilité atomique), *R* le rayon de courbure de la pointe et *z* la distance entre la pointe et l'échantillon. Cela donne par exemple pour *U* = 1 V, *R* = 50 nm, *z* = 0,5 nm, une force de Van der Waals

d'environ - 5 nN ce qui est l'ordre de grandeur des plus faibles forces imposées par l'instrument pour maintenir le contact. Ce sont donc des forces qui ont une influence importante dans le comportement de ce microscope.

- **Les forces de capillarité**

Ce sont des forces attractives qui apparaissent lorsque la pointe s'approche de la surface d'un échantillon placé dans l'air. Elles sont dues à la présence d'une fine couche d'eau à la surface de l'échantillon, qui se forme par condensation de l'humidité présente dans l'air ambiant. Elles dépendent du taux d'humidité, du rayon de courbure de la pointe, et de l'échantillon (hydrophile ou hydrophobe).

- **Les forces électrostatiques**

Ce sont des forces attractives lorsque la pointe est en contact avec la surface et qui apparaissent respectivement lorsque la pointe ou l'échantillon sont chargés. A distance, elles peuvent être attractives ou répulsives et agissent à plusieurs dizaines de nanomètres. Pour une pointe sphérique, il est possible de modéliser la force électrostatique [154] :

$$F_{Ele}(z) = -\frac{\pi\varepsilon_0 R U^2}{z} \qquad (2\text{- }21)$$

Avec U la différence de potentiel, R le rayon de courbure de la pointe, z la distance entre la pointe et l'échantillon et ε_0 la permittivité du vide. Pour U = 1V, R = 50 nm, z = 0,5 nm, nous obtenons F_{Elec} de l'ordre - 2,5 nN, ce qui montre l'influence de cette force qui va demeurer importante même à longue portée.

- **Les forces de répulsion**

Ces forces varient entre 1 nN et 10^{-3} nN. Elles apparaissent lorsque la pointe se rapproche de la surface à quelques dixièmes de nanomètre. A cette distance, les nuages électroniques des atomes de la pointe commencent à recouvrir ceux de la surface de l'échantillon. Il se crée alors une force fortement répulsive qui croît très rapidement si les deux corps continuent de se rapprocher. Ces forces dépendent du rayon de courbure de la pointe, de son matériau et de celui de l'échantillon.

[1] B. Hultberg, A. Andersson, A. Isaksson, Toxicology 126 (1998) 203–212.

[2] V. Antochshuk, M. Jaroniec, Chem. Commun. (2002) 258–259.

[3] L. C. Clark; C. Lyon C, NY. Ann. Acad 29(1962); 102.

[4] S.J. Updike, G.P Hicks, Nature 214(1967), 986-988.

[5] C.Céline, D. Sergei, D. Claude, C. Jean, Biosensors and Bioelectronics 21(2005) 273-281.

[6] Y. Yi, Z. Yang, S. Zhang, Environmental Pollution 159 (2011) 2575-2585.

[7] S-R. Lim, Julie M. Schoenung, Journal of Hazardous Materials 177 (2010) 251–259.

[8] M. Stewart, N. R. Phillips, G.Olsen, C. W. Hickey, G.Tipa, Science of the Total Environment 409 (2011) 2029–2039.

[9] http://www.idconsult-sarl.fr/economie-energie/economie-energie-gestion-de-l-eau.php.

[10] J. Burger, Science of the totale environment 389 (2008)37–45.

[11] R. Pamphlett, S. Kum-Jew, Neurotoxicology and Teratology 23 (2001) 191-196.

[12] La bioconcentration - Sénat INERIS / AFSSA / CNRS - Synthèse OPECST.

[13] Evaluation mondiale de mercure, programme des nations unies pour l'environnement, substances chimiques

[14] E. Ada, H. Mussalo-Rauhamaab, M. Kantolac, F. Atroshid, T.Westermarcke, TheScience of the Total Environment 186 (1996) 251-256.

[15] M.J. Chowdhury, E.F. Pane, C.M. Wood, Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 139 (2004) 163–173.

[16] Thévenot D., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. Electrochemical biosensors.Biosensors & Bioelectronics 16(2001) 121-131.

[17]H. Barhoumi, M. Maaref, M. Rammah, C. Martelet, N. Jaffrazic-Renault, C. Mousty, S. Cosnier, E. Pereset, I. Rico-Lattes, Biosensors & Bioelectronic 11(2005) 2318-2323.

[18] S. J. Updicke, G. Hicks., Nature, 214 (1967) 986.

[19] H. Joo Lee, K. Namkoong, E. C. Cho, C. Ko, J. C. Park, S. S. Lee. Biosensors and Bioelectronics 24 (2009) 3120–3125.

[20] B. Wang, L. Bouffier, M. Demeunynck, P. Mailley, A. Roget, T. Livache, P. Dumy, Bioelectrochemistry 63 (2004) 233– 237.

[21] D. Barrie Johnson, Kevin B. Hallberg, Advances in Microbial Physiology 54 (2008), Pages 201-255.

[22] T. Petänen, M. Romantschuk, Chemosphere 50(2003)409-413.

[23].H. Purohit, Cleaner Production 11(2003) 293-301.

[24] http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Average_prokaryote_cell-_fr.svg

[25] E. Giller, K. Witter, P.S. Mcgrath, Soil Biology and Biochemistry 30(1998)1389-1414.

[26] C. Chouteau, S. Dzyadevych, C. Durrieu, J-M. Chovelon, Biosensors and Bioelectronics 21 (2005) 273–281.

[27].X. Huang, X-E. Zhang, Y-F. Zhou, Z-P. Zhang, A.E.G. Cass, Biochemistry and Biophysics. Methods 70 (2007) 435–439.

[28] M. A. Abigail, M. B. Peyton, A. A. William, N. P. James Analytica Chimica Acta 480 (2003) 131–142.

[29] A. A. Hugo, G.L. D. Antoni, P.F. Pérez, International Journal of Food Microbiology 111 (2006) 191–196.

[30] K. Guven, S.Togrul, F. Uyar, S.Ozant, I. David, D Pomerai, Enzyme and Microbial Technology 32 (2003) 658–664.

[31] M. Ekenler, M.A. Tabatabai. Soil Biology & Biochemistry 34 (2002) 1829–1832.

[32] N. Boussama , O. Ouariti ; M. H. Ghorbal, Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales 190(1996) 581-593.

[33] K.Senen, T. Asuman, B. Gulay, A. Yakup, T.Levent, Sensors and Actuators B: Chemical (2008) 521-528.

[34] Y. Diana, V. Joanne, Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 1433–1437.

[35] J. R. Premkumar, R. Rosen, S. Belkin, Analytica Chimica Acta 462 (2002) 11–23.

[36] G. Wang, Y. Liu, N. Hu., Electrochimica Acta, Volume 53(2007) 2071-2079.

[37] A. N. Naimushin, S. D. Soelberg, D. K. Nguyen, L Dunlap, D. Bartholomew, J. Elkind, J. Melendez, C. E. Furlong, Biosensors and Bioelectronics 17 (2002) 573 - 584.

[38] M. J. Go mara, G. Ercilla, M.A. Alsina, I. Haro, Journal of Immunological Methods 246 (2000) 13–24.

[39] E. Nice, B. Catimel, Proteome Analysis Interpreting the genome (2004) 243-285.

[40] B. Catimel, J. Rothacker, E. Nice, J. Biochem. Biophys. Methods 49 (2001) 289–312.

[41] D.R. Shankaran, K. V. Gobi, N. Miura, Sensors and Actuators B 121 (2007) 158–177.

[42] P. C. Shukla, K. K. Singh, B. Yanagawa, H. Teoh, S. Verma, Canadian Journal of Cardiology, 26(2010) 13A-16A.

[43] M. Yuqing, C. Jianrong, W. Xiaohua, Biosensors .Trends in Biotechnology, 22 (2004) 227-231

[44] A.L. Berezhetsky, O.F. Sosovaska., C. Durrieu, J-M.Chovelon, S.V. Dzyadeveych, C. Tran-Minh, ITBM-RBM 29 (2008) 136–140

[45] F. Bettaieb, L. Ponsonnet, P. Lejeune, H. Ben Ouada, C. Martelet, A. Bakhrouf, N. Jaffrézic-Renault, A. Othmane, Bioelectrochemistry, Volume 71 (2007) 118-125.

[46] N. Sakly, M.Souiri, F.Fekih Romdhane, H.Ben Ouada, N. Jaffrezic-Renault, Materials Science and Engineering (2002) 47-53.

[47] G.G Jian, Y.Q .M.,Qing J. Z, Bioscience &Bioengineering 97 (2004) 219-226.

[48]F. César, J.Caluim, McNeil., R. Keith .TrAC Trends in Analytical Chemistry 24(.2005) 37-48.

[49] Y. Liju, R.Chuanmin, L.Yanbin, Biosensors and Bioelectronics 19 (2003) 495-502.

[50] W. Chih Chen, T.C Wen, A. Gopalan, Syntthetic Metals (2002) 179-189.

[51] F. M.Fowkes and T.E.Burgess, Surface science (1969) 184-195.

[52]] J.L.Diot, J.Joseph, J.R.Martin and P.Clechet. Journal of electroanalytical chemistry 193 (1985) 75-88.

[53] D. di Caprio, Z.Borkowska, J.Stafiej, Journal of electroanalytical chemistry 540 (2003) 17-23.

[54]S. Usui, Journal of colloid and interface science 280 (2004) 113-119.

[55] J. Lim, J. Whitcomb, J. Boyd, J. Varghese, Journal of colloid and interface science 305 (2007) 159-174.

[56] S. Mutlu, D. Çökeliler, A. Shard, H. Goktas, B. Ozansoy, M. Mutlu, Thin Solid Films,516 (2008) 1249-125.

[57] G. Sauerbrey. V. von, S. zur W. duänner CH. Microwägung. Z. Phys., 155 (1959) 206–222.

[58] R.Z. Hao, H.Bin Song, G.M Zuo, R.F Yang, H.P. Wei,D.Bing Wang, Z.Q. Cuia, Z. Zhang, Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) 3398–3404.

[59] D.Li, J. Wang, R.Wang, Y. Li, D.A.Ghanem, L. Berghman, B. Hargis, H. Lu, Biosensors and Bioelectronics 26 (2011) 4146–4154

[60] C. Zimmermann, D. Rébière,C. Dejous, J.Pistre, R. Planade ,IEEE International frequency control symposium (2002)281-283.

[61]C. Zimmermann, D. Rébière,C. Déjous, J.Pistre,E. Chataing, R. Planade, sensors and actuators B 76(2001)86-94.

[62] L. Fan, H. Ga, S.y. Zhang, H. Zhang, J. Zhu, Sensors and Actuators B 145 (2011) 847– 853.

[63] O. Tamarin, S. Comeau, C. Déjous, D. Moynet, D. Rebière, J. Bezian, J. Pistré, Biosensors and Bioelectronics18(2003)755-763.

[64] K. Tag, K. Riedel, H-J. Bauer, G. Hanke, K. H.R. Baronian, G. Kunze Sensors and Actuators B: Chemical122(2007) 403-409.

[65] R. Zlatev, J-P. Magnin, P. Ozil, M. Stoytcheva. Biosensors and Bioelectronics 21 (2006) 1501-1506.

[66] R. Zlatev, J-P. Magnin, P. Ozil, M. Stoytcheva Biosensors and Bioelectronics 21(2006) 1493-1500.

[67] C. Chouteau, S . Dzyadevychc, C. Durrieua, J-M. Chovelon, Biosensors and Bioelectronics 21 (2005) 273–281.

[68] H. Guedri, C. Durrieu, Microchimica Acta 163 (2008) 179-184.

[69]. M. Yüce, H. Nazır, G. Dönmez. Biosensors and Bioelectronics 26(2010) 321-326.

[70] M. Yüce, H. Nazır, G. Dönmez. New Biotechnology(28) 2011 356-361.

[71] S. Alpat, S.Kılınc Alpat, B.H. Cadırcı, İ. Yasa, A. Telefoncu. Sensors and Actuators B: Chemical 134 (2008 175-181.

[72] S. H.A. Hassan, Steven W. V. Ginkel, S-M. Kim, S.-H. Yoon, J-H. Joo, B-S. Shin, B. Jeon, W. Bae, S-E. Oh. Journal of Microbiological Methods 82 (2010) 151–155.

[73] A. Ivask, T. Green, B. Polyak, A. Mor, A. Kahru, M. Virta, R. Marks. Biosensors and Bioelectronics 22 (2007) 1396-1402.

[74] X. Zhang, F. Yang, J-Y. Shim, K. L. Kirk, D. E. Anderson, X. Chen. Cancer Letters 255(2007) 95-106.

[75] I. Gammoudi, H. Tarbague, A. Othmane, D. Moynet, D. Rebière, R. Kalfat, C. Dejous. Biosensors and Bioelectronics 26 (2010) 1723-1726.

[76] http://www.futura-sciences.com/fr/doc/t/medecine-1/d/diabete_859/c3/221/p12/.

[77] http://www.creapharma.ch/test-de-grossesse.htm.

[78] N. Moll, Étude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries, Université Bordeaux 1, 3385 (2007).

[79] P. Mazein. Etude de dispositifs à ondes de Love par modélisation numérique de la propagation d'ondes acoustiques. Application à l'optimisation de structures et à la caractérisation de matériaux en vue de la réalisation de capteurs chimiques.

[80] C. Zimmermann, Conception, réalisation et étude de micro-capteurs à ondes de Love pour application en milieu gazeux. Cas de la détection de composés organophosphorés, thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2471 (2002).

[81] H .Tarbague, Etude et réalisation d'un microcapteur à ondes de Love ultra-sensible appliqué à la détection de bactéries, thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 4290 (2011).

[82] C. Boissière, D. Grosso, S. Lepoutre, L. Nicole,A. Brunet Bruneau, C. Sanchez .Langmuir. 21(2005)12362-12371.

[83] G. M. Whitesides, S. K.Y. Tang Fluidic Optics. Proc. of SPIE 63 (2006) p. 29.

[84] E. Leclerc, Y. Sakai, T. Fujii, Biotechnol. Prog. 20 (2004) 750–755.

[85] A. Mata, A.J. Fleischman, S. Roy, , Biomed. Dev. 7 (4) (2005) 281–293.

[86] T. R. Albrecht and C. F. Quate. J. Appl. Phys. 62 (1987) 2599-2602.

[87] C. A Alves, E. L. Smith, and M. D. Porter.. Atomic-scale imaging of alkanethiolate monolayers at golds. (1992)

[88]P.E. Hillner, A. J. Gratz, S. Manne, and P. K. Hansma. 1992. Atomic-scale imaging of calcite growth and dissolution in real time. Geology. 20: 359-362.urfaces with atomic force microscopy. J. Am. Chem. Soc. 114:1222-1227.

[89] S. Manne, P. K. Hansma, J. Massie, V. B. Elings, and A. A. Gewirth. 1991. Atomic-resolution electrochemistry with the atomic force microscope: copper deposition on gold. Science (Wash. DC). 251:183-186.

[90]G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber. 1986. Atomic force microscope. Phys. Rev. Lett. 56:930-933.

[91] C. J. Chen. Introduction to Scanning Tunneling Microscopy. Oxford University Press (1993).

[92] N. A. Burnham and al. Nanotechnology, 14(2003) p. 1.

[93] R. Levy and M. Maaloum, Nanotechnology, 13(2002) p. 33.

[94] P.M. e. L. W. J.E. Sader, I. Larson,“Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers,” Review of Scientific Instruments, vol. 66, p. 3789, 1995.

[95] C. T. Gibson, D. A. Smith, and C. J. Roberts, “Calibration of silicon atomic force microscope cantilevers,” Nanotechnology, vol. 17, p. 234, 2005.

[96] J. L. Hutter and J. Bechhoefer, “Calibration of atomic-force microscope tips,” Review of Scientific Instruments, vol. 64, p. 1868, 1993.

[97] C. Odin, J.P Aimé, Z El Kaakour, T Bouhacina, Surface Science, 1994, 317, 321–340

[98] M. L. Bloo, H. Haitjema, W.O. Pril, Measurement, 25, p.203, 1999.

[99] L. Nony, L . Boisgard., , J.P. Aimé., j.Chem,phys. 111(1999)1615.

[100] H. Gareth McKinley, S. Tamarapu. Annual Review of Fluid Mechanics. 34 (2002) 375-415.

[101] J. IIja Siepmann, S. Karaborni, B. Smit. Letters to Nature, 365 (1993) 330 – 332.

[102] C-M. Huo, Annual Review of Fluid Mechanics, 30 (1998) 579-612.

[103] I. G. Economou, Ind. Eng. Chem. *Res.*, 41(2002) 953–962.

[104] G. Decher, J. D. Hong and J. Schmitt , Thin Solid Films, 210 (1992) 831-835.

[105] H. Vink, Polymer. 33(1992) 3711-3716.

[106] S. Dragan, I. Dranca, L. Ghimici, M. Cristea, G. Funduianu, T. Lupascu. European Polymer Journal. 34(1998) 733-737.

[107] M.J. Miles, K. Tanaka, A. Keller, Polymer 24(1983) 1081-1088

[108] G.S. Manning, J. Chem. Soc.73,(1949). 934.

[109] G. S, Manning. J Chem Phys., 51 (1969).924.

[110] M., Le Bret, B.H., Zimm, Biopolymers.23 (1984).287.

[111] F. Oosawa. Polyelectrolytes, M. Dekker, New York, 1971.

[112] H.,Yamakawa, Modern Theory of polymer solutions, N.Y 1971.

[113] T.,Odijk, A.C.,Houwaart. J. Polym. Sci. Pol. Phys., 16 (1978) 627.

[114] M. Fixman, J., Skolnick. Macromolecules, 11 (1978) 863.

[115] H.Yamakawa, Modern Theory of polymer solutions, N.Y 1971.

[116] J. Floryp, T.G. Fox, Jr, J. Am. Chem. Soc. 73 (1951) 1904.

[117] N.G. Hoogeveen, M.A. Cohen Stuart, G.J. Fleer, Journal of colloid and interface science(1996), 182, 133.

[118] P.-G. de Gennes, P. Pincus, R. M. Velasco and F. Brochard. J. Phys. 37(1976) 1461.

[119] P. Rouse. Journal of Chemical Physics 21(1953)1272–1280.

[120] J. R. Zimmerman and W. E. Brittin, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 78(1982) 255-271.

[121] N.A. Kotov. Nanostructured Materials, 12 (1999) 789-796.

[122] G.Wang, Yi Liu, Naifei Hu. . Electrochimica Acta, 53(2007) 2071-2079.

[123] D. Cochin, A. Laschewsky. Marcromol Chem Phys , 200 (1999) 609-615.

[124] J. Du, G. L. Harding, A. F. Collings, and P. R. Dencher, Sensors and Actuators A, 60:54–61, 1997.

[125] J.J. Ramsden, Y.M. Lvov, G; Decher. Thin solid films, 254 (1995)246-251.

[126] J. Schmitt, T. Gruenewald, G. Decher, Peter S. Pershan, K. Kjaer et M. Loesche. Macromolecules, 26(1993)20-24.

[127] G. Decher, Y. Lvov, J. Schmitt, Thin solid film, 244 (1994) 24.

[128] B. B. Rodriguez, J.A. Bolbot, I. E. Tothill. Biosensors and Bioelectronics. 19(2004) 1157-1167.
.

[129] O. Prakash, M. Talat, S.H. Hasan, R.K. Pandey.. Bioresource Technology. 99(2008)4524-4528.

[130] L.Yan and M. Lehe, Chin. J. Chern. Eng., 15(2007) 387-390.

[131] F. Bettaieb, L. Ponsonnet , P. Lejeune , H. Ben Ouada , C. Martelet , A. Bakhrouf , N. Jaffrézic-Renault , A. Othmane, Bioelectrochemistry 71 (2007) 118–125.

[132] S. Da Silva, L. Grosjean, N. Ternan, P. Mailley, T. Livache, S. Cosnier, Bioelectrochemistry,63(2004) 297-301.

[133] J. Huang, H. Yamaji, H. Fukuda.. Bioscience and Bioengineering. 104(2007) 98–103.

[134] S. Da Silvaa, L. Grosjeanb, N. Ternanc, P. Mailleyb, T. Livacheb, S. Cosnie.. Bioelectrochemistry 63 (2004) 297–301.

[135] J. Mavri, P. Raspor, M. Franko.. Biosensors and Bioelectronics 22 (2007) 1163–1167.

[136] C. Philippe., L. Daniel, B. Brigitte., P. Ann., L. Victor., L. B. Nigel, R. L. Jonathan, L. H. Jonathan, C. Elisabeth, Gillis .J, Bo .M. Analytica Chimica Acta 387 (1999) 235-244.

[137]C. Serena , M. Cosimino, C. Sabrina, P. Salvatore, S. Salvatore, V. Ludovico, Biosensors and Bioelectronics. 20 (2004) 1190-1195.

[139] Z. Sheng, W. Chaohai, L. Chaodeng, W. Haizhen. Journal of Environmental Sciences 20 (2008) 1514–1518.

[140] A.Z.M. Salema, H. Ammar, S. Lopez, Y.M. Gohar, J.S. Gonzalez. Animal Feed Science and Technology 163 (2011) 143–149.

[141] T. Nadège, Elaboration de capteurs analytiques à base de micro-algues, Université de Monastir/Lyon, Octobre 2013.

[142] M. Tiemann, Chemistry A European Journal. 13 (2007) 8376-8388.

[143] J.D. Bass, D. Grosso, C. Boissière, E. Belamie, T. Coradin, C. Sanchez, , Chemistry of Materials. 19 (2007) 4349-4356.

[144] D. O. Zárate , C. Boissière , D. Grosso , P. Albouy , H. Amenitsch , P.Amoros, C. Sanchez. New J. Chem. 29(2005) 141-144.

[145] T.Posch, , J.Pernthaler, A. Alfreider, R. Psenner, ,. Appl Environ Microbiol 63(1997) 867–873.

[146] J.A. Fuhrman, F. Azam, Appl Environ Microbiol 39(1980) 1085–1095.

[147] V. Loosdrecht. M.C.M.J.Lyklema. W. Norde. and A.J.b.Zenhnder.. Microbial. Rev.54 (1990) 75-87.

[148] N. A. Burnham, Nanotechnology, 14 (2003) p.1.

[149] R. Levy and M. Maaloum, “Measuring the spring constant of atomic force microscope cantilevers: thermal fluctuations and other methods,” Nanotechnology, 3(2002) p. 33.

[150] P.M. e. L. W. J.E. Sader, I. Larson, Review of Scientific Instruments, 66 (1995) p. 3789.

[151] C. T. Gibson, D. A. Smith, and C. J. Roberts, Nanotechnology, 17(2005) p. 234.

[152] J. L. Hutter and J. Bechhoefer, “Calibration of atomic-force microscope tips,” Review of Scientific Instruments, vol. 64, p. 1868, 1993.

[153] J. Israelachvili, P. Zhao, W. J. Chinese Physics Letter, 19(1991).

[154] B.M. Law, F. Rieutord. Physical Review B, 66(2002)35402.