HAL
open science

Développement d'un biocapteur associant dispositif à onde de Love et polymères à empreintes moléculaires, caractérisation sous gaz

Nima Omar-Aouled

To cite this version:

Nima Omar-Aouled. Développement d'un biocapteur associant dispositif à onde de Love et polymères à empreintes moléculaires, caractérisation sous gaz. Micro and nanotechnologies/Microelectronics. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. English. NNT : . tel-00987912v2

HAL Id: tel-00987912

https://theses.hal.science/tel-00987912v2

Submitted on 23 May 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 : 4833

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

Par Nima OMAR AOULED

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : ÉLECTRONIQUE

Développement d'un biocapteur associant dispositif à onde de Love et polymères à empreintes moléculaires, caractérisation sous gaz.

Directeur de recherche : Pr Corinne DEJOUS
Pr Dominique REBIERE

Après avis des rapporteurs :

M. Khalifa AGUIR	Professeur, Université Aix Marseille	Rapporteur
M. Philippe MENINI	Maître de conférences, Université de Toulouse	Rapporteur

Thèse soutenue le 16 juillet 2013 devant la commission d'examen formée de :

M.	Khalifa AGUIR	Professeur, Université Aix Marseille	Examinateur
M.	Raphaël DELEPEE	Professeur, Université Caen Basse Normandie	Président
M.	Philippe MENINI	Maître de conférences, Université de Toulouse	Examinateur
Mme	Anne-Claire SALAÜN	Maître de conférences, Université de Rennes	Examinatrice
Mme	Hamida HALLIL	Maître de conférences, Université de Bordeaux	Examinatrice
Mme	Corinne DEJOUS	Professeur, Inst Polytech de Bordeaux/ENSEIRB MATMECA	Directrice
M.	Dominique REBIERE	Professeur, Université de Bordeaux	Co-directeur

Remerciements

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

Je remercie l'ensemble des membres du jury : Madame Anne-Claire SALAŰN, Messieurs Khalifa AGUIR, Philippe MENINI, Raphaël DELEPEE, pour leurs remarques pertinentes qui ont contribué à enrichir ce document et la discussion enrichissante sur les perspectives et les axes vers lesquels pourraient s'orienter de futurs travaux.

J'exprime mes sincères remerciements à Corinne DEJOUS, ma directrice de thèse, pour sa patience, sa confiance, sa disponibilité, sa gentillesse, et pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe de recherche MDA et m'avoir donné la possibilité de travailler sur cette thématique de recherche.

Je suis sincèrement reconnaissante à Monsieur Dominique REBIERE, Professeur à l'Université Bordeaux 1 et co-directeur de thèse, pour les débats scientifiques que l'on a partagés et qui ont souvent contribué à l'avancement de ces travaux.

Je remercie également Hamida HALLIL, qui grâce à sa disponibilité, sa rigueur, son énergie, et sa bonne humeur quotidienne, a grandement contribué à la réalisation de ces travaux ainsi qu'à la rédaction de ce mémoire.

Je remercie également Jean-Luc LACHAUD, pour le temps qu'il m'a consacré, pour les discussions scientifiques partagées et pour sa gentillesse.

Je remercie tous les membres du laboratoire IMS et en particulier les membres de l'équipe MDA, Vincent RAIMBAULT, Naima LEBAL, Farida MEZIANE, que j'ai eu du plaisir à côtoyer durant ces quelques années.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire IMS et en dehors du laboratoire qui ont contribué à la réalisation de ces travaux de thèse.

Enfin, je remercie tous les doctorants que j'ai côtoyés durant toutes ces années au sein et en dehors du laboratoire et avec lesquels j'ai pu partager de véritables moments de joies et de rires. Je pense tout d'abord à Wissam, Kamal El Boubkari, Hyacinthe, Ramzi, Youssef, et bien sûr mon ami Noguey. Je remercie Warda, Etienne, Georges, Hassan Friddi, Massar, Walide, Walim, Ibtissem, Hakim.

Sommaire

SOMMAIRE ---------- **3**

LISTE DES FIGURES ---------- **8**

LISTE DES TABLEAUX ---------- **12**

INTRODUCTION GENERALE ---------- **13**

1 ETAT DE L'ART ---------- **17**

1.1 INTRODUCTION ---------- 17

1.2 CONTEXTE DE L'ETUDE ---------- 17

1.2.1 Le cancer colorectal ---------- *17*

1.2.1.1 Techniques de dépistage standard ---------- 18

1.2.1.2 Techniques de traitement ---------- 19

1.2.1.3 Marqueurs tumoraux ---------- 19

1.2.2 Intérêt des biocapteurs ---------- *20*

1.3 LE BIOCAPTEUR ---------- 20

1.3.1 Le biorécepteur ---------- *22*

1.3.1.1 Biorécepteurs d'affinités ---------- 22

1.3.1.2 Biorécepteurs enzymatiques ---------- 23

1.3.1.3 ADN ---------- 23

1.3.1.4 Tissus biologiques ---------- 24

1.3.1.5 Biorécepteurs de synthèse ---------- 24

1.3.1.5.1 Les aptamères ---------- 25

1.3.1.5.2 Notre choix : les polymères à empreintes moléculaires ---------- 25

1.3.2 Transducteurs ---------- *26*

1.3.2.1 Electrochimiques ---------- 26

1.3.2.1.1 Ampérométriques ---------- 26

1.3.2.1.2 Potentiométriques ---------- 26

1.3.2.1.3 Conductimétrie ---------- 27

1.3.2.1.4 Voltampérométrie ---------- 27

1.3.2.2 Optiques ---------- 28

1.3.2.2.1 Luminescence ---------- 28

1.3.2.2.2 Résonance de plasmons de surface (SPR) ---------- 29

1.3.2.3 Mécaniques ---------- 30

1.3.2.3.1 Capteurs à ondes de volume ---------- 30

1.3.2.3.2 Capteurs à ondes de surface ou SAW ---------- 32

1.4 TECHNIQUE DE L'EMPREINTE MOLECULAIRE ---------- 33

1.4.1 Historique ---------- *33*

1.4.2 Principe ---------- *34*

1.4.3 Composants ---------- *35*
1.4.3.1 La Molécule empreinte ---------- 35
1.4.3.2 Le monomère fonctionnel ---------- 35
1.4.3.3 Le réticulant ---------- 36
1.4.3.4 Le solvant porogène et la formation de la porosité ---------- 37
1.4.3.4.1 Morphologie des pores ---------- 38
1.4.3.4.2 Le processus de la séparation de phase ---------- 38
1.4.3.4.3 Effet du poids moléculaire ---------- 39
1.4.3.5 L'initiateur ---------- 40
1.4.4 Voies de synthèse ---------- *40*
1.4.4.1 L'approche covalente ---------- 40
1.4.4.2 L'approche non covalente ---------- 41
1.4.4.3 L'approche semi-covalente ---------- 42
1.4.5 Formats des polymères à empreintes moléculaires ---------- *42*
1.4.5.1 Le monolithe (bulk) ---------- 42
1.4.5.2 Les particules ---------- 42
1.4.5.3 Les films minces ---------- 43
1.4.5.3.1 Inclusion dans une matrice PVC ---------- 43
1.4.5.3.2 Méthode sandwich ---------- 43
1.4.5.3.3 Dépôt par enduction par force centrifuge (spin-coating) ---------- 43
1.4.5.3.4 Monocouche auto-assemblée (SAM) ---------- 44
1.4.5.3.5 Silanisation des surfaces ---------- 44
1.4.5.3.6 Electropolymérisation ---------- 44
1.4.6 Applications des polymères à empreintes moléculaires ---------- *45*
1.4.6.1 Séparation ---------- 45
1.4.6.2 Catalyse ---------- 47
1.4.6.3 Capteurs ---------- 48
1.4.7 Tableau récapitulatif des types de transducteurs utilisant des MIPs ---------- *49*
1.5 CONCLUSION ---------- 51

2 ELABORATION DES COUCHES MINCES DE POLYMERES NON IMPRIMES ---------- 53

2.1 INTRODUCTION ---------- 53
2.2 PREPARATION DU SUBSTRAT DE TEST ---------- 54
2.2.1 Choix du substrat ---------- *54*
2.2.2 Fonctionnalisation de surface ---------- *54*
2.2.2.1 Activation de surface ---------- 54
2.2.2.2 Silanisation ---------- 55
2.3 ELEMENTS RELATIFS AU POLYMERE ---------- 56
2.3.1 Principe de la polymérisation radicalaire ---------- *56*
2.3.2 L'enceinte de polymérisation ---------- *57*
2.3.3 Solution de prépolymérisation ---------- *58*

2.4 DEPOTS EN COUCHES MINCES ---------- 60
2.4.1 La méthode sandwich ---------- 60
2.4.1.1 Principe ---------- 60
2.4.1.2 Protocole de dépôt ---------- 61
2.4.1.3 Résultats et caractérisation des dépôts ---------- 62
2.4.2 La pulvérisation ---------- 64
2.4.2.1 Principe ---------- 64
2.4.2.2 Protocole de dépôt ---------- 65
2.4.2.3 Résultats et caractérisation des dépôts ---------- 66
2.4.3 Le dépôt à la tournette ---------- 68
2.4.3.1 Principe ---------- 68
2.4.3.2 Protocole de dépôts ---------- 70
2.4.3.3 Résultats et caractérisation des dépôts ---------- 72
2.4.3.3.1 Résultats de dépôts préliminaires sans prétraitement ---------- 72
2.4.3.3.2 Influence du prétraitement et limitation de la zone de dépôt ---------- 74
2.5 CONCLUSION ---------- 77

3 INTEGRATION DU FILM MINCE SUR LE CAPTEUR ---------- 79

3.1 INTRODUCTION ---------- 79
3.2 LE CAPTEUR A ONDE DE LOVE ---------- 80
3.2.1 Structure de la ligne à retard ---------- 80
3.2.2 La sensibilité à l'effet de masse ---------- 81
3.2.3 Caractérisation électrique des capteurs à ondes de Love ---------- 82
3.2.3.1 Réponse fréquentielle ---------- 83
3.2.3.2 Réponse temporelle ---------- 84
3.3 ELABORATION ET CARACTERISATION DE LA COUCHE MINCE DE NIP-ACN ---------- 85
3.3.1 Protocole de dépôt ---------- 85
3.3.2 Résultats et caractérisation ---------- 87
3.3.2.1 Mise au point des paramètres de dépôt ---------- 87
3.3.2.2 Caractérisation électrique des capteurs à ondes acoustiques à base de NIP-ACN ---------- 88
3.3.2.3 Influence de la quantité de solvant porogène sur les dépôts en couches minces ---------- 92
3.3.2.4 Profilométrie mécanique ---------- 92
3.4 ELABORATION ET CARACTERISATION DE LA COUCHE SENSIBLE DE MIP/NIP-DMSO ---------- 93
3.4.1 La molécule empreinte ---------- 94
3.4.2 Préparation de la solution prépolymérisée ---------- 94
3.4.3 Protocoles de dépôt de la couche mince de MIP/NIP-DMSO ---------- 95
3.4.4 Protocoles d'extraction et de réinsertion de la molécule empreinte ---------- 96
3.4.4.1 L'étape d'extraction de la molécule empreinte ---------- 96
3.4.4.2 L'étape de réinsertion de la molécule empreinte ---------- 97
3.4.5 Caractérisation des couches minces de MIP/NIP-DMSO ---------- 98

3.4.5.1 Caractérisation électrique des capteurs à ondes acoustiques à base de MIP/NIP-DMSO - 98
3.4.5.2 Profilométrie mécanique et optique ---------- 99
3.4.5.3 Microscopie électronique à balayage (MEB) ---------- 100
3.5 CONCLUSION ---------- 104

4 APPLICATION A LA DETECTION DE GAZ ---------- 107

4.1 INTRODUCTION ---------- 107
4.2 BANC DE TEST ---------- 107
4.2.1 Cellule de test ---------- 107
4.2.2 Electronique de conditionnement ---------- 108
4.2.3 Générateur de vapeurs ---------- 109
4.3 VALIDATION SUR POLYMERE NON IMPRIME ---------- 111
4.3.1 Résultats sous COV avec les couches minces de NIP-ACN ---------- 112
4.3.2 Résultats sous COV avec les couches minces de NIP-DMSO et comparaison avec les couches minces de NIP-ACN ---------- 115
4.4 VALIDATION SUR POLYMERES IMPRIMES (MIP-DMSO) ---------- 118
4.4.1 Résultats des caractérisations sous gaz ---------- 118
4.4.1.1 Résultats sous COV avant l'extraction de la molécule empreinte ---------- 119
4.4.1.2 Résultats après les étapes d'extraction et de recapture de la molécule empreinte ------ 123
4.4.2 Synthèse et influence des tests sous gaz ---------- 128
4.5 ANALYSE COMPARATIVE AVEC DES FILMS MESOPOREUX ---------- 130
4.5.1 Polymères non imprimés : NIP-ACN et NIP-DMSO ---------- 130
4.5.2 Polymères imprimés : MIP-DMSO ---------- 132
4.6 CONCLUSION ---------- 133

CONCLUSION GENERALE ---------- 135

ANNEXE 1 : MATERIEL SALLE BLANCHE ---------- 139

Tournette Suss-Microtec RC8 - IMS Bordeaux ---------- 139
Insoleuse UV-Ozone: modèle 42 JELIGHT, JELIGHT COMPANY INC. ---------- 140
Profilomètre mécanique Dektak ---------- 141
Profilomètre optique Veeco 9080 ---------- 142

ANNEXE 2 : COMPOSES CHIMIQUES ---------- 143

L'acrylamide : fiche de sécurité internationale ---------- 143
L'éthylène glycol dimethacrylate (EGDMA) : fiche de sécurité internationale ---------- 144
AIBN : fiche de sécurité internationale ---------- 145
Dimethylsulfoxide (DMSO) : fiche de sécurité internationale ---------- 146
Acétonitrile : fiche de sécurité internationale ---------- 147

ANNEXE 3 : MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (MEB) ---------- 149

Principe ---------- *149*

Avantages et inconvénients de la technique MEB ---------- *150*

Liste des Figures

FIG. 1-1: SCHEMAS DE PRINCIPE DU BIOCAPTEUR 21
FIG. 1-2: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS ELEMENTS DE RECONNAISSANCE 22
FIG. 1-3: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE CELLULE ELECTROCHIMIQUE A 3 ELECTRODES 28
FIG. 1-4: SCHEMA DU FONCTIONNEMENT DE LA RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE. 29
FIG. 1-5: MICROBALANCE A QUARTZ [48] 31
FIG. 1-6: CAPTEUR SAW A ONDES DE LOVE CONSTITUE DE DEUX LIGNES A RETARD 33
FIG. 1-7: NOMBRE DE PUBLICATIONS SUR LES POLYMERES A EMPREINTES MOLECULAIRES DE 1994 A 2010 [68] 34
FIG. 1-8: PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE L'EMPREINTE MOLECULAIRE 35
FIG. 1-9: LES MONOMERES FONCTIONNELS LES PLUS COURAMMENT UTILISES [69] 36
FIG. 1-10: AGENTS RETICULANT [69] 37
FIG. 1-11: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE MACROPOREUSE D'UN POLYMERE A EMPREINTE MOLECULAIRE 38
FIG. 1-12: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE MACROPOREUSE D'UN MIP SELON LA NATURE DU POROGENE, A) POROGENE A FAIBLE POUVOIR SOLVATANT, B) POROGENE A FORT POUVOIR SOLVATANT. 39
FIG. 1-13: EXEMPLE DE PREPARATION DE POLYMERE IMPRIME BASE SUR DES INTERACTIONS COVALENTES. [72] 41
FIG. 1-14: EXEMPLE DE POLYMERE IMPRIME BASE SUR DES INTERACTIONS NON COVALENTES. [72] 41
FIG. 1-15: ETAPES DU PROCESSUS DE SPE CLASSIQUE 46
FIG. 1-16: MECANISME DE CATALYSE DE LA DEFLUORATION D'UNE CETONE ß-FLUORE [103] 48
FIG. 2-1: MOLECULE DE 3-(TRIMETHOXYSILYL)PROPYLMETHACRYLATE 55
FIG. 2-2: SCHEMA REPRESENTATIF DE LA REACTION DE FONCTIONNALISATION 56
FIG. 2-3: ENCEINTE DE POLYMERISATION SOUS ATMOSPHERE INERTE 58
FIG. 2-4: SCHEMAS DE LA METHODE SANDWICH 61
FIG. 2-5: CARACTERISATION PAR PROFILOMETRE A STYLET ET OPTIQUE INTEGRE, A) PROFIL DU BORD DE LA COUCHE MINCE DE NIP-ACN, B) IMAGE DE SURFACE (ZOOM : 600X). 63
FIG. 2-6: SCHEMAS DE L'ETAPE DE SEPARATION DES LAMES DE VERRE DE LA TECHNIQUE SANDWICH [134] 64
FIG. 2-7: A) PHOTOGRAPHIE, B) SCHEMA DE PRINCIPE DU DISPOSITIF DE DEPOT PAR PULVERISATION 65
FIG. 2-8: IMAGES DE SURFACE DE DEPOT DE NIP-ACN PAR LA METHODE DE PULVERISATION AU PROFILOMETRIE A STYLET (ZOOM : 600X). 66
FIG. 2-9: IMAGE DE DEPOTS DE NIP-ACN PAR LA METHODE DE PULVERISATION AU PROFILOMETRE OPTIQUE. 67
FIG. 2-10: ETAPES DU PROCESSUS DE DEPOT PAR SPIN-COATING. 69

FIG. 2-11: PHOTOGRAPHIE DE LA TOURNETTE (SPIN-COATER)..... 70
FIG. 2-12: CARACTERISATION PAR PROFILOMETRIE MECANIQUE A) PROFIL DU BORD DE LA COUCHE MINCE DE NIP-ACN, B) IMAGE DE SURFACE (ZOOM : 600X) 74
FIG. 2-13 : CARACTERISATION PAR PROFILOMETRIE MECANIQUE A) PROFIL DU BORD DE LA COUCHE MINCE DE NIP-ACN, B) IMAGE DE SURFACE (ZOOM : 600X) 76
FIG. 2-14 : CARACTERISATION PAR PROFILOMETRIE MECANIQUE A) PROFIL DU BORD DE LA COUCHE MINCE DE NIP-ACN, B) IMAGE DE SURFACE (ZOOM : 600X) 76
FIG. 2-15 : IMAGE DE SURFACE PAR PROFILOMETRIE A STYLET DE NIP-ACN AVEC LA DEMARCATION DU DEPOT DUE AU MASQUAGE PAR KAPTON (ZOOM : 600X)..... 77
FIG. 3-1: CAPTEUR A ONDE DE LOVE [48]..... 80
FIG. 3-2: DECALAGE DE LA REPONSE DE PHASE EN TRANSMISSION SUITE A UN AJOUT DE MASSE SUR LE CAPTEUR A ONDE ACOUSTIQUE 82
FIG. 3-3: CARACTERISATION DES CAPTEURS A ONDES DE LOVE A L'ANALYSEUR DE RESEAU 83
FIG. 3-4: REPONSE FREQUENTIELLE OBSERVEE A L'ANALYSEUR DE RESEAU: (A), AMPLITUDE, (B) PHASE 84
FIG. 3-5: REPONSE TEMPORELLE OBSERVEE A L'ANALYSEUR DE RESEAU..... 85
FIG. 3-6: LOCALISATION DE LA COUCHE MINCE DE POLYMERE A EMPREINTE MOLECULAIRE SUR LA ZONE CENTRALE DE LA DOUBLE LIGNE A RETARD ET DESSIN DU MASQUE DE KAPTON. 86
FIG. 3-7: REPONSE FREQUENTIELLE EN TRANSMISSION S_{21} AVANT ET APRES DEPOT DE LA COUCHE DE MIP-DMSO (200 NM) DU CAPTEUR R26B06, A) GAIN, B) PHASE 90
FIG. 3-8: REPONSE FREQUENTIELLE EN TRANSMISSION S_{21} AVANT ET APRES DEPOT DE LA COUCHE MIP-DSMO (6 µM) DU CAPTEUR R22 A04, A) GAIN, B) PHASE..... 91
FIG. 3-9: IMAGE DU PROFILOMETRE A STYLET DU FILM MINCE DE NIP-ACN, A) AVANT DIMINUTION, B) APRES DIMINUTION DE LA QUANTITE DU SOLVANT POROGENE..... 92
FIG. 3-10: CARACTERISATION PAR PROFILOMETRIE MECANIQUE A) PROFIL DU BORD DE LA COUCHE MINCE DE NIP-ACN (220 NM) SUR LE CAPTEUR, B) IMAGE DE SURFACE (ZOOM : 600X) 93
FIG. 3-12: SCHEMAS ET STRUCTURE GENERALE DE L'ADENOSINE MONOPHOSPHATE (REF)..... 94
FIG. 3-13: SCHEMA DU DISPOSITIF UTILISE POUR L'ETAPE D'EXTRACTION 97
FIG. 3-14: REPONSE FREQUENTIELLE EN TRANSMISSION S_{21} TYPIQUE, AVANT ET APRES DEPOT DE LA COUCHE MINCE DE MIP-DMSO (200NM), A) GAIN, B) PHASE..... 99
FIG. 3-15: OBSERVATION PAR PROFILOMETRIE OPTIQUE DES FILMS MINCES DE MIP-DMSO(AVANT EXTRACTION), A) IMAGE 3 D, B) PROFIL 2 D. 100
FIG. 3-16: CLICHES MEB DE COUCHES MIP-AMP AVANT EXTRACTION DU TEMPLATE EN FONCTION DE L'EPAISSEUR : A) ET C) 1 µM, B) ET D) 400 NM. 102
FIG. 3-17: CLICHES MEB DE COUCHES MIP-DMSO APRES EXTRACTION DU TEMPLATE EN FONCTION DE L'EPAISSEUR : A, C ET E) 200 NM, B, D ET F) 1,4 µM. 103
FIG. 3-18: CLICHES MEB DE COUCHES MIP-DMSO APRES RECAPTURE DU TEMPLATE 104
FIG. 3-19: CLICHES MEB DE COUCHES MINCES DE NIP-DMSO : A) BORD DU FILM DE NIP-DMSO, B) SUR LA COUCHE DE NIP-DMSO 104

FIG. 4-1: CELLULE DE TEST : A) ELEMENT SUPERIEUR, B) ELEMENT INTERMEDIAIRE, C) ELEMENT INFERIEUR, D) CELLULE ENTIERE, E) CELLULE SANS LA PARTIE SUPERIEURE 108
FIG. 4-2: SCHEMA DU MONTAGE EN OSCILLATEUR D'UNE LIGNE A RETARD[48] 108
FIG. 4-3: A) PHOTOGRAPHIE DU GENERATEUR DE VAPEUR DE TYPE PUL110, B) SATURATEUR 110
FIG. 4-4: SCHEMA DE PRINCIPE DU GENERATEUR DE VAPEURS [150] 110
FIG. 4-5: COMPARAISON DES VARIATIONS DE FREQUENCE TYPIQUES EN TEMPS REELS D'UN CAPTEUR AVEC UNE COUCHE SENSIBLE DE NIP-ACN ET D'UN CAPTEUR NU, SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TOLUENE ET D'ETHANOL. 112
FIG. 4-6: VARIATIONS DE FREQUENCE EN REGIME PERMANENT DE CAPTEURS AVEC UNE COUCHE MINCE DE NIP-ACN (200 NM) SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ETHANOL ET REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS. LES VALEURS MOYENNES ET LES BARRES D'ERREUR ONT ETE CALCULEES A PARTIR DE 4 EXPERIENCES AVEC DIFFERENTES LIGNES A RETARD. 113
FIG. 4-7: VARIATIONS DE FREQUENCE EN REGIME PERMANENT DE CAPTEURS AVEC UNE COUCHE MINCE DE NIP-ACN (200 NM) SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TOLUENE ET REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS. LES VALEURS MOYENNES ET LES BARRES D'ERREUR ONT ETE CALCULEES A PARTIR DE 4 EXPERIENCES AVEC DIFFERENTES LIGNES A RETARD. 114
FIG. 4-8 : VARIATIONS DE FREQUENCE DE CAPTEUR DOTE D'UNE COUCHE MINCE DE NIP-DMSO, EXPOSES A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ETHANOL ET DE TOLUENE. 115
FIG. 4-9: COMPARAISON DES VARIATIONS DE FREQUENCE D'UN CAPTEUR EQUIPE D'UNE COUCHE MINCE DE NIP-ACN ET D'UN CAPTEUR AVEC UNE COUCHE DE NIP-DMSO, EXPOSES A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ETHANOL, A) EN TEMPS REEL, B) EN REGIME PERMANENT. 116
FIG. 4-10: COMPARAISON DES VARIATIONS DE FREQUENCE D'UN CAPTEUR EQUIPE D'UNE COUCHE MINCE DE NIP-ACN ET D'UN CAPTEUR AVEC UNE COUCHE DE NIP-DMSO, EXPOSES A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TOLUENE, A) EN TEMPS REEL, B) EN REGIME PERMANENT. 117
FIG. 4-11:VARIATIONS DE FREQUENCE D'UN CAPTEUR RECOUVERT D'UNE COUCHE MINCE DE MIP-DMSO AVANT L'ETAPE D'EXTRACTION, SOUMIS A 4000 MG/M3 DE TOLUENE ET D'ETHANOL 119
FIG. 4-12: VARIATIONS DE FREQUENCE D'UN CAPTEUR EQUIPE D'UNE COUCHE DE MIP-DMSO AVANT L'ETAPE D'EXTRACTION SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TOLUENE ET D'ETHANOL... 120
FIG. 4-13: COMPARAISON DES VARIATIONS DE FREQUENCE D'UN CAPTEUR AVEC UNE COUCHE DE NIP-DMSO (200NM) ET D'UN CAPTEUR AVEC UNE COUCHE DE MIP-DMSO (200NM) AVANT EXTRACTION SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ETHANOL. 120
FIG. 4-14: COMPARAISON DES VARIATIONS DE FREQUENCE D'UN CAPTEUR AVEC UNE COUCHE DE NIP-DMSO (200NM) ET UN CAPTEUR AVEC UNE COUCHE DE MIP-DMSO (200NM) AVANT EXTRACTION SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TOLUENE. 121
FIG. 4-15 : VARIATION DE FREQUENCE RELATIVE EN REGIME PERMANENT POUR DIFFERENTS CAPTEURS EQUIPES DE FILMS MINCES DE NIP-DMSO ET MIP-DMSO AVANT EXTRACTION (200 NM) ET D'UN CAPTEUR NU A DIFFERENTES CONCENTRATIONS (A) TOLUENE, (B) ETHANOL. 122

FIG. 4-16: VARIATIONS DE FREQUENCE D'UN CAPTEUR AVEC UNE COUCHE DE MIP-DMSO (APRES EXTRACTION ET RECAPTURE DE LA MOLECULE EMPREINTE) SOUMIS A 4000 MG/M^3 D'ETHANOL ET DE TOLUENE (REPETABILITE)..... 123

FIG. 4-17: VARIATIONS DE FREQUENCE DE CAPTEUR AVEC UNE COUCHE MINCE DE MIP-DMSO SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ETHANOL (AVANT, APRES EXTRACTION ET RECAPTURE)..... 124

FIG. 4-18: VARIATIONS DE FREQUENCE DE CAPTEUR AVEC UNE COUCHE MINCE DE MIP-DMSO SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TOLUENE (AVANT, APRES EXTRACTION ET RECAPTURE). 124

FIG. 4-19: COMPARAISON DES VARIATIONS DE FREQUENCE DE CAPTEUR RECOUVERT DE COUCHE DE MIP-DMSO (APRES EXTRACTION) D'EPAISSEURS DIFFERENTES (200 NM ET 600 NM) SOUMIS A DES CONCENTRATIONS D'ETHANOL. 126

FIG. 4-20: COMPARAISON DES VARIATIONS DE FREQUENCE EN REGIME PERMANANT DE CAPTEURS EQUIPES DE FILMS MINCES D'EPAISSEURS DIFFERENTES (200 NM A 600 NM) SOUMIS A DES CONCENTRATIONS D'ETHANOL, A) MIP-DMSO (APRES EXTRACTION), B) NIP-DMSO..... 127

FIG. 4-21: VARIATIONS DE FREQUENCE RELATIVE DE CAPTEUR DOTE DE COUCHE MINCE DE NIP ET DE MIP-DMSO (APRES EXTRACTION) D'EPAISSEUR 200 NM SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ETHANOL. LA REPRODUCTIBILITE EST INDIQUEE PAR DES BARRES REPRESENTANT L'ECART-TYPE AUTOUR DE LA VALEUR MOYENNE POUR 4 TESTS EFFECTUES AVEC DES CAPTEURS DIFFERENTS. ... 128

FIG. 4-22: VARIATIONS DE FREQUENCE RELATIVE DE CAPTEUR DOTE DE COUCHE SENSIBLE DE MIP-DMSO (AVANT ET APRES EXTRACTION ET RECAPTURE) D'EPAISSEUR 200 NM SOUMIS A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TOLUENE. LA REPRODUCTIBILITE EST INDIQUEE PAR DES BARRES REPRESENTANT L'ECART-TYPE AUTOUR DE LA VALEUR MOYENNE POUR 4 TESTS EFFECTUES AVEC DES CAPTEURS DIFFERENTS. 130

FIG. 4-23: VARIATIONS DE FREQUENCE NORMALISEES PAR RAPPORT A L'EPAISSEUR DES COUCHES MINCES POREUSES POUR LES CAPTEURS RECOUVERTS D'UNE COUCHE MINCE DE NIP (200 NM) DE COUCHES MESOPOREUSES (FT, FS, CS) POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ETHANOL..... 131

FIG. 4-24: VARIATIONS DE FREQUENCE NORMALISEES PAR RAPPORT A L'EPAISSEUR DES COUCHES MINCES POREUSES POUR LES CAPTEURS RECOUVERTS D'UNE COUCHE MINCE DE MIP (200 NM) D'UNE COUCHE MESOPOREUSES (680 NM) POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ETHANOL. 133

Liste des tableaux

TAB. 2-1 : DETAILS DES ELEMENTS DE SYNTHESE DU NIP-ACN 59
TAB. 2-2 : FORMULATION DE LA COMPOSITION DE LA SOLUTION PREPOLYMERISE DE NIP-ACN..... 60
TAB. 2-3 : SYNTHESE DU PROTOCOLE DE DEPOTS DE LA METHODE SANDWICH..... 61
TAB. 2-4 : SYNTHESE DU PROTOCOLE DE DEPOT DE LA METHODE PAR PULVERISATION 66
TAB. 2-5 : SYNTHESE DU PROTOCOLE DE DEPOT A LA TOURNETTE DE FILMS MINCES DE NIP-ACN SUR DES LAMES DE VERRE..... 71
TAB. 2-6 : SYNTHESE DU PROTOCOLE DE DEPOT A LA TOURNETTE DE FILM DE NIP-ACN, AVEC SILANISATION. 72
TAB. 2-7 : ESSAIS DE DEPOT PAR CENTRIFUGATION REALISES AVEC UNE SOLUTION DE POLYMERE NON IMPRIME SUR DES LAMES DE VERRE 73
TAB. 2-8 : ESSAIS DE DEPOT A LA TOURNETTE DE FILMS MINCES DE NIP-ACN SUR DES LAMES DE VERRE ... 75
TAB. 3-1 : SYNTHESE DU PROTOCOLE DE DEPOT DE NIP SUR LES CAPTEURS 87
TAB. 3-2 : ESSAIS DE DEPOT A LA TOURNETTE, REALISES AVEC UNE SOLUTION DE NIP-ACN SUR DES DISPOSITIFS A ONDES ACOUSTIQUES. 88
TAB. 3-3 : FORMULATION DE LA COMPOSITION DE LA SOLUTION PREPOLYMERISEE DE MIP/NIP-DMSO 95
TAB. 3-4 : SYNTHESE DU PROTOCOLE DE DEPOT DE MIP/NIP-DMSO SUR LES DISPOSITIFS A ONDES ACOUSTIQUES 95
TAB. 4-1 : SEQUENCES DE CONCENTRATION DES VAPEURS D'ETHANOL ET DE TOLUENE 111

Introduction générale

En France, les cancers représentent la deuxième cause de mortalité de même que pour les autres pays d'Europe, les Etats-Unis, l'Australie et dernièrement le Japon, ce qui en fait un problème et une priorité majeure de santé publique. Les cancers les plus courants sont les cancers du sein, de la prostate et du côlon. En France le risque de cancer colorectal est très élevé. Les méthodes classiques de dépistage du cancer colorectal reposent sur des techniques invasives pour la plupart, telles que la coloscopie, la rectoscopie (biopsies) et le dosage de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE), la radiographie (échographie endorectale, IRM, Scanner). Malgré les progrès importants réalisés dans sa prise en charge thérapeutique, une fois que le cancer s'est propagé, il devient plus difficile à guérir, d'où l'intérêt crucial de mettre au point des techniques de diagnostics précoces pour la survie du patient et le pronostique de guérison de la maladie. Pour cette raison des méthodes sensibles et spécifiques doivent être développées, et l'analyse des biomarqueurs tumoraux dans le sang, l'urine et les autres fluides corporels, apparaît comme l'une des méthodes des plus prometteuses dans la détection de la maladie.

En marge des techniques analytiques usuelles, les plateformes à base de biocapteurs ont un rôle à jouer en tant que dispositifs peu encombrants et robustes, permettant de réaliser des détections peu coûteuses, fiables, rapides de substances de diverses origines (biomédicales, alimentaires, synthétiques, etc.). Ces plateformes associent typiquement des couches sensibles assurant la reconnaissance de l'analyte ciblé et des microdispositifs de transduction qui vont transformer la reconnaissance moléculaire en un signal physique, optique ou électrique directement mesurable et interprétable. Pour détecter une molécule particulière, le capteur doit être sensible, spécifique et sélectif. La technique de l'empreinte moléculaire (MIP) permet d'obtenir cette spécificité de reconnaissance. C'est une technique dédiée à la reconnaissance de systèmes biologiques, par l'intermédiaire de matériaux qui possèdent des cavités spécifiques en forme, en fonctionnalité et en taille de la molécule cible. Nous proposons dans le cadre de ce travail de contribuer à l'étude et au développement de l'association des capteurs à ondes acoustiques et de la technologie MIP pour la détection de biomarqueurs tumoraux urinaires, visant le développement d'outils non-invasifs pour le diagnostic précoce du cancer colorectal.

Ce travail s'est déroulé au sein de l'équipe MDA (Microsystèmes de Détection à ondes Acoustiques) reconnue pour son implication sur le développement de microcapteurs et microsystèmes dédiés à des applications environnementaux et médicales, en collaboration avec l'ICOA (Institut de Chimie Organique et Analytique – CNRS - UMR 6005) apportant son expertise sur les MIPs. Il a été soutenu financièrement par une bourse d'étude allouée par le CERD (Centre d'Etude et Recherche de Djibouti). Le Projet dans sa globalité est mené au sein d'un partenariat plus large et soutenu financièrement dans le cadre du projet ANR CancerSensor (programme TECSAN).

Ayant conscience de l'importance de la qualité de l'intégration des biorécepteurs dans la conception d'un biocapteur, nous avons, essayé d'apporter notre contribution dans la mise en œuvre et le développement de procédés de dépôt en couche mince de matériaux à empreinte moléculaires, puis dans la mise au point de procédés de caractérisation des matériaux et des dispositifs obtenus.

Ce manuscrit comporte quatre chapitres :

Le premier chapitre présente une étude bibliographique sur les biocapteurs à base de matériaux à empreintes moléculaires. Nous commençons par définir le contexte et les enjeux de l'étude dans l'objectif de réaliser à terme un outil de diagnostic précoce du cancer. Nous reportons les différents types de de biorécepteurs et de transducteurs déjà utilisés dans le monde. Ensuite, nous nous intéressons à développer plus particulièrement les capteurs à ondes acoustiques utilisés dans la conception de ces dispositifs. Enfin, la dernière partie est centrée sur la technologie de l'empreinte moléculaire. Une description générale des MIPs, de leurs voies de synthèse, de leurs formats, de leurs applications et de leurs propriétés est présentée.

Le deuxième chapitre rapporte la mise au point d'un procédé de dépôt reproductible en couche mince de polymère non imprimé (NIP) utilisé comme matériau de référence, compatible avec la propagation de l'onde élastique sur des substrats de test (lames de verre). La préparation des solutions prépolymérisées ainsi que les différentes méthodes de dépôt employées y sont détaillées. Nous présentons également le procédé de fonctionnalisation qui visait à fixer cette couche sensible de polymère à la surface des substrats ainsi que la caractérisation de leur chimie de surface par profilométrie optique et mécanique.

Le troisième chapitre est consacré à l'intégration de couches minces de NIP/MIP à la surface de capteurs à onde de Love. Le choix de la technique de dépôt s'est porté sur le dépôt par force centrifuge (spin-coating) qui a permis d'obtenir les meilleurs résultats en termes d'homogénéité et de reproductibilité. Nous présenterons brièvement le fonctionnement des capteurs à onde de Love utilisés lors de ces travaux. Nous détaillerons les différentes méthodes de caractérisations (microscopie électronique à balayage, profilométrie mécanique et optique) pour étudier la qualité de ces couches minces. Ensuite nous présenterons les caractérisations électriques (réponses en gain et en phase) des dispositifs à ondes acoustiques avant et après dépôt de la couche de polymère afin de vérifier la compatibilité avec l'onde acoustique.

Enfin, la dernière partie du manuscrit porte sur la caractérisation sous gaz des dispositifs à ondes de Love à base de polymère non imprimés (NIP-ACN/DMSO) et imprimés (MIP-DMSO) avec solvant acétonitrile (ACN) ou dimethylsulfoxide (DMSO). Le banc de test utilisé lors des travaux de caractérisation en temps réel sous gaz, est brièvement décrit. Cette méthode de caractérisation sous éthanol et toluène avant dépôt des différents films puis après dépôt, après protocole d'extraction de l'espèce cible modèle, enfin après recapture, a permis d'étudier certaines propriétés mécaniques (porosité) de ces films minces et de confirmer la rupture et la reformation des liaisons entre molécules empreintes et le polymère et également. En effet, le but de cette étude était d'optimiser la surface active du capteur ainsi équipé, afin d'obtenir une sensibilité élevée pour la détection de nucléosides (biomarqueurs du cancer colorectal). Par ailleurs, ces résultats ont été comparés aux résultats obtenus au cours de travaux antérieurs menés sur des films mésoporeux (ref tlb). L'application en milieu liquide elle-même, fait l'objet d'un travail mené parallèlement et en décalage dans le cadre de la thèse de Naima Lebal.

1 Etat de l’art

1.1 Introduction

Le cancer colorectal est l’un des cancers les plus mortels (deuxième cause des décès liés au cancer). En conséquence, il est très important de le détecter le plus tôt possible, afin de le traiter et de suivre avec précision l'efficacité du traitement en vue de limiter les récidives. Pour ce faire, les biocapteurs représentent une voie prometteuse dans la recherche de techniques de détection de plus en plus spécifiques, rapides, sensibles comparés aux autres moyens existants qui apparaissent lourds et fastidieux.

Durant ces dernières années, l’association de la technologie des capteurs et de la technique de l’empreinte moléculaire suscite de plus en plus d’intérêt dans la communauté scientifique. Ce succès est dû aux nouvelles exigences qui apparaissent dans de nombreux domaines tels que l'environnement, l’agroalimentaire et notamment dans le diagnostic et l'analyse clinique. Les biocapteurs ainsi obtenus, fournissent des plates-formes de pointe pour l'analyse des biomarqueurs du cancer, alliant robustesse, facilité et simplicité d’utilisation. De plus, ils sont susceptibles de présenter un faible coût de fabrication (réalisation collective et intégration système) et de fournir des réponses rapides.

Après une présentation du contexte de l’étude, la seconde partie de ce chapitre portera sur les biocapteurs en présentant les différents types de biorécepteurs et de transducteurs les plus communément utilisés dans la conception de ces dispositifs. Une troisième partie visera à expliquer la technologie des polymères à empreintes moléculaires, les différentes techniques classiquement utilisées pour leur préparation, ainsi que leurs différents formats de synthèses et leurs principaux domaines d’applications. Enfin un tableau synthétisera de manière comparative les principales études et caractéristiques de biocapteurs à base de MIP.

1.2 Contexte de l’étude

1.2.1 Le cancer colorectal

La plupart des cancers naissent des interactions entre l’environnement et la génétique. C’est une pathologie qui est définie par une dérégulation des systèmes de contrôle de la croissance des cellules et caractérisée par l’accumulation de défauts

spécifiques d’ordre génétique et épigénétique. En progressant, ces cellules aboutissent à la formation, au sein du tissu, d'une masse de cellules anormales appelées tumeurs, qui développent la capacité d’envahir les tissus avoisinant en se métastasant à d'autres organes et systèmes. Lorsqu’elles sont bénignes, ces tumeurs sont petites, localisées et peuvent être retirées par la chirurgie. Maligne, cette croissance anormale des cellules provoque la formation d'une masse tumorale qui peut récidiver même après ablation et qui résiste à l'apoptose et aux défenses immunitaires du corps. Arrivé au stade métastasique, le cancer devient incurable.

Ces dernières décennies, le cancer colorectal constitue un problème majeur de santé publique au niveau mondial. Il représente la deuxième cause de mortalité associée au cancer en Amérique du Nord et en Europe occidentale [1] [2]. En France, plus de 37 000 nouveaux cas en 2005 et 17 000 décès en 2003 ont été enregistrés [3]. Malgré les progrès importants réalisés dans sa prise en charge, une fois que le cancer du côlon s'est propagé dans les ganglions lymphatiques ou dans d'autres zones du corps, il devient plus difficile à guérir. Il est donc primordial de le détecter le plus tôt possible, afin d’augmenter les chances de guérisons et de prévention de récidive, d’où la mise en place de la politique du diagnostic précoce dès l’apparition des premiers symptômes. Cette politique repose sur la réalisation rapide d’examens à visée diagnostique pour mettre en évidence la présence d’un cancer devant des signes non spécifiques.

1.2.1.1 Techniques de dépistage standard

De nombreuses méthodes de dépistage du cancer colorectal sont actuellement utilisées. La méthode la plus courante est la réalisation de tests de saignement, qui consistent à rechercher la présence de sang dans les matières fécales des patients. Néanmoins, cette méthode présente de nombreux inconvénients, notamment à cause du test de coloscopie qui l’accompagne généralement en cas de test positif, non dénuée des risques pour les patients (douleurs, perforations, hémorragies, nausées, vomissements, angoisses etc…). De plus, la présence probable de sang n'est pas toujours synonyme de présence d’une pathologie cancéreuse. La plupart de ces tests sont réalisés par l’évaluation d’un test au guaiac (Hémoccult) qui a l’avantage d’être bon marché. Des tests immunologiques spécifiques, permettant une évaluation quantitative du sang dans les selles avec une meilleure sensibilité, ont été développés. En outre, les nouvelles méthodes de dépistage tels que la rectosigmoïdoscopie [4] ou le coloscanner apparaissent comme étant de bonnes alternatives.

1.2.1.2 Techniques de traitement

A partir du début des années 1960, le suivi thérapeutique pharmacologique (STP) a été utilisé dans la prise en charge clinique des patients [5]. Cette technique est fondée sur la mesure et l’analyse des concentrations de médicament dans les liquides biologiques et l'individualisation des doses ou des horaires de prises de médicaments, dans le but de minimiser les toxicités et d’adapter pour un patient donné des posologies médicamenteuses en fonction des connaissances acquises d'après les résultats thérapeutiques. En règle générale, le médicament doit remplir plusieurs critères pour que le suivi thérapeutique puisse être validé.

Cette technique est largement appliquée à une grande variété de médicaments issus de différentes classes thérapeutiques, et surtout à certains agents chimiothérapeutiques contre le cancer. Le STP a été utilisé avec succès pour optimiser la chimiothérapie du cancer colorectal. Elle repose sur la prise de médicaments cytotoxiques (5-fluorouracile, l'irinotecan et l’oxaliplatine) ainsi que l’utilisation d’agents biologiques ciblés (anticorps). Cependant cette technique est actuellement limitée par les facteurs suivants :

- le manque de plages de concentrations établies,
- la variabilité pharmacocinétique intra-individuelle,
- la toxicité associée à l'exposition systémique,
- le complexe pharmacodynamique.

Pour contourner ces limitations, d’autres approches ont été étudiées et développés pour des traitements anticancéreux en évaluant les concentrations des marqueurs tumoraux dans le plasma ou les urines.

1.2.1.3 Marqueurs tumoraux

Les biomarqueurs tumoraux sont des substances biologiques qui sont localisés dans le sang ou les autres fluides corporels (sérum, plasma, urine, fluide céphalo-rachidien) lorsqu’on est atteint d’un cancer. Ils peuvent avoir diverses origines moléculaires (ADN, ARN, protéine) [6].

L’étude des altérations de l’ARN représente une alternative intéressante en cancérologie. En effet ces altérations induisent un taux anormalement élevé de nucléosides modifiés dans les urines des patients. Ces nucléosides se sont formés suite à une modification chimique des nucléosides initialement présents dans l'ARN. Ne pouvant plus être réutilisés ou dégradés, ils sont excrétés dans les urines sous forme de molécules [7].

Plusieurs études ont utilisé ces niveaux élevés de nucléosides modifiés dans les échantillons d'urine comme biomarqueurs tumoraux [8], [9] .

L'intérêt de l'usage des marqueurs tumoraux dans la prise en charge des patients souffrant d'un cancer a longtemps été contesté. Cependant, de nombreux cancérologues sont convaincus de l'utilité de la cinétique de ces marqueurs grâce notamment aux récents progrès thérapeutiques. En effet, la surveillance de l'évolution de leurs concentrations renseigne le clinicien sur l'efficacité du traitement et permet la détection précoce des récidives. C'est le cas du test PSA (Prostate-Specific-Antigen) qui permet de mesurer la concentration d'une protéine spécifique dans le sang.

Les marqueurs tumoraux tels que les antigènes carcino-embryonnaires (CEA199, CA125, CEA-CAM 5, AFP) sont utilisés dans le cadre de la surveillance d'un cancer déjà diagnostiqué, ou dans le cadre d'une démarche de dépistage. Cependant, leur utilisation n'est pas recommandée pour le diagnostic du cancer colorectal en particulier dans le stade précoce, à cause notamment de leurs faibles sensibilités et spécificités.

1.2.2 Intérêt des biocapteurs

Les biocapteurs sont des plateformes de pointe pour l'analyse de biomarqueurs et présentent de nombreux avantages tels que leur simplicité d'utilisation, leur faible coût, leur rapidité et leur robustesse tout en offrant la capacité de réaliser des tests multi-analytes. Pour les tests diagnostiques du cancer une plateforme multicapteurs serait un choix judicieux pour le diagnostic multi-marqueur (capacités de multiplexage). La préparation des échantillons est une partie du système biocapteur.

Dans le cadre de ces travaux de thèse visant l'étude d'un biocapteur pour la détection de nucléosides modifiés urinaires pour le contrôle thérapeutique du cancer colorectal, l'approche qui sera développée utilisera les développements les plus récents dans les domaines des biocapteurs acoustiques associés aux matériaux à empreinte moléculaire. Pour développer des technologies appropriées de biocapteurs et garantir la spécificité des dispositifs, des marqueurs spécifiques doivent être identifiés, ce travail est mené en parallèle par nos partenaires dans le cadre du projet ANR CANCERSENSOR.

1.3 Le biocapteur

Ces dernières années, le marché des biocapteurs est en forte expansion avec des applications dans différents domaines tel que l'environnement, les études toxicologiques, la défense, l'industrie alimentaire. Par ailleurs, les progrès technologiques importants dans

les domaines de l'automatisation et de la microélectronique ont ouvert le champ à la fabrication, en grand nombre, de dispositifs fiables et de faible coût.

Par définition un biocapteur est un dispositif incorporant un système de reconnaissance biologique, appelé biorécepteur, associé à un transducteur qui représente la méthode de détection. Le but principal d'un biocapteur est de transformer une reconnaissance biologique en un signal physique mesurable.

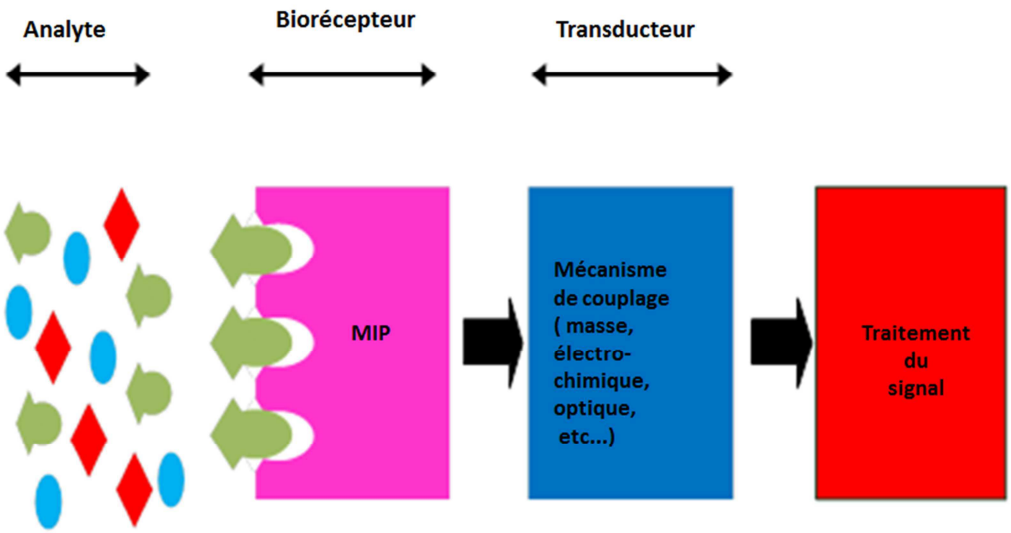


Fig. 1-1: schéma de principe du biocapteur

La Figure Fig. 1-1: schéma de principe *du biocapteur* illustre le principe conceptuel du processus de biodétection qui permet un classement selon :

- le type de biorécepteur : système anticorps / antigène, acides nucléiques, interactions enzymatiques, interactions cellulaires (micro-organismes, bactéries, algues, protéines), biorécepteurs synthétiques ;
- le type de transducteur : optiques (luminescence d'absorption, résonance plasmonique de surface, etc…), électrochimiques (ampérométrie, impédancemétrie, potentiomérie etc…), mécaniques notamment les ondes acoustiques.

Nous décrirons brièvement en suivant ces différents éléments, afin de situer les différentes technologies retenues dans le cadre de ces travaux. De nombreux ouvrages existent dans ce domaine, où le lecteur pourra trouver des présentations plus détaillées de ces technologies, citons par exemple [10].

1.3.1 Le biorécepteur

Les biorécepteurs (cf. Fig. 1-2) représentent l'élément central des biocapteurs. Ils interagissent directement avec l'analyte et jouent également le rôle d'interface. Toutefois, ils peuvent prendre de nombreuses formes et sont généralement classées en cinq grandes catégories différentes décrites en suivant.

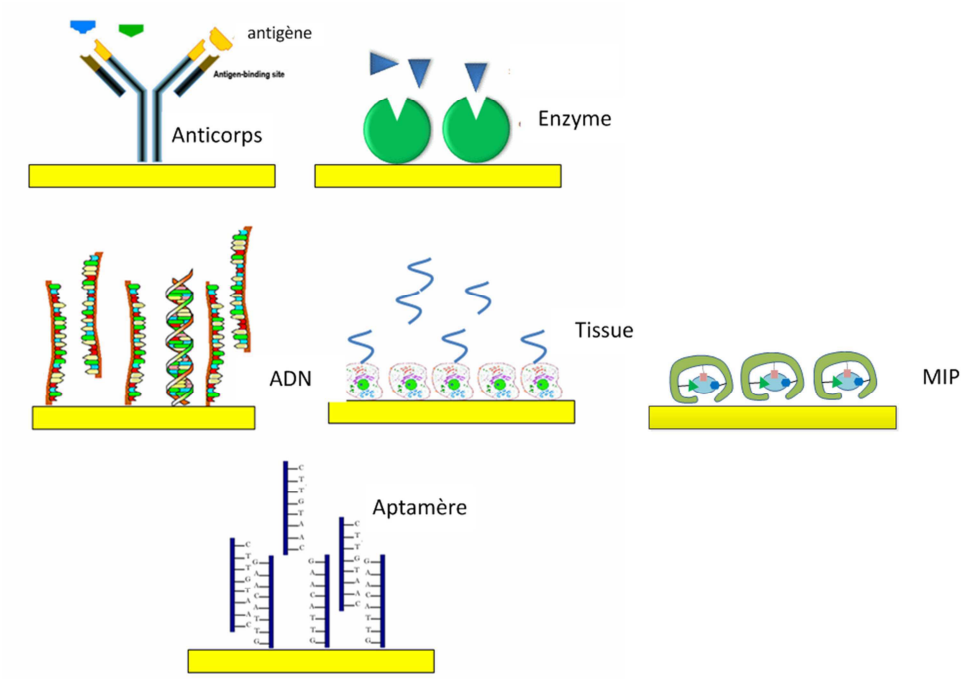


Fig. 1-2: Représentation schématique des différents éléments de reconnaissance

1.3.1.1 Biorécepteurs d'affinités

Un anticorps est une biomolécule complexe, constituée de plusieurs acides aminés disposés selon une séquence hautement ordonnée. Ils possèdent des capacités de liaisons pour des structures très spécifiques (antigènes). L'interaction entre un anticorps et son antigène est comparable à un système de clé-serrure par laquelle la configuration géométrique spécifique d'une clé unique permet d'ouvrir une serrure. Cette propriété unique leur confère des avantages avérés en tant que biorécepteur.

La radioimmunossay (RIA) est une méthode de dosage immunologique dans lequel l'anticorps est marqué par un radioélément [11]. C'est une technique très courante qui a été appliquée à un grand nombre de domaines (pharmacologie, chimie clinique, médecine légale, environnement, épidémiologie moléculaire et l'agriculture). Néanmoins, elle présente plusieurs inconvénients, tels que le coût de l'instrumentation, la durée de vie limitée des radio-isotopes, et les potentiels d'effets biologiques délétères inhérents aux matières radioactives.

L'ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) est une autre technique immunologique largement répandue qui permet de détecter une réaction anticorps-antigène grâce à la réaction colorée produite par l'action d'un substrat sur une enzyme préalablement fixée à l'anticorps. Cette détection fondée sur une réaction immunologique hautement spécifique, ne nécessite pas de préparation lourde de l'échantillon[12], [13].

1.3.1.2 Biorécepteurs enzymatiques

L'enzyme est un autre type de biorécepteur couramment utilisé. Elles sont choisies en fonction de leurs capacités de liaison et de leur activité catalytique. Dans les mécanismes de reconnaissance biocatalytiques, la détection est amplifiée par une réaction catalysée par des macromolécules appelées biocatalyseurs. A l'exception d'un petit nombre de catalyseurs (molécules d'acide ribonucléique), la pluparts des enzymes sont des protéines. Certaines enzymes nécessitent une composante chimique supplémentaire appelée cofacteur, qui peut être, soit des ions inorganiques (Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}), soit un complexe, organique ou une coenzyme. L'activité catalytique des enzymes présente l'un des plus faibles seuils de détection. Des enzymes couplées à des récepteurs peuvent être aussi utilisées pour modifier les mécanismes de reconnaissance. Par exemple, l'activité d'une enzyme peut être modulée lorsqu'un ligand se lie au récepteur. Cette activité enzymatique est parfois améliorée par une réaction en cascade qui conduit à des réactions cellulaires complexes [14]. Par exemple, des enzymes ont été immobilisées sur un réseau de fibres optiques pour réaliser une détection simultanée de la pénicilline et l'ampicilline [15]. Plus récemment *Li et al.* ont développé un biocapteur électrochimique à base d'enzyme, pour déterminer la glycémie dans le sérum sanguin humain [16].

1.3.1.3 ADN

Le développement des acides nucléiques comme biorécepteur pour des applications biocapteurs a permis des progrès dans certains domaines comme la génomique. Cette technologie exploite la complémentarité des oligonucléotides constitutifs de l'ADN pour réaliser la bioreconnaissance. Lorsque la séquence de base composant une certaine partie de la molécule d'ADN est connue, alors la séquence complémentaire appelée communément sonde, peut être synthétisée et marquée via un composé optiquement détectable (marqueur fluorescent). La biodétection s'effectue par une réaction d'hybridation des séquences complémentaires d'ADN extraites préalablement de la molécule ciblée. Les couches de reconnaissance d'acide nucléique sont facilement synthétisables, réutilisables, hautement spécifiques [17] et permettent de mesurer la

présence d'une seule espèce de molécules dans un mélange complexe [18]. Récemment, *Yeh et al.* [19] ont réalisé à l'aide de biocapteurs avec une couche sensible d'ADN, une détection de bactéries sur la base de l'hybridation de l'ADN avec une limite de détection de 8,25 ng / ml. Afin d'améliorer la détection d'ADN possédant des séquences courtes, *Liu et al.* ont élaborés un biocapteur ADN basé sur des nanoparticules d'or creuses [20].

1.3.1.4 Tissus biologiques

Les tissus biologiques (micro-organismes, cellules, structures cellulaires) ont largement été utilisés dans le développement des biocapteurs et des biopuces. Les biocapteurs cellulaires sont de nouvelles structures hybrides utilisant les cellules vivantes comme biorécepteur afin de déterminer les changements physiologiques engendrés par l'application d'un stimulus interne ou externe. La bioreconnaissance peut se fait par l'intermédiaire d'une cellule entière, d'un micro-organisme ou d'un composant cellulaire qui est capable de réagir ou de se lier de manière spécifique à certaines espèces. Néanmoins, les biocapteurs cellulaires exploitent dans la majorité des cas, les interactions enzymatiques en raison de leur faible limite de détection et de leur stabilité. Nombre de ces systèmes cellulaires basés sur ce type de biorécepteur, reposent sur leurs propriétés catalytiques ou pseudo-catalytiques.

Les micro-organismes sont une forme de biorécepteur qui s'appuie sur l'absorption de certains produits chimiques. Des micro-organismes tels que des bactéries et des champignons ont ainsi été utilisés comme indicateurs de toxicité ou pour la mesure des substances spécifiques. Par exemple, l'emploi du métabolisme cellulaire, de la respiration cellulaire ou de la bioluminescence bactérienne permettent d'évaluer les effets toxiques des métaux lourds. De nombreux organites cellulaires peuvent être isolés et utilisés comme biorécepteur. Les protéines servent souvent d'élément de reconnaissance pour les réactions intracellulaires qui auront lieu plus tard ou dans une autre partie de la cellule. Ces protéines pourraient tout simplement être utilisées pour le transport d'un produit chimique d'un endroit à un autre, comme porteuse ou canal sur une surface cellulaire. Dans la littérature de nombreux capteurs couplés à des cellules sont utilisés pour le diagnostic médical [21].

1.3.1.5 Biorécepteurs de synthèse

Dans le dessein d'améliorer la stabilité et de promouvoir l'industrialisation de dispositifs biocapteurs, des éléments biomimétiques ont été synthétisés. En effet, cette forme de biorécepteur synthétique imite le comportement des biorécepteurs naturels. Différentes méthodes ont été développées au fil des années pour concevoir des récepteurs

biomimétiques, on trouve généralement des molécules synthétisés telles que les polymères à empreintes moléculaires ou MIPs (Molecularly Imprinted Polymers) et les aptamères.

1.3.1.5.1 Les aptamères

Les aptamères sont des acides nucléiques synthétiques de longueur généralement comprise entre 20 et 60 nucléotides, choisis à partir d'une banque aléatoire de séquences selon leur capacité à reconnaître et à fixer un ligand. Ils sont très souvent employés en biochimie. Ils possèdent de nombreux atouts tels que leur flexibilité élevée, leur stabilité, leur facilité de fixation et leurs possibilités de modifications chimiques et de marquage. Ils peuvent être générés par une sélection in vitro ou par SELEX (Systemic-Evolution-of-Ligands-by-Exponential-enrichment) pour lier des cibles variées pour lesquelles des anticorps sont difficiles à obtenir (telles que les toxines). Dernièrement, Yoon et ses collègues [22] et plus récemment *Kwon et al*. [23] sont parvenus à détecter la thrombine (protéine de la coagulation sanguine) à des concentrations sub-nanomolaires dans des milieux complexes. Grâce notamment à leur forte stabilité et leur régénération facile, les aptamères sont en concurrence avec les anticorps pour assurer la biodétection dans les biocapteurs. En effet, des aptamères possédant des affinités et spécificités similaires à celles des anticorps pour des molécules variées (acides aminés, antibiotiques, ARN ou ADN, protéines) ont été obtenus [24].

1.3.1.5.2 Notre choix : les polymères à empreintes moléculaires

La technologie de l'empreinte moléculaire utilise la création d'un complexe tridimensionnel qui « enregistre » la forme et les positions des groupements fonctionnels de la molécule patron (*template*). Ainsi le polymère obtenu peut reconnaître de façon sélective et spécifique la molécule utilisée dans le processus d'impression. Cette technologie représente une alternative prometteuse aux systèmes biologiques. Dans le cadre de nos travaux, nous avons utilisé les polymères à empreintes moléculaires (MIP/NIP) comme biorécepteur dans l'objectif de détecter des biomarqueurs du cancer colorectal comme outil non invasif de diagnostic précoce. Ils présentent de nombreux avantages indéniables comparés aux biorécepteurs naturels [25], [26] . Nous reviendrons plus loin sur ce type de biorécepteur.

La partie suivante présentera les différents types de transducteurs en mettant plus particulièrement en avant les études associant les MIPs.

1.3.2 Transducteurs

La classification des biocapteurs peut également se faire sur la base des méthodes de transduction qu'ils mettent en œuvre. La plupart des formes de transduction peuvent être classées selon les trois catégories suivantes :

- méthode de détection électrochimique
- méthode de détection optique
- méthode de détection mécanique

1.3.2.1 Electrochimiques

Les principaux détecteurs utilisant une transduction électrochimique sont décrits ci-dessous. Nous illustrons d'exemples typiques de travaux les associant à un biorécepteur, généralement de type MIP.

1.3.2.1.1 Ampérométriques

Les biocapteurs ampérométriques sont constitués d'une électrode de travail et d'une électrode de référence. Ils sont basés sur la mesure des variations de l'intensité de courant traversant une cellule électrochimique à potentiel constant. Ces variations de courant dépendent de l'oxydo-réduction d'espèces électroactives qui a lieu à l'électrode de travail. Le courant est linéairement dépendant de la concentration de l'analyte ce qui les rend très sensible [27]. *Kriz et al*. ont mis au point un biocapteur sur ce principe à base de MIP pour la détection de morphine à visée thérapeutique [28]. *Pesavento et al*. ont conçu un capteur ampérométrique à base de MIP pour la détection de sérotonine dans le plasma sanguin par l'intermédiaire d'électrodes en graphite [29]. Plus récemment, *Neto et al.* ont développé un capteur ampérométrique pour détecter le 4-aminophénol avec une bonne sensibilité et reproductibilité [30].

1.3.2.1.2 Potentiométriques

La potentiométrie est une méthode électrochimique qui repose sur la détermination de la différence de potentiel créée entre une électrode de mesure plongée dans la solution à analyser et une électrode de référence. Cette différence de potentiel est proportionnelle au logarithme de la concentration des éléments à détecter selon la loi de Nernst :

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln q \qquad (1\text{-}1)$$

Avec E : différence de potentiel entre le capteur et l'électrolyte, E_0: potentiel standard de l'espèce considérée, R : constante des gaz parfait, q : activité de l'ion à mesurer, T : température en kelvin, z : valence de l'ion, F : constante Faraday.

Les systèmes potentiométriques peuvent être appliqués à l'élaboration des transducteurs tels que les ChemFETs (Chemical-sensitive Field-Effect Transistors) ou les ISFET (transistor à effet de champ sélectif aux ions). La surface de ces substrats semiconducteurs est recouverte avec un film ou une membrane, qui sera sensible aux changements de potentiel à la surface, résultant d'une réaction chimique ou d'un changement de charge. L'intérêt de ces dispositifs réside dans leur facilité de mise en œuvre et de miniaturisation [31].

Il existe peu de travaux de recherche employant cette technique en association avec des MIPs (*Heng et al.* [32], *Kitade et al*. [33], *Zhou et al* [34]). Les travaux de *Sidage et al.* décrivent un capteur potentiométrique à base de MIP pour la détection de chlorhydrate de levamisole [35]. Dans cet exemple, le seuil de détection est de 1μmol.L^{-1}, le temps de réponse est relativement faible (< 15s) et la membrane a pu être réutilisée pendant 4 mois sans observation d'altérations des réponses du capteur. *Liang et al.* ont utilisé un biocapteur potentiométrique dont la couche sensible est un polymère à empreinte moléculaire pour la détection de mélamine dans le lait [36].

1.3.2.1.3 Conductimétrie

La détection impédancemétrique ou conductimétrique est basée sur la mesure de la conductivité d'une solution électrolytique soumise à un faible courant alternatif afin d'éviter une électrolyse qui viendrait perturber la mesure du signal. Elle est basée sur la mesure de variations de conductance et de capacitance qui ont lieu au niveau de l'interface électrode-analyte. Dernièrement un capteur électrochimique impédancemétrique à base de polymère à empreintes moléculaires (MIP) a été développé pour la détection de la créatinine [37].

1.3.2.1.4 Voltampérométrie

La voltampérométrie (voltammétrie) est une technique électrochimique qui permet de détecter quantitativement un grand nombre d'analytes en mesurant le courant en fonction du potentiel entre deux électrodes spécifiques d'une cellule électrochimique à trois électrodes (cf. Fig. 1-3). La forme du potentiel appliquée permet de qualifier le type de voltampérométrie (cyclique, linéaire, à ondes carrées etc.).

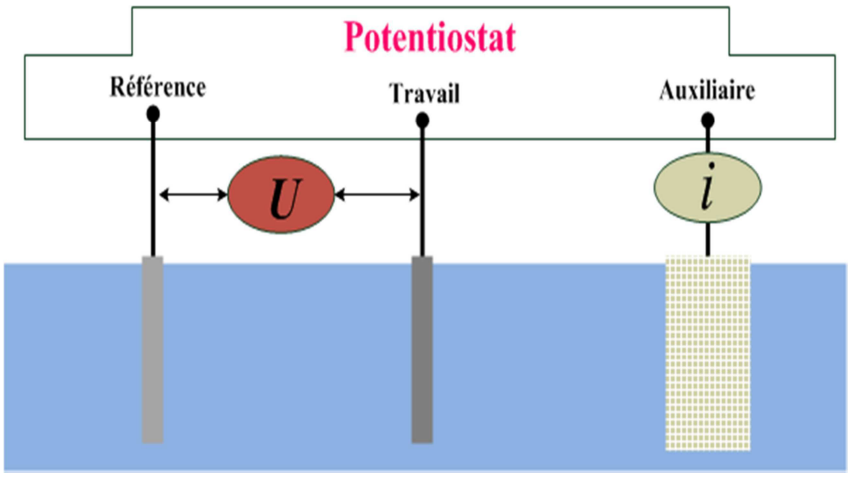


Fig. 1-3: Représentation schématique d'une cellule électrochimique à 3 électrodes

L'association de ce principe de transduction aux matériaux à empreintes moléculaires est très répandue, grâce notamment à leur sensibilité et au large choix de gammes de potentiels et d'électrodes. *Blanco-Lopez et al*. ont ainsi développé des capteurs de ce type pour la détection de l'acide vanillylmandélique [38]. *Roy et al*. ont rapporté l'utilisation d'un capteur voltampérométrique pour détecter des polluants (para-nitrophenol) dans l'eau [39].

1.3.2.2 Optiques

Un grand intérêt a été accordé aux techniques optiques dans le suivi des phénomènes biochimiques exploités dans la biodétection. Un avantage important réside dans la capacité à sonder les surfaces et les films de manière non destructive. En outre, ils présentent des avantages en termes de vitesse, de sécurité, de sensibilité et de robustesse qui permettent de réaliser des détections *in situ* en temps réel. Ils ont également grâce à l'évolution des technologies d'intégration, une bonne aptitude à la miniaturisation et à la télédétection de multi-analyte, permettant d'offrir une large gamme de paramètres mesurables pour la biodétection. Les principaux types de capteurs optiques exploitent les propriétés décrites ci-dessous :

1.3.2.2.1 Luminescence

Les biocapteurs basés sur la détection par la luminescence (propriété d'une molécule de restituer rapidement sous forme lumineuse une partie de l'énergie absorbée) sont très répandus et très variés. Ce principe connaît de nombreuses variantes, notamment:

- détection par fluorescence : consécutif à une excitation par une énergie lumineuse,

- détection par chimiluminescence : consécutif à une excitation par une réaction chimique.

La microscopie par fluorescence [40] constitue une méthode de référence pour les applications à base de MIPs, de par sa sensibilité et sa capacité à évaluer rapidement, et ce, malgré la nécessité de marquage des cibles. Ainsi *Sulitzky et al*. ont évalué l'homogénéité des couches de MIPs greffées à la surface d'un substrat en verre (silice) [41].

La détection de la lumière émise par la dégradation biochimique d'un composé présente l'avantage de ne pas nécessiter l'utilisation d'une source d'excitation (la fluorescence), ou un filtre optique pour la détection du signal résultant, car le courant de la lumière émise est directement proportionnel à la concentration de l'analyte. Pour ces raisons, la chimiluminescence représente une technique de détection attrayante et par exemple, Jing et ses collègues [42] ont récemment réalisé une détection de lysozymes dans des échantillons d'urine humaine avec un biocapteur utilisant le principe de chimiluminescence associé à des MIPs.

1.3.2.2.2 Résonance de plasmons de surface (SPR)

Ce phénomène de résonance optique repose sur la réflexion totale d'une onde incidente induisant la génération de plasmons de surface sous la forme d'un champ évanescent. Les biocapteurs utilisant la résonance de plasmons de surface sont sensibles aux changements d'indice de réfraction se produisant à la surface du capteur. C'est une méthode de détection directe qui ne nécessite pas l'utilisation de marqueurs (Cf. Fig. 1-4).

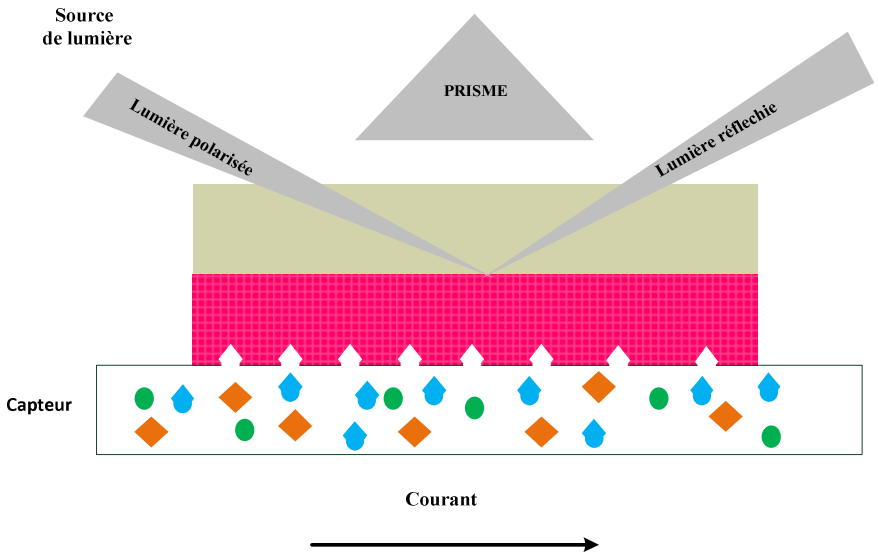


Fig. 1-4: Schéma du fonctionnement d'un transducteur à résonance de plasmons de surface

Les plateformes SPR, qui classiquement utilisent des récepteurs naturels comme élément de reconnaissance [43], ont rarement été combinés aux MIPs. Ceci est dû au fait que le champ évanescent généré à la surface n'est pas sensible aux changements de l'indice de réfraction produits par des analytes de petite taille tels que les empreintes moléculaires et de ce fait peuvent être difficilement détectables à de très faibles concentrations. L’équipe de *Taniwaki* [44] est parvenue à obtenir des résultats intéressants en réalisant une biodétection du 9-ethyladenine à l’aide d’une plateforme SPR. *Li et al.* [45] ont employé une plateforme SPR couplée à un film de MIP de 85 nm d'épaisseur pour la détection de la L-phénylalanine ester éthylique. Il est à noter que ces expériences ont été réalisées avec des échantillons de concentration relativement élevée. Néanmoins, plusieurs résultats encourageants ont récemment été publiés [46], [47].

1.3.2.3 Mécaniques

C’est en 1880 que *les frères Curie* ont découvert la piézoélectricité qui est le principe de base du fonctionnement des capteurs à ondes acoustiques. L'application du mécanisme de transduction piézoélectrique aux capteurs a été réalisée en premier lieu par l’équipe de *Sauerbrey* dès 1959. La difficulté de l’application résidait surtout dans la détermination de l'épaisseur des couches minces intégrées à la surface du capteur.

Les capteurs piézoélectriques sont largement commercialisés. De nombreuses couches bioréceptrices ont été étudiées pour détecter divers composés chimiques (*King* 1964) ou biologiques (*Shons et al.* en 1972).

1.3.2.3.1 Capteurs à ondes de volume

Les biocapteurs à ondes de volume, appelés généralement microbalance à quartz sont classiquement constitués d'un disque mince de quartz de coupe AT mis en contact avec deux électrodes métalliques, comme représenté sur. La Figure Fig. *1-5*. Soumis à l'application d'une tension alternative entre les électrodes, le cristal oscille typiquement selon un mode de cisaillement transversal, à une fréquence de résonance dépendant des caractéristiques du dispositif, inversement proportionnelle à l'épaisseur du cristal piézoélectrique.

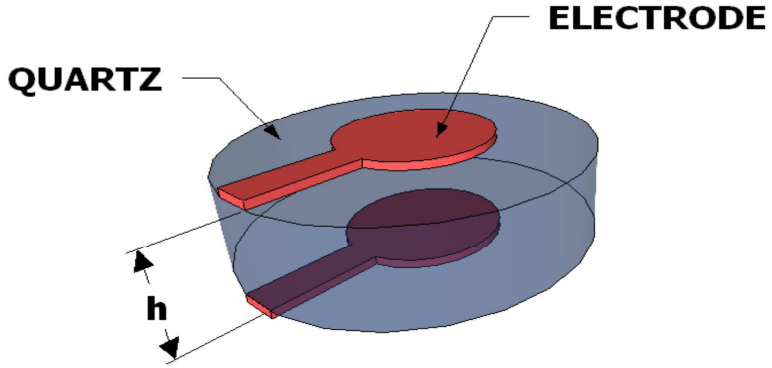


Fig. 1-5: Microbalance à quartz [48]

Lorsque la surface du cristal est soumise à une augmentation de la masse (Δm), le changement de fréquence de la fréquence d'oscillation (Δf_m) peut être exprimé par l'équation de Sauerbrey [49]:

$$\Delta f_m = \frac{-N 2 f_0^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{S} \qquad (1\text{-}2)$$

Avec :

- N : le rang de l'harmonique (N = 1, 3, 5,7….),
- ρ_q : la masse volumique du quartz (g.cm^{-3}),
- μ_q : le module de cisaillement (g.cm^{-1}.s^{-1}),
- S : l'aire de l'électrode,
- C_Q : la sensibilité,
- Δm : la masse,
- A : la surface du cristal,
- f : la fréquence de résonance (Hz).

L'utilisation des plateformes piézoélectriques s'est développée à un rythme relativement plus lent comparé aux plateformes électrochimiques et optiques. Néanmoins, ce type de transducteur présente des avantages non négligeables en matière de coûts, de possibilité de miniaturisation et d'automatisation, et les QCM associés à des polymères à empreintes moléculaires sont des systèmes qui sont utilisés pour mesurer la fixation spécifique d'un analyte avec un degré élevé de sensibilité (*Haupt et al*. 1999 [50]; *Feng et al*. 2007 [51], *Guerra et al*. 2009 [52], *Diltermiz et al*. 2013 [53]).

Les applications de la technologie de l'empreinte moléculaire dans le domaine des capteurs piézoélectriques s'étendent des petites molécules (biomacromolécules) aux analytes volumineux (les micro-organismes et des cellules).

Nous pouvons citer les travaux de *Dickert et Thierer* [54] qui ont réalisé un capteur QCM, de polyuréthanes réticulés comme empreinte moléculaire avec différents solvants.

Les capteurs piézoélectriques associés aux polymères à empreintes moléculaires représentent de bons candidats pour des applications dans le suivi thérapeutique, et un certain nombre de cibles thérapeutiques ont été étudiées. *Liang et al.* ont réalisé la détection de caféine dans des échantillons de sérum et d'urine [55]. Cette équipe a utilisé une technique similaire pour préparer des capteurs-MIP pour la détermination directe de l'épinéphrine [56] et le pyriméthamine [57].

1.3.2.3.2 Capteurs à ondes de surface ou SAW

Dès le début des années 80, les demandes croissantes notamment dans le domaine des télécommunications ont permis le développement de la technologie à ondes acoustiques de surface (SAW) pour des applications à haute fréquence (100 MHz-2 GHz). Les dispositifs SAW génèrent et détectent des ondes élastiques de surface à l'aide de transducteurs interdigités (IDT) déposés sur la surface d'un cristal piézoélectrique. De cette manière, l'énergie acoustique est confinée à la surface du dispositif. Ainsi, l'onde est potentiellement très sensible à tout changement ayant lieu sur la surface, en particulier toutes variations de paramètres mécaniques, surfaciques ou de viscosité.

Les dispositifs à ondes de surface ou SAW ont été utilisés comme lignes à retard et filtres pendant une longue période avant leur commercialisation comme biocapteur (*Slobodnik et al*. 1972 [58], *Wohltjen et Dessy* 1979 [59]). Les ondes acoustiques de surfaces à cisaillement horizontales : TH, onde de Love, ondes guidée, et les ondes de Lamb) ont longuement été étudiés, mais leur utilisation dans des dispositifs en tant que modes de transductions pour des applications biocapteurs est peu répandue.

Wohltjen et Dessy ont été les premiers à proposer un capteur basé sur des ondes SAW (Rayleigh ou RSAW), recouvert avec une couche sensible à base de polymère pour la détection de gaz biologique [59]. Depuis ces travaux pionniers, de nombreuses approches basées sur des capteurs SAW pour une variété d'applications dans la détection de gaz ont été proposées [60], [61]. Cependant, les premières tentatives pour des applications en milieux liquides ont été plus délicates [62]. En effet, en milieu liquide, le déplacement des particules ayant une composante normal à la surface du capteur, les ondes

de compression sont propagées dans le liquide et induisent des atténuations (pertes d'insertions). Par conséquent, les recherches ont été dans un premier temps, dirigés vers les ondes acoustiques de volume (BAW). Pour s'affranchir de ce problème d'amortissement en milieu liquide, les ondes acoustiques doivent avoir une polarisation horizontale. C'est le cas des d'ondes TH (Transverses Horizontales), guidées (guided Shear-Horizontal SAW) ou ondes de Love. Ces capteurs associent ainsi une grande sensibilité gravimétrique de surface et la capacité de fonctionner en milieu liquide grâce à leur polarisation transverse horizontale.

C'est ce dernier type de capteur qui est utilisé pour nos travaux de thèse. Mis au point lors de travaux précédents [63], il est composé de deux lignes à retard (voir Figure *Fig. 1-6*). Chaque ligne est constituée d'un transducteur d'entrée, convertissant un signal électrique en onde acoustique, et un transducteur de sortie, convertissant l'onde acoustique en signal électrique sinusoïdal. La seconde ligne peut être utilisée comme référence ou comme seconde voie de mesure.

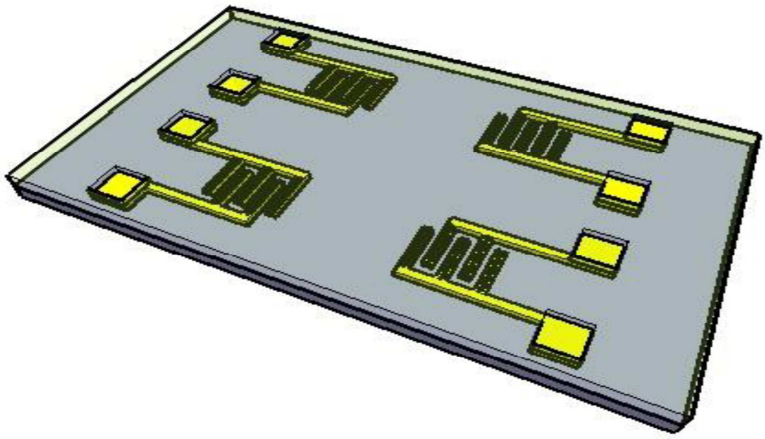


Fig. 1-6: Capteur SAW à ondes de Love constitué de deux lignes à retard

1.4 Technique de l'empreinte moléculaire

1.4.1 Historique

La technique de l'empreinte moléculaire [64] a vu le jour avec les travaux pionniers de *Polyakov* en 1931 [65]. Son équipe a observé le caractère complexant d'un polymère de silice en présence de dérivés benzéniques. En 1949, *Dickey* [66] a repris la méthodologie et réussi à préparer des adsorbants spécifiques pouvant reconnaître de manière sélective la molécule utilisée pour réaliser l'empreinte en s'inspirant des travaux de Pauling sur la

formation des anticorps. Le concept actuel d'empreinte moléculaire a été développé en 1972 par le groupe de *Wulff* [67] qui a réussi à synthétiser des polymères organiques possédant une sélectivité vis-à-vis d'une molécule prédéfinie.

La hausse du nombre de publications (cf. Fig. 1-7) ces vingt dernières années concernant l'utilisation et l'application de la technique d'empreinte moléculaire, témoigne de l'intérêt croissant dont elle fait l'objet dans de nombreux domaines tels que le médical (diagnostique ou thérapie clinique), l'environnement, l'agroalimentaire, le militaire etc.

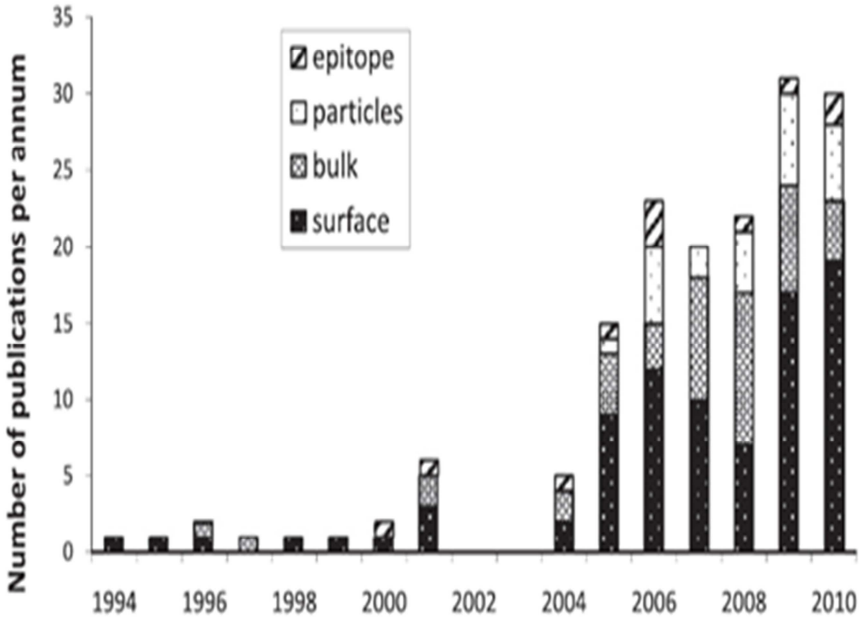


Fig. 1-7: Nombre de publications sur les polymères à empreintes moléculaires de 1994 à 2010 [68]

1.4.2 Principe

Le polymère à empreinte moléculaire représente une forme de biorécepteur de synthèse qui mime le phénomène de reconnaissance existant dans les systèmes biologiques. L'impression moléculaire est un processus où le monomère fonctionnelle et le réticulant sont copolymérisés en présence de la molécule cible communément appelée template, d'un initiateur de réaction et d'un solvant porogène. Une cavité tridimensionnelle spécifique apparaît après élimination de la molécule empreinte. Le MIP obtenu possède une empreinte similaire en taille, en forme, en groupements fonctionnels à celle de la molécule utilisée lors du processus d'impression moléculaire (cf. Fig. 1-8). Il possède alors

la capacité de réaliser une détection spécifique de cette dernière. Un polymère non imprimé (NIP) est préparé comme référence afin d'évaluer la formation de l'empreinte moléculaire.

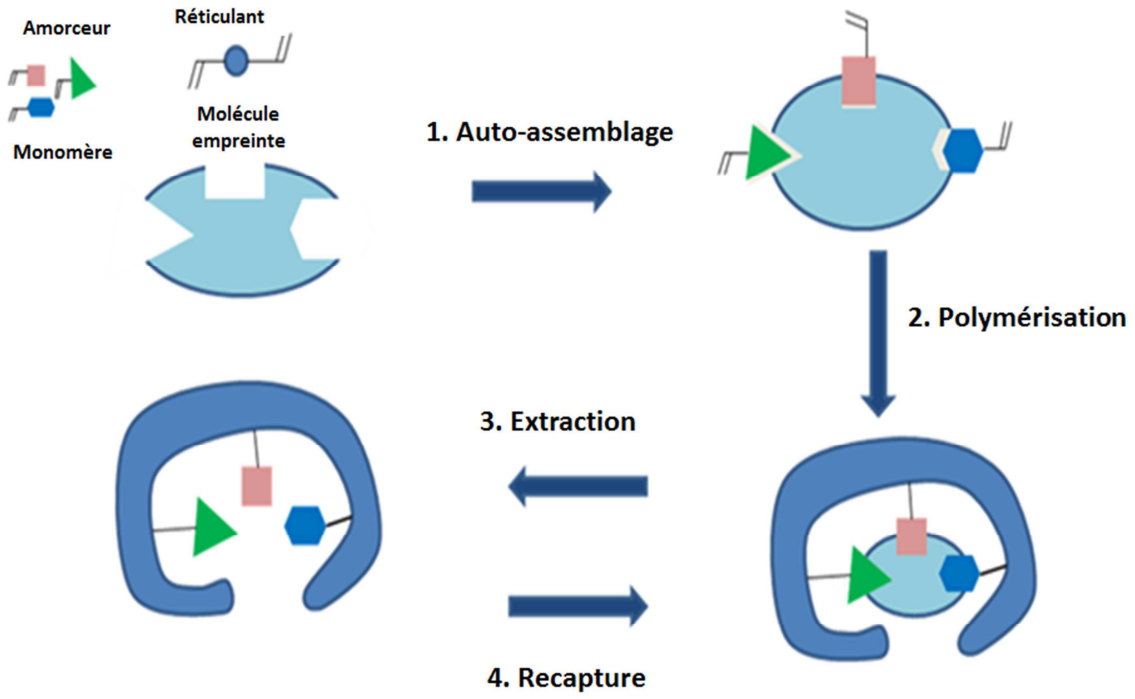


Fig. 1-8: Principe de la technique de l'empreinte moléculaire

1.4.3 Composants

1.4.3.1 La Molécule empreinte

Un polymère à empreinte moléculaire est généralement synthétisé pour une application analytique spécifique qui implique le choix et l'utilisation d'une molécule comme empreinte. La molécule empreinte appelée communément template est l'élément central de la technique de l'impression moléculaire. Elle doit ressembler à la molécule recherchée en termes de taille, forme, orientation spatiale et position de leurs groupements fonctionnels. Le choix de la molécule empreinte s'appuie sur plusieurs critères tels que le coût, la disponibilité et surtout sur la stabilité du complexe de prépolymérisation.

1.4.3.2 Le monomère fonctionnel

La sélection du monomère fonctionnel est d'une importance capitale car le mécanisme général de la formation d'empreintes repose sur les interactions entre le monomère fonctionnel et le template. L'optimisation de la sélectivité et de l'affinité du MIP et donc de l'effet d'empreinte moléculaire dépend fortement de la complémentarité

des caractéristiques fonctionnelles de ces deux éléments. Les monomères présentent une grande variété de fonctions (cf. Fig. 1-9). Ils peuvent êtres basiques, acides ou neutres.

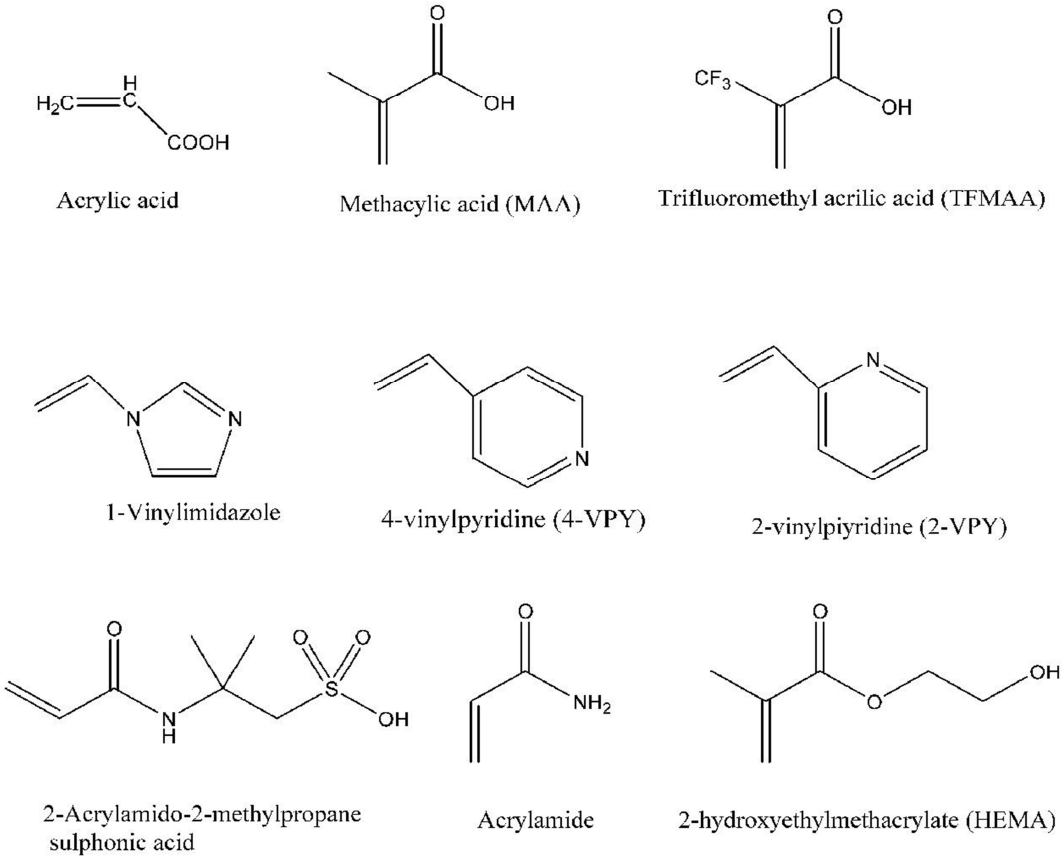
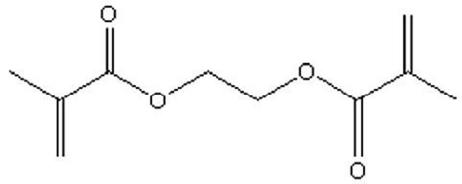


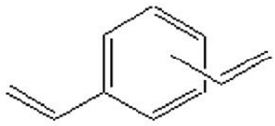
Fig. 1-9: Les monomères fonctionnels les plus couramment utilisés [69]

1.4.3.3 Le réticulant

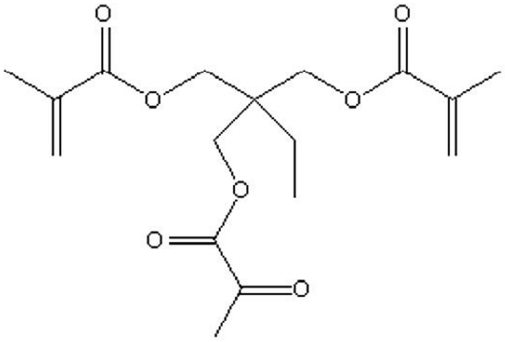
Dans le cadre du processus de synthèse des MIPs, la structure rigide de la matrice polymérique est assurée par l'ajout d'un agent réticulant. Le réticulant est une molécule organique qui enrobe le complexe formé par le couple monomère fonctionnel et molécule empreinte dans un réseau tridimensionnel qui est mécaniquement et thermiquement stable. En effet, après extraction de la molécule empreinte, il permet de conserver la forme et la taille du gabarit formé au cours de l'impression et conditionne la reconnaissance et la sélectivité. En règle générale, on utilise une grande quantité de réticulant (80 à 90 % molaire). Sur la Figure 1-10 sont représentés, les agents réticulant les plus couramment employés.



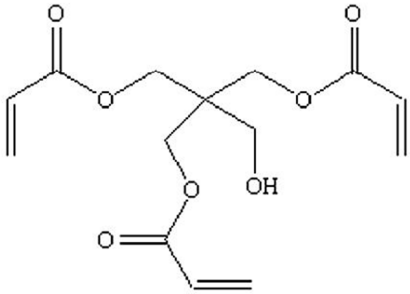
Ethyleneglycoldimethacrylate (EGDMA)



Divinylbenzene (DVB)



Trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM)



Pentaerythritol triacrylate (PETRA)

Fig. 1-10: Agents réticulant [69]

1.4.3.4 Le solvant porogène et la formation de la porosité

Le solvant porogène joue un rôle primordial dans la formation de la structure poreuse du polymère. Son rôle premier du solvant porogène est de solubiliser les différents constituants de la solution de prépolymérisation. Il doit également permettre la création de larges pores afin d'assurer une bonne accessibilité du template jusqu'aux cavités. Dans une approche non covalente, le solvant organique doit être judicieusement choisi afin de réduire les interférences avec le complexe de prépolymérisation. La plupart de ces interactions étant des liaisons hydrogènes ou ioniques, il s'est avéré que les solvants peu polaires et aprotiques donnent de meilleurs résultats. En effet, Sellegreen et Shea [70] ont mis en évidence l'influence de la polarité du solvant sur la sélectivité du polymère.

La nature et la concentration du solvant détermine la morphologie, la structure et la distribution en termes de taille de pores et de surface spécifique, par la réaction de solvatation de la chaîne polymérique dans le milieu réactionnel au cours de la phase initiale de la polymérisation [139]. Avant d'exposer les processus régissant la formation de la

porosité, la morphologie et la structure ainsi que la distribution en taille des pores seront rappelés.

1.4.3.4.1 Morphologie des pores

La morphologie du réseau des polymères à empreintes moléculaires (cf. Fig. 1-11) découle de la formation d'un amalgame de microsphères elles-mêmes issues d'un amalgame de nuclei (10-30 nm de diamètre). La porosité et la surface spécifique résultante du MIP sont formés à partir des vides situés entre les groupements irréguliers des microsphères (macropores : diamètre > 50 nm), ou à partir de l'espace interstitiel d'un groupe donné de microsphères (mésopores : 2 < diamètre < 50 nm), ou encore à l'intérieur des microsphères elles-mêmes (micropores, 2 nm de diamètre). Le caractère poreux du réseau polymérique provient de ces micro /méso/ macropores. Les valeurs typiques de la surface spécifique des matériaux à empreintes moléculaires sont comprises entre 100 à 400 m^2/g.

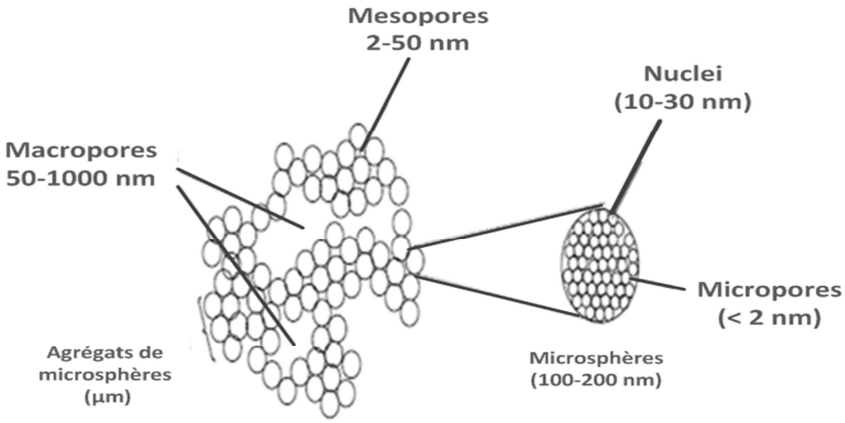


Fig. 1-11: Représentation schématique de la structure macroporeuse d'un polymère à empreinte moléculaire [140]

1.4.3.4.2 Le processus de la séparation de phase

La Figure 1-12 illustre le mécanisme général de la formation de la structure poreuse (surface spécifique, morphologie, taille et volume des pores, distribution poreuse) des matrices macroporeuses [139]. Ce mécanisme est contrôlé par la nature et le volume du solvant porogène. Il est basé sur la cinétique de séparation de phase. Généralement, lorsque le porogène possède un fort pouvoir solvatant [141], la séparation de phase se produit plus tardivement et aboutit à la création d'un réseau polymérique présentant une large

proportion de micropores et de mésopores (voir Fig. 1-12 B). Ces réseaux possèdent des pores de petit diamètre (distance réduite entre les vides) et une forte surface spécifique. Pour les solvants à faible pouvoir solvatant (peu diluant), la phase de séparation a lieu plus rapidement au cours de la polymérisation, et génère ainsi des structures poreuses avec une large proportion de mésopores et de macropores. Cela se traduit par une augmentation du volume des vides (pore plus larges en diamètre), réduisant la surface spécifique du matériau polymérique (voir Fig. 1-12 A).

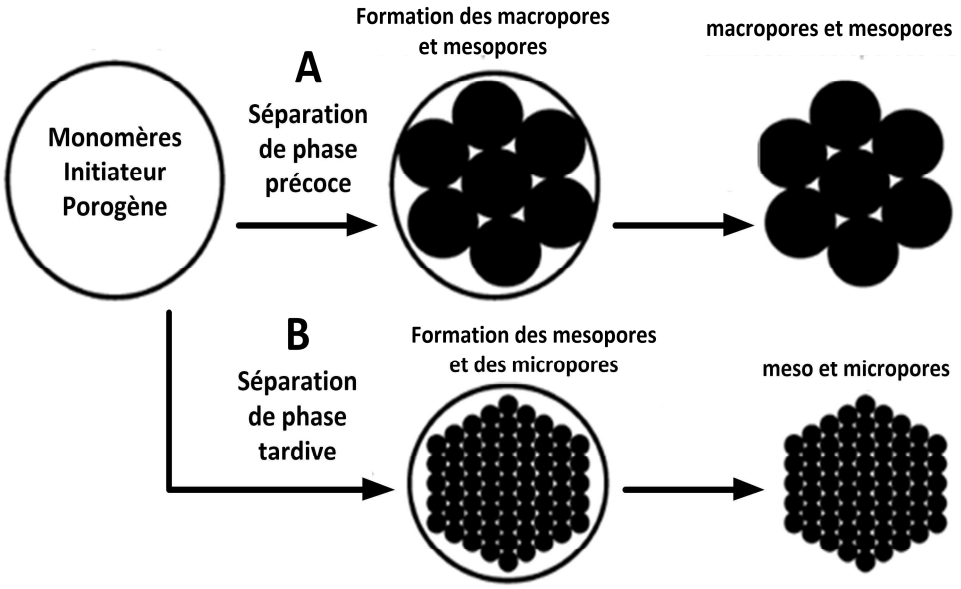


Fig. 1-12: Représentation schématique de la structure macroporeuse d'un MIP selon la nature du porogène, A) porogène à faible pouvoir solvatant, B) porogène à fort pouvoir solvatant. [139]

1.4.3.4.3 Effet du poids moléculaire

Les solvants porogènes ayant un faible poids moléculaire sont le plus surtout utilisés car ils génèrent des pores de petite tailles et ainsi une grande surface spécifique. De plus, ils possèdent une faible viscosité et sont relativement faciles à éliminer, ce qui facilite leurs mélanges avec les monomères [140] [142] [143] [144] [145] [146]. L'inverse est vrai pour les porogènes possédant un poids moléculaire élevé [140] [145]. En effet, la viscosité augmente fortement avec l'augmentation du poids moléculaire du porogène et ainsi affecte la dispersion de gouttelettes lors de la polymérisation, conduisant à la formation de pores plus larges qui donnent un volume de pore plus faible.

1.4.3.5 L'initiateur

L'initiation radicalaire est la méthode d'initiation la plus fréquemment utilisée pour réaliser des empreintes moléculaires. Plusieurs types d'initiateurs sont employés comme amorceurs mais ils doivent faire l'objet d'une sélection judicieuse principalement en fonction de leur solubilité dans le milieu et de leur réactivité par rapport au monomère fonctionnel.

L'AIBN (2,2'-azobisisobutyronitrile) et l'ABVD (2,2'-azobis-2,4 dimethylvaleronitrile) sont le plus couramment utilisés. Pour les réactions en milieu aqueux, les persulfates (S_2O^{8-}) d'ammonium ou de potassium sont utilisés du fait de leur solubilité dans l'eau. La polymérisation radicalaire se fait par voie thermique ou par rayonnement UV. Les interactions de nature non covalente nécessitant une polymérisation à basse température, dans ce cas précis on privilégie, la photoinitiation. La voie thermique pour des modèles peu solubles, ou peu sensibles à la lumière.

1.4.4 Voies de synthèse

1.4.4.1 L'approche covalente

La synthèse par voie covalente (cf. Fig. 1-13) introduite en premier par *Wulff* [71], consiste à lier la molécule empreinte via des liaisons covalentes au monomère fonctionnel. Apres polymérisation, les liaisons covalentes sont rompues par réaction de clivage ou par hydrolyse. Les cavités résultantes sont capables de recapturer par l'intermédiaire de liaisons covalentes la molécule empreinte ou un analogue possédant les mêmes groupements fonctionnels. Dans ce type d'approche, il n'est pas nécessaire d'utiliser un excès de monomères car les fonctions actives sont réparties à l'intérieur des cavités et non aléatoirement dans le polymère. De plus l'influence de la température et de la polarité du solvant porogène est moindre. Néanmoins, seul un nombre limité de composés peut être utilisé comme molécule cible (alcools, amines, acides carboxyliques, aldéhydes). La lenteur de la recapture représente un problème pour certaines applications.

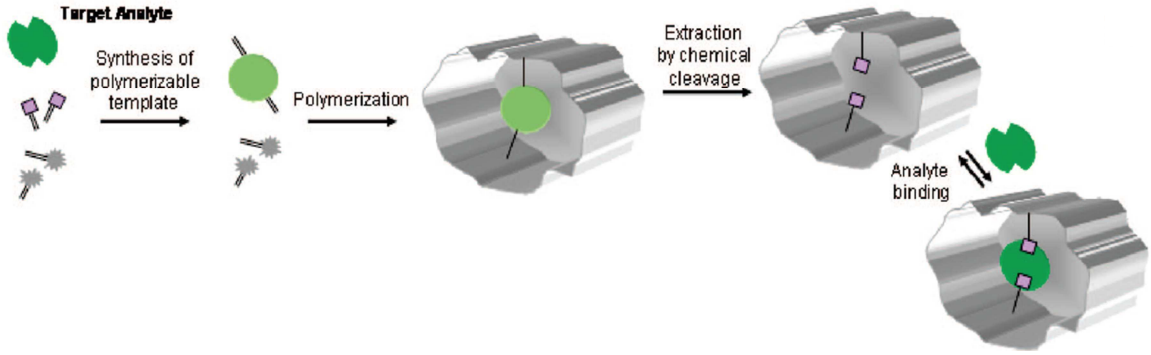


Fig. 1-13: Exemple de préparation de polymère imprimé basé sur des interactions covalentes. [72]

1.4.4.2 L'approche non covalente

La méthode non covalente (cf. *Fig. 1-14*) a été développée, étudiée et optimisée par l'équipe de Mosbach [73]. Les interactions entre le monomère fonctionnel et la molécule empreinte sont établies via des liaisons non covalentes de type ionique, hydrogène ou Van Der Waals. Grâce à sa simplicité de mise en œuvre et à la grande variété de monomères fonctionnels commerciaux et synthétiques disponibles, c'est la technique la plus courante. Afin de permettre la formation du complexe de prépolymérisation et de favoriser les interactions avec la molécule empreinte, le choix du monomère est primordial. La principale limite de cette stratégie d'impression, concerne la formation d'un grand nombre d'interactions non spécifiques avec la molécule empreinte dues à l'introduction d'un excès de monomère fonctionnel.

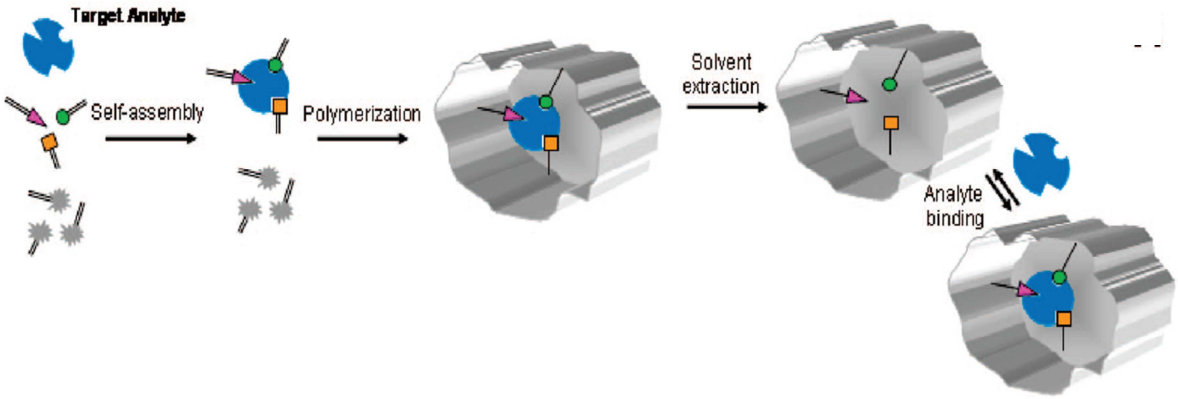


Fig. 1-14: Exemple de polymère imprimé basé sur des interactions non covalentes. [72]

1.4.4.3 L'approche semi-covalente

L'approche semi-covalente est une technique hybride qui combine certains avantages des stratégies covalentes et non covalentes. L'impression la molécule empreinte se fait par l'intermédiaire de liaisons non covalente. Il existe deux variantes de cette technique. La première variante est basée sur l'utilisation d'un intercaleur pour former la liaison entre le monomère et la molécule empreinte. Cette méthode a été relatée par l'équipe de *Whitcomb*. Lors de ces travaux, ils ont réalisé l'estérification du cholestérol par le vinylphénol [74] par une approche semi covalente. L'utilisation de l'espaceur a permis d'éviter l'encombrement stérique lors de l'étape de recapture. La seconde variante consiste à réaliser une liaison directe entre le monomère et la molécule empreinte.

1.4.5 Formats des polymères à empreintes moléculaires

1.4.5.1 Le monolithe (bulk)

Les polymères à empreintes moléculaires sont dans la majorité des cas, synthétisés sous la forme d'un monolithe dur appelé communément 'bulk'. C'est une technique très simple à mettre en œuvre et qui nécessite peu de matériel. A la fin de la réaction de la polymérisation, le monolithe obtenu est broyé et tamisé afin de récupérer les particules de polymères à empreintes moléculaires qui sont irrégulières. Dans ce mode de synthèse, les sites de reconnaissance sont disséminés dans toute la matrice polymérique et de ce fait, certains sites demeurent inaccessibles aux molécules cibles. D'autre part, l'étape de broyage endommage des sites de reconnaissance, ce qui limite l'utilisation dans certaines applications chromatographiques.

1.4.5.2 Les particules

La technique d'impression moléculaire dite sphérique permet l'obtention de particules sphériques de taille contrôlée (micromètre au nanomètre) sans étapes de broyage et de tamisage. Ces particules sont obtenues selon différents mode de préparation tels que la polymérisation par précipitation, en suspension et en émulsion.

Ces microsphères polymériques peuvent être employées dans de nombreuses applications mais surtout sont principalement rencontrées en chromatographie en phase liquide [88].

1.4.5.3 Les films minces

Les MIPs peuvent également être synthétisés sous la forme de films minces intégrés directement à la surface d'un substrat (capteurs, lames de verre, fibres optiques, électrodes, wafers en silicium, etc.). Un aspect important dans la conception de ces couches minces de MIPs est que les sites de reconnaissances sont localisés près de la surface du polymère, ce qui leur procure un atout majeur pour certaines applications plus spécifiques tels les capteurs. Nous décrivons ici brièvement les différentes méthodes employées afin d'obtenir un film mince ou une membrane.

1.4.5.3.1 Inclusion dans une matrice PVC

Le polymère à empreinte moléculaire est préparé sous forme d'un monolithe dur. Apres les étapes de broyage et de tamisage, les particules de MIP sont incluses dans une matrice de polychlorure de vinyle pour préparer un film. Ce mode de polymérisation a été largement utilisé pour l'élaboration de colonnes de chromatographie [75].

1.4.5.3.2 Méthode sandwich

Cette technique [76] [77] [78] consiste à déposer dans un premier temps, quelques gouttes de solution prépolymérisée sur le substrat. Une lamelle en verre ou une plaque en quartz est ensuite positionnée au-dessus de cette solution pendant l'irradiation aux ultraviolets, afin de répandre la solution sur la surface et de réaliser une polymérisation sous atmosphère privée d'oxygène pour obtenir une couche uniforme de polymère.

L'épaisseur des films obtenus est liée à la pression exercée sur le dispositif à enlever, avec une valeur typique de l'ordre de quelques microns. Le descriptif de cette technique sera abordé dans le chapitre suivant.

1.4.5.3.3 Dépôt par enduction par force centrifuge (spin-coating)

Le dépôt par force centrifuge [79], [80], de solution diluée est une méthode très courante pour la réalisation de films minces uniformes de polymère sur un substrat donné. Quelques gouttes de la solution de polymère sont d'abord déposées sur une plaque, qui est ensuite mise en rotation. La solution se dépose radialement et l'excédent est éjecté hors du substrat. Le film est obtenu après évaporation du solvant. L'épaisseur du film est régulée par la concentration, la viscosité et la vitesse de rotation. Toutefois, la principale limite de cette technique étant la faible adhérence du film à la surface, il est nécessaire d'utiliser des promoteurs d'adhérence pour fonctionnaliser la surface. On peut citer par exemple les

alcane-thiols qui sont connus pour former une monocouche très stable en surface de l’or ou encore les silanes [81].

1.4.5.3.4 Monocouche auto-assemblée (SAM)

Les monocouches auto-assemblées (SAMs) possèdent l’atout indéniable de pouvoir modifier une grande variété de surfaces, comprenant les surfaces métalliques, grâce aux outils de la chimie organique et organométallique. La fonctionnalisation des surfaces notamment or, par les SAMs est une technique assez commune pour réaliser le couplage de biorécepteurs à la surface des biocapteurs avec les sensibilités et spécificités essentielles à une reconnaissance biologique performante. La modification de la surface repose sur des molécules alcane-thiol, et permet le contrôle de la densité et de la distribution des biorécepteurs sur la surface. Les liaisons mises en jeu étant des liaisons de coordination, un certain nombre de précautions sont à prendre pour assurer leur stabilité et empêcher le décrochage des monocouches. De plus, ces monocouches sont très sensibles à la température et aux ultraviolets ce qui rend irréalisables les polymérisations radicalaires [82],[83],[84].

1.4.5.3.5 Silanisation des surfaces

D'autres systèmes sont décrits dans la littérature pour associer un polymère organique à une surface inorganique. C’est le cas de la technique de silanisation qui consiste à accrocher des molécules fonctionnelles notamment des alcoxysilanes via des liaisons covalentes à des surfaces solides comme le verre, les wafers de silicium oxydés en surface ou le quartz. Ces agents de couplage doivent avoir une réactivité à la fois vis-à-vis des surfaces inorganiques et des molécules bioréceptrices déposées. Les molécules trifonctionnelles présentent l'avantage, par rapport aux monofonctionnelles, de se condenser entre elles par formation de ponts Si-O-Si. Les alcoxysilanes sont convertis en une couche stable de polysiloxane par couplage du groupe hydroxyle sur la surface. Un inconvénient majeur de ce système est l'existence de réactions parasites d'agrégation et de polymérisation verticales, qui peuvent conduire à un recouvrement non plan de la surface.

1.4.5.3.6 Electropolymérisation

L’électrodéposition [85], [86] est un procédé électrochimique qui permet d’obtenir des films minces homogènes de polymères sur un substrat qui constitue l’électrode de travail, à partir d’une solution électrolyte contenant le monomère. Ce type de polymérisation s’appuie sur l’utilisation de monomères électro-actifs, essentiellement de

type phénol. Les monomères sont liés via des liaisons covalentes à la surface par l'intermédiaire d'un carbone aliphatique dont le choix est vaste (toute surface conductrice ou semi-conductrice pouvant servir d'électrodes). C'est une technique fréquemment employée pour l'élaboration de capteurs potentiométriques et capacitifs qui nécessitent des films très minces. L'épaisseur du film formé est contrôlée par la quantité de charges transférées durant l'électropolymérisation [87]. Différents types de monomères peuvent être utilisés, l'acrylamide est le plus courant. Les contraintes majeures liées à cette technique sont le fait qu'elle requiert l'utilisation d'un substrat conducteur et qu'elle est compatible avec une faible variété de groupements fonctionnels. En outre, la rapidité de la cinétique de l'électropolymérisation rend difficile le contrôle de l'épaisseur de la couche mince.

1.4.6 Applications des polymères à empreintes moléculaires

Dans notre cas, nous aurons à nous intéresser plus spécifiquement aux techniques de réalisation de films minces, à partir de protocoles et solutions issues de synthèse en bulk maitrisée par nos partenaires de l'ICOA.

Les propriétés spécifiques des MIPs en ont fait un outil très intéressant pour un grand nombre d'applications, notamment les techniques de séparation et de purification, l'application aux biocapteurs, l'utilisation comme catalyseurs et enzymes artificielles [69].

Nous décrirons brièvement ces principales applications, dans la mesure où les processus mis en jeu peuvent être d'intérêt pour la réalisation et la compréhension des biocapteurs.

1.4.6.1 Séparation

Les polymères à empreintes moléculaires peuvent être utilisés par exemple pour la séparation de molécules d'une solution complexe par extraction en phase solide, ou encore pour la séparation d'énantiomères, en tant que phase stationnaire en chromatographie liquide haute performance (HPLC).

La chromatographie, et plus particulièrement la chromatographie en phase liquide, est l'une des applications les plus courantes employant les polymères à empreintes moléculaires. Cependant, seuls les MIPs synthétisés sous la forme de particules sphériques permettent d'obtenir de bonnes performances chromatographiques.

C'est une technique d'analyse qui est aussi utilisée pour l'évaluation des propriétés de reconnaissance du MIP. Pour cela on compare le facteur de rétention (k) d'une colonne

de MIP à celui d'une colonne de référence remplie avec du polymère non imprimé (NIP). Le facteur d'impression noté *I* est exprimé comme le rapport des facteurs de rétention du MIP et du NIP.

$$I = K_{MIP} / K_{NIP} \qquad (1\text{-}3)$$

Ce facteur d'impression met en évidence la présence de sites spécifiques de reconnaissance dans le MIP. Et c'est grâce notamment à ces sites spécifiques que le MIP recomplexe plus fortement l'analyte que le matériau non imprimé [88].

Les polymères à empreintes moléculaires ont souvent été utilisés comme phases stationnaires chirales (MIP-CSP) pour la résolution des solutions énantiomères racémiques de différents composés [89], tels que les dérivés d'acides aminés[90] [91] [92] et la détection de drogue[93],[94],[95].

L'extraction en phase solide (SPE) emploie également des MIPs [96], [97]. C'est une technique qui a pour but d'extraire certaines molécules présentes dans une solution complexe. L'utilisation des MIPs pour la réalisation de phase stationnaire de type SPE (MISPE) est très répandue. Cette méthode réduit considérablement le temps de prétraitement des échantillons. Le principe du MISPE est basé sur les mêmes principales étapes que la technique classique de SPE (cf. Fig. 1-15).

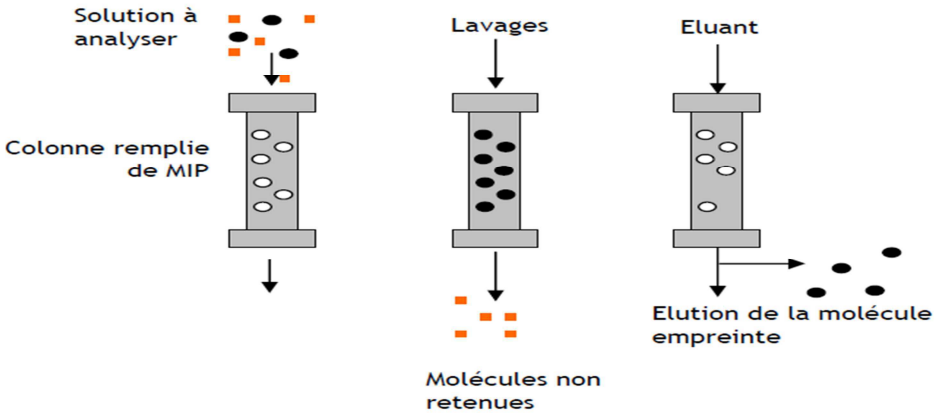


Fig. 1-15: Etapes du processus de SPE classique

Au cours de l'étape de remplissage, l'échantillon est percolé à travers les molécules de MIP. En règle générale, le solvant utilisé doit posséder une polarité similaire à celle utilisée lors du processus de polymérisation [98]. Cette méthode a été appliquée pour réaliser l'extraction de composés dans différentes matrices d'échantillons tels que des échantillons biologiques [99],[100],[101], environnementaux [102],[103],[104], dans

l’industrie agroalimentaire [105],[106]. La première application du MISPE a été décrite par l’équipe de Sellergren en 1994 [107]. Lors de cette étude, ils ont réalisé l’extraction sélective de la pentamidine, médicament utilisé pour le traitement du virus du SIDA, dans des échantillons d'urine. Les MIPs à base de pentamidine ont été préparés par une polymérisation *in situ* dans une colonne chromatographique couplée à un système HPLC.

1.4.6.2 Catalyse

Des efforts considérables ont été entrepris pour développer l'utilisation des MIPs à des applications catalytiques [108], [109]. Ces matériaux polymériques présentent de nombreux avantages comparés aux biomolécules. En effet, leur sélectivité élevée et leur forte stabilité mécanique et thermique les rend aptes à être utilisés dans des conditions réactionnelles extrêmes (haute température, milieu acide ou basique). Pour ces raisons, ils représentent une alternative intéressante aux systèmes biologiques (enzymes, systèmes anticorps-antigènes) [110]. Ils sont capables d'imiter la sélectivité et la stéréospécificité des liaisons d'anticorps et des enzymes qui sont usuellement employés comme catalyseurs dans la plupart des réactions.

Catalytiquement activés, ces matériaux imprimés peuvent être synthétisés en utilisant des analogues de substrats ou des états de transition lors du processus d’impression moléculaire [111]. La stratégie de synthèse s’inspire des structures des sites actifs des biomolécules tels que les enzymes (cf. *Fig. 1-16*).

Leonhardt et Mosbach ont appliqué cette stratégie en 1987 [112] afin d’obtenir des matériaux à empreintes moléculaires avec une activité estérolytique utilisant des groupes imidazole coordonnés à des ions cobalt au cours de la polymérisation.

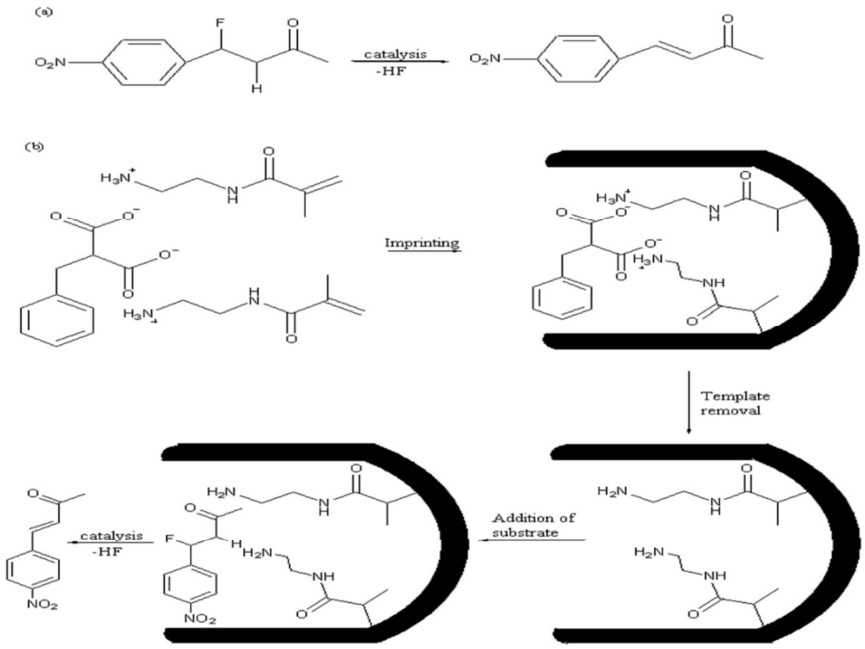


Fig. 1-16: Mécanisme de catalyse de la défluoration d'une cétone ß-fluoré [103]

Très récemment, *Li et al.* ont préparé des systèmes thermosensibles à l'aide d'empreintes moléculaires ayant une activité catalytique pour réaliser une hydrolyse catalytique du 4-nitrophényl acétate [45]. A basse température (20°C), le polymère ne montrait aucune réaction de catalyse significative alors qu'à des températures plus élevées (40°C), ils ont observé une importante activité catalytique.

1.4.6.3 Capteurs

Ces dernières années, les capteurs chimiques et les biocapteurs ont connu un intérêt croissant dans le domaine de la chimie analytique, pour des applications telles que les diagnostiques cliniques, l'analyse de l'environnement ou encore l'agroalimentaire. De nombreux efforts ont été réalisés pour synthétiser des récepteurs artificiels capables de se lier à une molécule cible avec une affinité et une sélectivité comparable à celles des systèmes naturels. La technologie des MIPs, peut être également substituée à celles des anticorps, dans bon nombre d'applications en raison de leur bonne stabilité et de leur inertie chimique [113]. À ce jour les MIPs ont été couplés avec succès avec différents types de capteurs [114]. L'intégration de MIPS aux capteurs peut être réalisée par une polymérisation *in situ* [115], en utilisant un initiateur photochimique ou thermique [116], ou par greffage de surface [117] avec des produits chimiques. L'électropolymérisation

permet de synthétiser des polymères à empreintes moléculaires sous forme de films minces directement couplés à la surface du substrat [118].

1.4.7 Tableau récapitulatif des types de transducteurs utilisant des MIPs

Le tableau suivant synthétise les principaux types de biocapteurs dont la couche sensible est un polymère à empreinte moléculaire, qui constituent notre objectif principal. Ils sont classés par type de transduction, en mentionnant des références représentatives d'études associées.

Les principaux éléments relatifs à la méthode de synthèse retenue sont également reportés ainsi que les résultats obtenus en termes de sensibilité ou de seuil de détection.

Tab. 1-1 : Tableau récapitulatif des types de transducteurs utilisant des MIPs

Transducteurs		**Constituants :** Monomère / **molécule empreinte**/réticulant/initiateur/solvant	**Méthode de synthèse**	**Seuil / plage de détection**	**Applications**	**REF**
Electrochimiques	Ampérométrique	EDOT/**Morphine**	- Electropolymérisation	Sensibilité : 171,5 µA / cm^2mM		[119]
		MAA /**Bilirubin** / EGDMA/ Benzophenone	- Fonctionnalisation: ally-mercaptan - Photopolymérisation	Sensibilité : 0,644µA/mg/dl	Application Médical	[120]
	Potentiométrique	MAA / **Atrazine** / EGDMA/AIBN/ Toluène	- Synthèse en bulk - Inclusion dans une matrice PVC	Limite de détection : 5×10^{-7}M ou 0,1 ppm	Santé et environnement	[121]
	Conductimétrique	MAA / **Atrazine** / TEDMA / AIBN/ DMF	- Synthèse en bulk - Photopolymérisation	Limite de détection : 5 nM	Détection d'herbicide	[122]
Optiques	Fluorescence	Allylamine, Acide vinylphenylboronique /**Acide sialique** / EGDMA		0,5 -10 µM		[123]
	Chimiluminescence	MAA-AA / Lysozyme		Limite de détection : 5 $ng.ml^{-1}$	Médical	[42]
	SPR	MAA / T**heophylline–Caffeine-Xanthin**e / EGDMA / Chloroform	- Film mince - Photopolymérisation	Limite de détection : 0.4 mg.mL-1		[124]
		N-(N-propyl)acrylamide, MAA / **Theophylline /** N,N'-methylenebisacrylamide / Acetonitrile	- Film mince - Photopolymérisation	Limite de détection : 10^{-6} M		[125]
Piézoélectriques	QCM	AA/**L-Tryptophan** / TRIM / Acetonitrile	- Fonctionalisation: acide thioctique GMA et ester dodécane - Film mince - Photopolymérisation	Limite de détection : 8.8 µM.		[50]
		MAA / I**ons Cu(II) /** TRIM / ACN / AIBN	- Fonctionnalisation : 3M NAOH - Film Mince	Limite de détection : 8.10^{-4} µM.	Détection de métaux lourds	[126]
		Styrene / B**enzene, Toluene, Xylene** / DVB / Diphenyle / AIBN	- Spin-coating - Polymérisation à 40°C	Limite de détection : 1ppm	Détection de contaminants dans l'eau	[77]
	SAW	O-phenylnediamine / A**cide sarin** / EGDMA	- Electropolymerisation - Film mince - UV irradiation	1-100 mg / m^3	Militaire	[127]
	Love wave	MAA/**2methoxy 3 methyl pyramizine**/TRIM/Toluene/AIBN	- *Spray-coating* - Photopolymérisation			[128]

1.5 Conclusion

Dans ce chapitre bibliographique nous avons présenté le biocapteur comme un assemblage entre des composants organiques biorécepteurs (sondes ou éléments de reconnaissance biologique) et un composant électronique assurant la transduction. Après avoir décrit les constituants d'un biocapteur, nous avons présenté les moyens et les techniques utilisés dans la littérature pour leur combinaison.

Afin d'obtenir des biocapteurs de plus en plus sensibles, une nouvelle catégorie de biorécepteurs, dits de synthèse, s'est largement développée ces dernières années. Les polymères à empreintes moléculaires constituent les plus récents et sans doute parmi les plus intéressants. La bonne performance des analyses les employant est essentiellement liée à leur spécificité ainsi qu'à leur robustesse. En effet, la technologie d'impression moléculaire est considérée comme un outil puissant dans le développement de méthodes d'analyse sélective. L'affinité et la reconnaissance d'analytes des MIPs sont comparées au système anticorps-antigène. De plus, sa robustesse inhérente, sa simplicité de mise en œuvre et son faible coût, en font une alternative potentiellement utile et intéressante pour la détection de petites molécules à des concentrations très faibles (femtomolaires) avec une sélectivité comparable à celles des biorécepteurs naturels.

De même que pour les biorécepteurs, les transducteurs sont classifiés selon différentes catégories. Ils sont généralement désignés selon la nature de la méthode de transduction qu'ils exploitent pour détecter la présence de l'analyte. Malgré l'importance historique des transducteurs électrochimiques, les premiers utilisés en biodétection, les transducteurs piézoélectriques occupent aujourd'hui une place importante parmi les principaux types d'ondes mécaniques susceptibles d'être exploitées. Parmi les biocapteurs piézoélectriques, nous avons choisi les ondes de Love comme étant les plus adaptées, qui seront ainsi associées à un polymère à empreintes moléculaires.

2 Elaboration des couches minces de polymères non imprimés

2.1 Introduction

Comme nous l'avons vu au chapitre 1, les polymères à empreintes moléculaires sont le plus souvent préparés sous forme de blocs de polymère appelés monolithes, qui sont ensuite broyés et tamisés pour obtenir des particules de taille micrométrique. Cette étape de broyage présente de nombreux inconvénients tels que la production de particules irrégulières ne pouvant être utilisées dans certaines applications et surtout la perte de quantité importante de la matière polymérique qui engendre une perte des sites de liaisons. Par ailleurs, les MIPs peuvent également être synthétisés sous forme de films minces liés à la surface d'un substrat en déposant la solution de prépolymérisation, contenant les différents constituants (monomères, agent de réticulation, molécule empreinte et amorceur), directement sur la surface, suivi d'une polymérisation *in situ*. Les modes de dépôts les plus courants sont le dépôt à la tournette (spin-coating), la pulvérisation (spray coating), le dépôt par capillarité (dip-coating) et la méthode sandwich (Cf. Chapitre 1). Le dépôt de MIP sous forme de couches minces uniformes permet un accès rapide de la molécule empreinte aux sites de reconnaissance, ce qui représente un avantage majeur dans les détections pour des applications capteurs.

Ce chapitre est consacré aux travaux de mise au point concernant les études réalisées afin d'obtenir un moyen approprié de déposer localement sur la surface du transducteur des couches minces de matériau non imprimé (NIP) sur des substrats de tests. Les matériaux utilisés pour préparer les couches minces de NIP, et plus tard de MIP, sont développés au sein du laboratoire ICOA (Institut de Chimie Organique et Analytique – CNRS - UMR 6005) de l'Université d'Orléans.

Nous décrirons dans un premier temps, le choix et la préparation des substrats de test et les éléments relatifs à la préparation des solutions prépolymérisées et à la polymérisation. Nous considérerons ensuite les conditions expérimentales d'élaboration en couches minces de NIP selon différentes méthodes de dépôt. Le but principal est de déterminer les gammes d'épaisseurs susceptibles d'être compatibles avec la propagation de l'onde acoustique (pertes limitées) tout en autorisant une porosité acceptable. De l'expérience acquise au sein de

l'équipe, des épaisseurs de quelques micromètres au plus, avec la possibilité de réaliser des films d'épaisseur inférieure au micromètre et reproductibles, sont recherchées. Les films obtenus sont caractérisés essentiellement par profilométrie optique et mécanique.

2.2 Préparation du substrat de test

2.2.1 Choix du substrat

Le dépôt de matériaux à empreintes moléculaires sous la forme de couche mince nécessite la mise au point et la validation d'un protocole de dépôt. Pour cela notre choix de support de test s'est porté sur des substrats de type silice, appréciés pour les nombreux avantages qu'ils présentent (faible rugosité, faible coût, matériel durable et grande possibilité de fonctionnalisation). De plus ces substrats ont l'avantage d'avoir une chimie de surface proche de celle de nos capteurs eux-mêmes équipés d'une couche guidante de SiO_2 sur le substrat piézoélectrique de quartz. Les caractéristiques des lames de verres utilisées lors de cette étape de mise au point des dépôts de film mince de polymère sont les suivantes : 76mm x 26mm, ép. 1,1mm, bords rodés 90° (Fisher Scientific).

2.2.2 Fonctionnalisation de surface

Un aspect essentiel dans la réalisation d'un capteur intégré est l'immobilisation d'une couche sensible de détection homogène sur la surface du transducteur. Le processus d'accroche du polymère comporte une première étape ayant pour objectif la modification chimique des groupements silanols de la surface du dispositif. De nombreuses références bibliographiques soulignent l'importance de cette étape dans l'obtention d'une couche sensible de MIP [129]. En effet, l'absence de procédure de prétraitement entraîne une mauvaise immobilisation, limitant le couplage avec l'onde et induisant alors une diminution de la sensibilité du capteur. L'adhésion est favorisée par une fonctionnalisation chimique de surface qui consiste à immobiliser une couche de molécules fonctionnelles qui est réactive à la fois vis-à-vis de la surface du substrat et du matériau de reconnaissance. Le choix du procédé dépend du substrat utilisé et des polymères à déposer.

2.2.2.1 Activation de surface

Une première étape de traitement de surface consiste ainsi en un nettoyage approprié permettant d'assurer une activation de la silice par contrôle de la mouillabilité de la surface et ouverture de silanols (fonctions hydroxyles OH sur substrat Si). De nombreuses méthodes de nettoyage de surface en vue d'une fonctionnalisation, sont rapportées dans la littérature

(plasma O_2 ou N_2, UV-OZONE, milieu fortement acide ou basique, pyrolyse etc.). Dans le cadre de cette étude, la méthode qui a été retenue est un nettoyage par un mélange piranha. Le protocole mis au point est le suivant :

- Mettre 20 mL de H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène à 30%) dans un bécher en téflon.
- Ajouter délicatement en évitant les éclaboussures, 20 mL de H_2SO_4 (Acide sulfurique à 95 %).
- Trempage des substrats dans la solution chaude (environ 110°C) et active pendant 15 min.
- Pré-rinçage + rinçage abondant avec de l'eau DI.
- Séchage au flux d'azote des substrats.

2.2.2.2 Silanisation

La réaction de silanisation a été largement employée et développée pour le greffage de divers groupements sur des substrats. Cette réaction fait intervenir un composé habituellement nommé agent silanisant. Celui-ci comprend un groupement silane trifonctionnel pour une liaison covalente avec les groupements silanols présents à la surface des oxydes (lame de verre, surface SiO_2 du capteur) et un groupement fonctionnel méthacrylate dans notre cas, susceptible de pouvoir participer à la réaction de polymérisation (voir *Fig. 2-1*).

Dans le cadre de ces travaux, un agent de liaison commercial, le 3-(trimethoxysilyl) propyl méthacrylate appelé également γ-méthacryloxypropyltriméthoxysilane (3MPS), a été retenu. Sa formule chimique est représentée sur la Figure 2-1. C'est un silane trifonctionnel, neutre qui ne s'ionise pas en solution. Son extrémité $Si(OCH_3)_3$ (triméthoxysilane) est destinée à réagir avec les groupements OH sur la surface à fonctionnaliser. Le principe de la réaction de silanisation est représenté en Fig. 2-2.

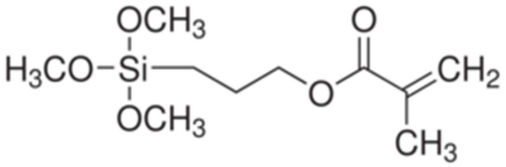


Fig. 2-1: Molécule de 3-(trimethoxysilyl)propylmethacrylate

Le protocole de silanisation comprend les étapes suivantes [130]:

1. Les substrats sont lavés à l'éthanol afin de chasser les traces d'eau. En effet les silanes sont sensibles à la présence d'eau qui, en interagissant avec les molécules de silane pourrait empêcher le greffage sur la surface.
2. Ils sont nettoyés avec le solvant de silanisation (toluène).
3. Silanisation : le substrat est placé dans une solution de silane dilué dans le toluène (2 % en vol en 3MPS) toute une nuit à température ambiante.
4. Les substrats subissent un lavage au toluène, à l'éthanol puis ils sont séchés sous flux d'azote.
5. Pour finir, ils subissent une étape de réticulation à l'étuve pendant 30 min à 200 °C pour stabiliser la couche organique.

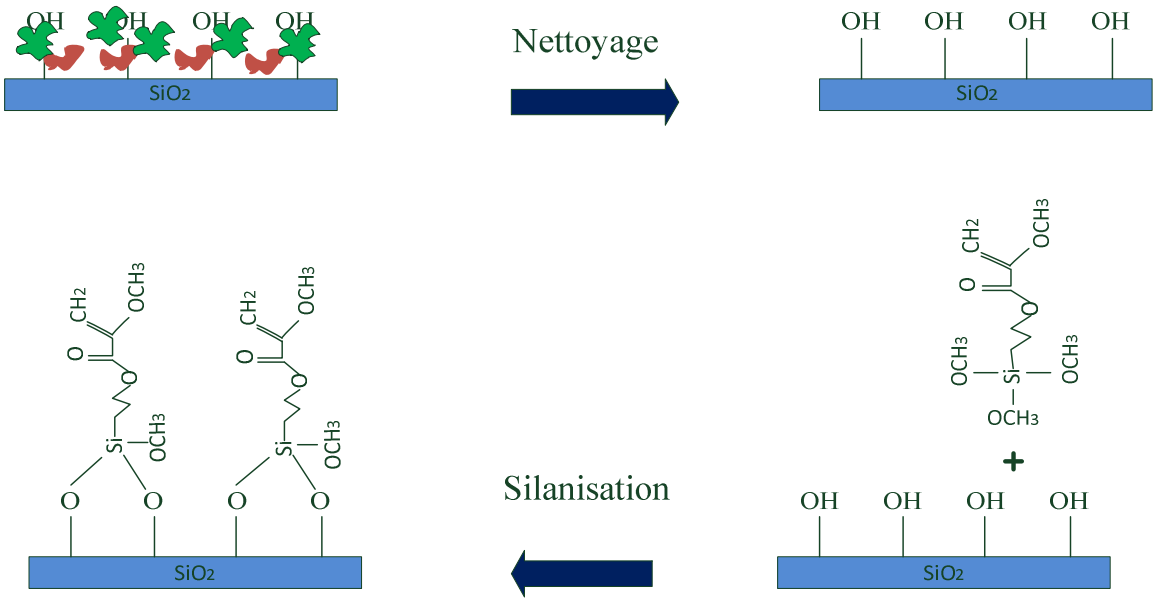


Fig. 2-2: Schéma représentatif de la réaction de fonctionnalisation

2.3 Eléments relatifs au polymère

2.3.1 Principe de la polymérisation radicalaire

La grande majorité des polymères à empreintes moléculaires sont synthétisés par une réaction de polymérisation radicalaire [131]. C'est une réaction de polymérisation en chaîne qui est caractérisée par trois étapes distinctes appelées initiation, propagation et terminaison. L'étape d'initiation comprend deux réactions consécutives. La première réaction consiste à générer des radicaux libres dans le mélange réactionnel à partir de l'initiateur radicalaire

introduit. Afin de former le début de la chaîne du polymère en croissance, le radical est ajouté à la première unité de monomère au cours de la seconde réaction (Cf. équation 2-1). L'étape d''initiation conduit à la formation de monomères activés. C'est une étape étant donnée sa lenteur, qui requiert une énergie d'activation importante.

$$Initiation : R\bullet + M \xrightarrow{K_i} RM\bullet \qquad (2\text{-}1)$$

Une fois que les chaînes de monomères sont formées, l'étape de propagation a lieu. Au cours de cette étape le réseau polymérique se développe par additions successives d'unités de monomères sur le centre actif, ce qui conduit à la croissance de ces chaînes. Cette étape est rapide et n'exige qu'une faible énergie (Cf. équation 2-2).

$$Propagation : RM_n\bullet + M \xrightarrow{k_p} RM_{n+1}$$

(2-2)

Enfin, lorsque la croissance des macromolécules (chaînes) cesse, la phase de terminaison est atteinte. Généralement, l'interaction entre deux extrémités de chaîne en croissance met un terme à la formation du polymère soit par dismutation (Cf. équation 2-3), soit par recombinaison (Cf. équation 2-4).

$$Dismutation : RM_n\bullet + RM_m\bullet \xrightarrow{k_t} RM_nH + RM_m \qquad (2\text{-}3)$$

$$\mathrm{Re}combinaison : RM_n\bullet + RM_m\bullet \xrightarrow{k_t} RM_{n+m}R \qquad (2\text{-}4)$$

2.3.2 L'enceinte de polymérisation

Lors de ces travaux, la réaction de polymérisation est initiée par photopolymérisation sous irradiation UV qui permettra de transformer le film liquide qui sera déposé en un polymère tridimensionnel. Ce type d'initiation, présente de nombreux avantages tels qu'une production de radicaux uniquement sur les zones exposées au rayonnement lumineux ainsi qu'un contrôle temporel de la réaction (début et arrêt simple, en déclenchant et en arrêtant la source lumineuse). D'autre part, le contrôle de la vitesse d'amorçage peut être réalisé par le choix combiné de l'intensité lumineuse et de la température.

Cette réaction de photopolymérisation a lieu sous atmosphère inerte car la présence d'oxygène dans le milieu réactionnel empêche la polymérisation d'avoir lieu. En effet l'oxygène moléculaire réagit fortement avec les radicaux libres produits par le photo-amorceur [132] pour engendrer des péroxydiques (RO2•) et des hydro-peroxydes (RO2H), qui ne participent pas à la polymérisation. Ces réactions secondaires aboutissent à une surface peu ou pas réticulée. D'où la nécessité de supprimer l'oxygène du milieu réactionnel en faisant circulant un gaz inerte tel que l'azote (Cf. Fig. 2-3).

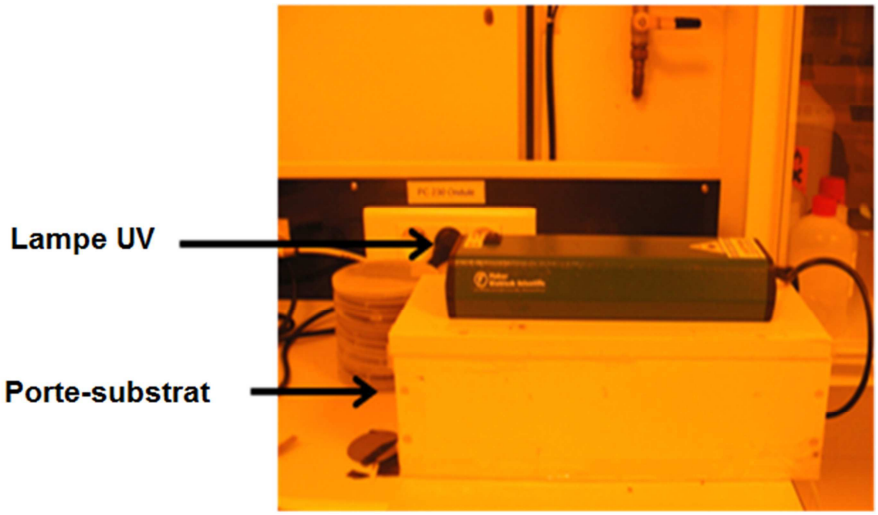


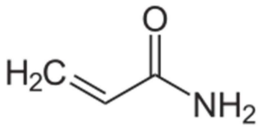
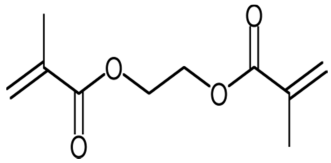
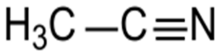
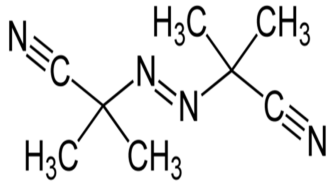
Fig. 2-3: Enceinte de polymérisation sous atmosphère inerte

2.3.3 Solution de prépolymérisation

Des solutions de polymères non imprimés (NIP) ont été préparées en premier lieu, afin de mettre au point un protocole de dépôt en film mince reproductible. Il s'agit de polymères synthétisés dans les mêmes conditions que les MIPs mais en l'absence de molécule cible. Le but final de ces travaux étant d'imprimer des nucléosides, l'acrylamide (AA) a été retenu grâce notamment à sa forte réactivité vis-à-vis des riboses et des nucléobases via des liaisons hydrogènes. L'azobisisobutyronitrile (AIBN) constitue l'initiateur, il a été utilisé en quantité molaire égale à 1% mol de la somme des quantités molaires de réticulant, de monomère fonctionnel. L'acétonitrile (ACN) a été sélectionné comme solvant porogène car c'est un solvant classique qui solubilise un grand nombre de molécules. L'éthylène glycol dimethacrylate EGDMA couramment utilisé dans nombre de travaux, a été sélectionné comme réticulant.

Le tableau 2-1 reprend les différents éléments utilisés pour la synthèse du NIP-ACN.

Tab. 2-1 : Détails des éléments de synthèse du NIP-ACN

Eléments de synthèse du NIP-ACN	Formules chimiques	Rôle
Monomère : Acrylamide (AA)		- Capacité à créer des liaisons hydrogènes.
Réticulant : Ethylène glycol dimethacrylate (EGDMA)		- Responsable de la réticulation chimique après photopolymérisation. - Obtention de polymère ayant de bonnes propriétés thermiques et mécaniques.
Solvant porogène : Acétonitrile (ACN)		- Responsable de la porosité du matériau et n'interfère pas avec le complexe de prépolymérisation (CPP). - Solubilise les différents constituants.
Initiateur : Azobisisobutyronitrile (AIBN)		- Responsable de l'initiation de la réaction de polymérisation

Les différents composants (monomère, réticulant, solvant porogène) dont les proportions sont données dans le tableau qui suit (Tab. 2-2) sont introduits dans un tube à essai. L'ensemble est ensuite dégazé avec du diazote pour chasser le dioxygène (O_2), susceptible d'inhiber la polymérisation. Puis, l'AIBN est ajouté. La solution de prépolymérisation sans l'initiateur (AIBN) peut être stockée au réfrigérateur pendant 1 mois. Une fois l'AIBN ajouté il faut l'utiliser immédiatement.

Tab. 2-2 : Formulation de la composition de la solution prépolymérisée de NIP-ACN

Constituants	Composé	Masse molaire (g/mol)	Densité (g/mL)	Quantité de matière (mmol)	Masse (mg)	Volume (µL)	Equivalence (mol)
Monomère fonctionnel (solide)	AA	71,1	-	0,70	50,0	-	1eq
Réticulant (liquide)	EGDMA	198	1,1135	3,51	696,4	625	5 eq
Solvant porogène (liquide)	ACN	-	-	-	-	2000	-
Initiateur (solide)	AIBN	256,3	-	0,042	10,8	-	1% ($n_{monomère} + n_{réticulant}$)

2.4 Dépôts en couches minces

Nous présentons dans cette partie les résultats expérimentaux des dépôts obtenus selon les trois méthodes de dépôts de NIP qui ont été retenues, parmi les moyens à notre disposition susceptibles de présenter un intérêt à court terme pour notre objectif de démonstrateur : méthode sandwich, dépôt par pulvérisation, dépôt par centrifugation. Ces essais sur lames de verre nous ont permis d'étudier l'influence des paramètres permettant d'obtenir des couches minces homogènes d'épaisseurs nanométriques (entre 200 et 500 nm), jusqu'à quelques micromètres avec un risque de pertes prohibitives ultérieurement sur le capteur.

Quelle que soit la méthode utilisée, le mélange de prépolymérisation est déposé à la surface du substrat et suivi d'une polymérisation radicalaire réalisée sous irradiation UV. Les principaux paramètres à maîtriser pour obtenir des dépôts localisés de polymères à empreintes moléculaire sur la surface du transducteur, sont les suivants :

- Bonne adhérence du film mince sur la surface des capteurs à ondes acoustiques.
- Compatibilité du processus de dépôt avec les dispositifs à ondes acoustiques.
- Compatibilité de la couche mince avec la propagation de l'onde acoustique.
- Reproductibilité du résultat.

2.4.1 La méthode sandwich

2.4.1.1 Principe

Cette technique (cf. Fig. ***2-4***) consiste à déposer quelques gouttes de solution prépolymérisée en sandwich entre deux lames de verre. La seconde lame permet d'étaler la

solution et l'épaisseur du film est typiquement calibrée en fonction de la force d'appui [50]. Elle assure également l'absence localisée d'oxygène pendant la photopolymérisation.

Les inconvénients majeurs de cette technique sont une faible reproductibilité et une gamme d'épaisseurs *a priori* plutôt élevée avec des valeurs supérieures à 1µm, rencontrées dans la littérature. Néanmoins c'est l'une des premières méthodes utilisées pour la production de films minces de MIPs comme biorécepteur pour sa simplicité de mise en œuvre [78], [133].

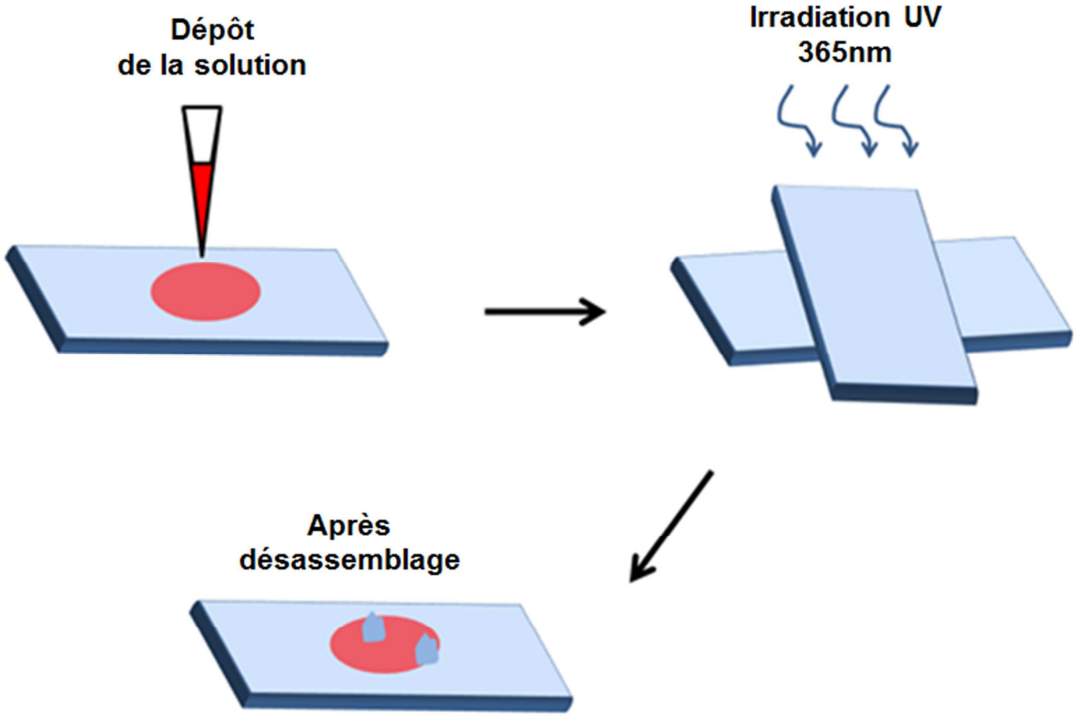


Fig. 2-4: Schémas de la méthode sandwich

2.4.1.2 Protocole de dépôt

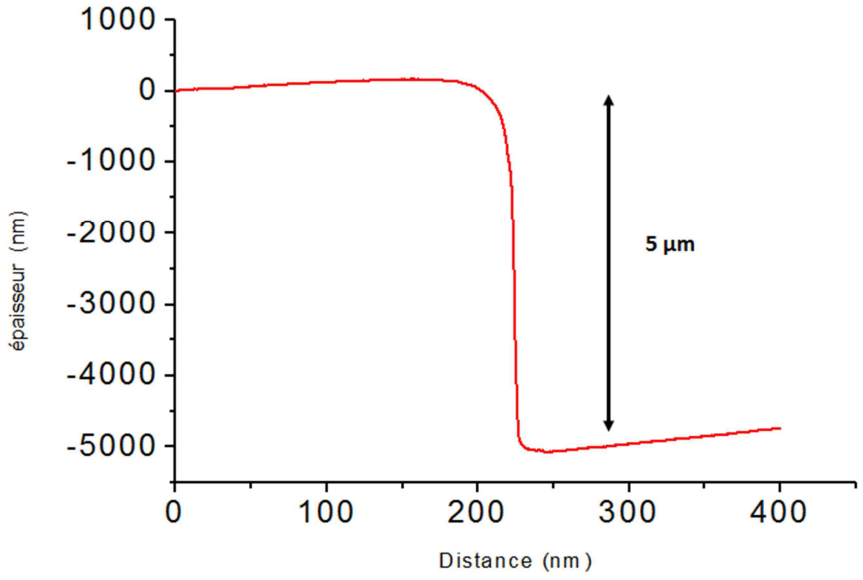
La solution prépolymérisée est déposée sur la surface de la lame de verre qui est ensuite recouverte par une deuxième lame de verre. Puis l'assemblage de lames est ensuite soumis à un rayonnement UV de longueur d'onde de 365 nm pendant 3 h pour réticuler la couche de polymère. Les deux lames sont ensuite désassemblées et la lame recouverte de film mince de NIP-ACN est rincée plusieurs fois avec de de l'acétone et de l'eau distillée pour enlever le polymère non réticulé et les solvants encore présents dans le dépôt de polymère. Une synthèse du protocole de dépôt relatif à la méthode sandwich est présentée dans le tableau 2-3.

Tab. 2-3 : Synthèse du protocole de dépôt de la méthode sandwich

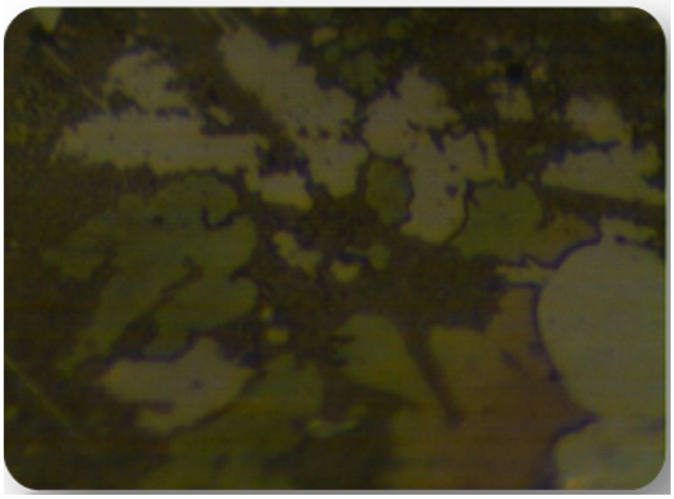
Méthode sandwich	
Choix du matériau	**Lame de verre**
Nettoyage	**Nettoyage des lames de verre** - Nettoyage à l'acétone puis à l'éthanol des deux lames de verre. - Traitement à l'UV-Ozone de l'une des lames.
Dépôt	- Dépôt d'une goutte de 2 µl de NIP sur le substrat - La 2ème lame recouvre la 1ère lame sur laquelle a été déposée la solution.
Polymérisation	- Polymérisation UV à 365nm pendant 30 min.
Désassemblage	- La lame du dessus est enlevée.

2.4.1.3 Résultats et caractérisation des dépôts

Les mesures d'épaisseurs des films sont réalisées en utilisant un profilomètre à stylet (VEECO Dektak 150), un résultat typique est représenté en Fig. 2-5a. Les images des films minces obtenues à l'aide de la caméra du profilomètre à stylet représentent chacune une zone de 0,67x4,29 mm^2. Les films obtenus sont très épais (>1µm). D'autre part, la séparation des lames de verre est une étape critique de cette technique par le risque d'arrachage de parties de polymère partiellement à l'origine d'inhomogénéité du film (Cf. Fig. 2-6). En effet, le polymère (zones sombres sur le cliché) ne recouvre pas totalement la zone de dépôt du substrat (zones claires), mais forme plutôt de petits amas. Pour limiter ce problème, il est important de réaliser un traitement chimique de la lame support afin de garantir une forte adhésion du polymère à la surface du support traité. Toutefois, le problème de séparation des lames de verres, l'épaisseur élevée des films obtenus (voir Fig. 2-5) et la difficulté de réaliser des dépôts localisés sur une zone définie, constituent un inconvénient majeur pour la compatibilité avec les dispositifs à ondes acoustiques.



(a)



(b)

Fig. 2-5: Caractérisation par profilomètre à stylet et optique intégré, a) profil du bord de la couche mince de NIP-ACN, b) image de surface (zoom : 600x)

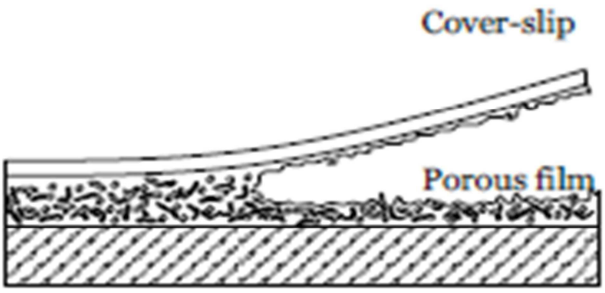


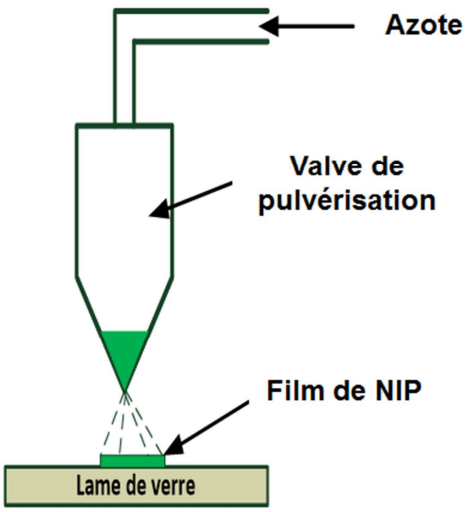
Fig. 2-6: Schémas de l'étape de séparation des lames de verre de la technique sandwich [134]

2.4.2 La pulvérisation

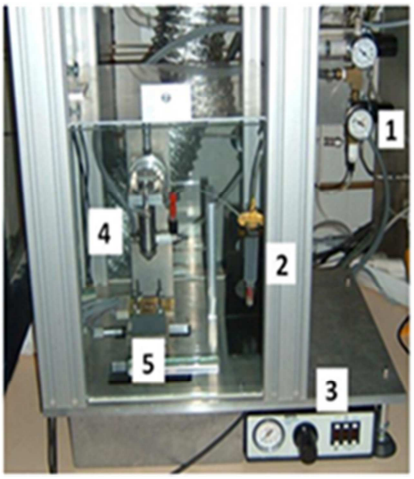
2.4.2.1 Principe

Cette technique de dépôt consiste à pulvériser sur la surface sensible du capteur une solution de polymère. Le banc de dépôt, est constitué d'une valve de la série 780S de chez EFD (cf. Fig. 2-7), pour laquelle plusieurs paramètres de débit et de pression sont réglables pour ajuster la quantité de solution vaporisée [135]. La principale difficulté de cette technique de dépôt réside [105] dans l'obtention de couches minces homogènes reproductibles. Parmi les paramètres régissant la qualité des dépôts nous pouvons citer en particulier :

- La distance entre la valve de pulvérisation et le substrat : elle influe sur la vitesse de dépôt des gouttelettes sur le substrat.
- La pression exercée dans la seringue et la pression du jet de pulvérisation : leurs valeurs sont variables et peuvent être comprises entre 0 et 1 bar dans le corps de la seringue et entre 0 et 2 bar au niveau de la valve de pulvérisation.
- La taille et le temps d'ouverture de la valve : la taille des gouttelettes générées ainsi que la quantité de matière déposée dépendent fortement de ces deux paramètres. Pour ces essais, nous les avons fait varier en fonction de la quantité déposée souhaitée.



(a)



1-Contrôle de la pression d'alimentation
2-Seringue contenant la solution de prépolymerisation
3-Contrôleur de la pression et du temps de pulvérisation
4-Valve de pulvérisation
5-Substrat de test

(b)

Fig. 2-7: a) Schéma, b) Photographie de principe du dispositif de dépôt par pulvérisation

2.4.2.2 Protocole de dépôt

De façon à pouvoir maîtriser la qualité du dépôt effectué, il est essentiel d'ajuster les solutions de polymère et les réglages. La pression de pulvérisation est réglée à 1,5 bar, pour être proche du maximum paramétrable et d'obtenir de fines gouttelettes de taille régulière. De manière à ce que le fluide contenu dans la seringue s'écoule correctement, la pression de poussée est ajustée autour de 0,2 bar. Enfin, l'ouverture de la valve, qui influe directement sur le débit de fluide pulvérisé, est adaptée afin de délivrer la quantité de fluide nécessaire pour recouvrir la zone de dépôt. Les dépôts ont été réalisés sur des lames de verre avec un volume de 10 mL de solution prépolymérisée. Le tableau 2-4 synthétise le protocole de dépôts :

Tab. 2-4 : Synthèse du protocole de dépôt de la méthode par pulvérisation

Lames de verre Caractéristiques : 76mm x 26mm ép. 1,1mm, bords rodés 90°.	
1-Nettoyage	- Nettoyage à l'acétone puis à l'éthanol des deux lames de verre.
2-Dépôt	- Dépôt de 10 mL de NIP sur la lame de verre par pulvérisation.
3-Polymérisation	- Polymérisation UV à 365 nm pendant 45 min.

2.4.2.3 Résultats et caractérisation des dépôts

Comme précédemment, la profilométrie mécanique et optique a permis d'étudier la qualité des dépôts. Les clichés de films minces de NIP-ACN sont présentés sur les Figures 2-8 et 2-9. Les images de la Figure 2-8 sont obtenues à l'aide de la caméra du profilomètre à stylet. Les images de la Figure 2-9 obtenues à l'aide d'un profilomètre optique Veeco, représentent chacune une zone de 1,3x0,9 mm^2, au niveau de la bordure de films de NIP-ACN. Comme nous pouvons le voir sur les deux figures, les films obtenus sur les lames de verres sont hétérogènes. Le matériau (zones sombres ou vertes sur les clichés) ne recouvre pas la totalité du substrat (zones claires ou bleu), mais forme de petits amas. En outre, l'épaisseur des films est de l'ordre de 10 µm, ce qui est très épais pour notre application. Cette technique nécessite également une plus grande quantité (environ 10 mL) de solution comparée aux autres techniques.

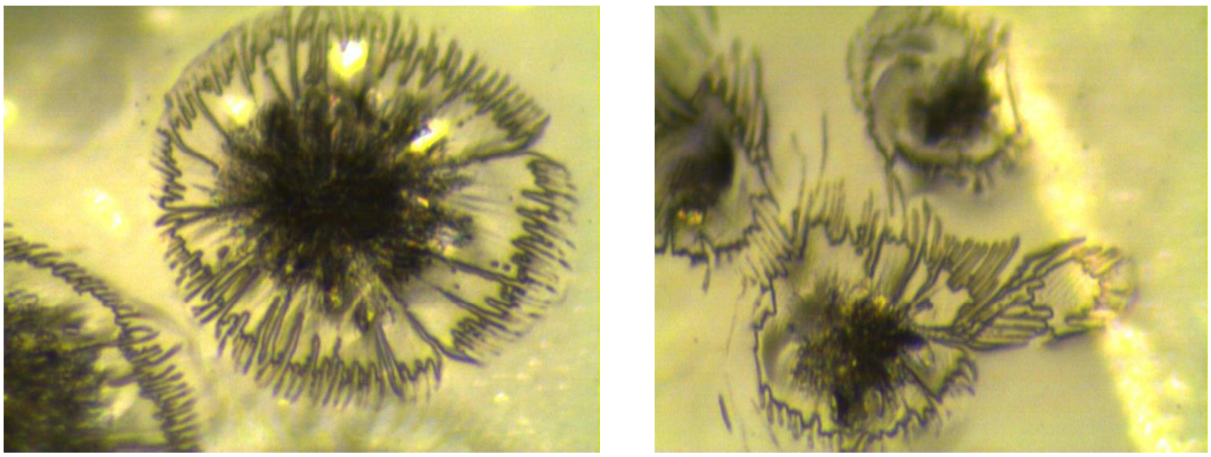
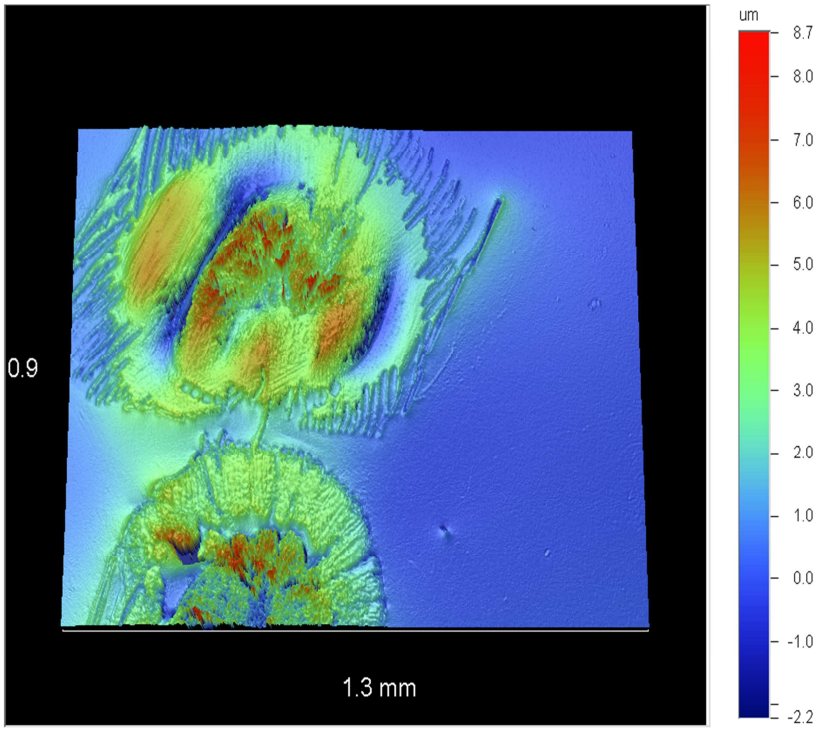


Fig. 2-8: Images de surface de dépôt de NIP-ACN par la méthode de pulvérisation au profilomètre à stylet (zoom : 600x)



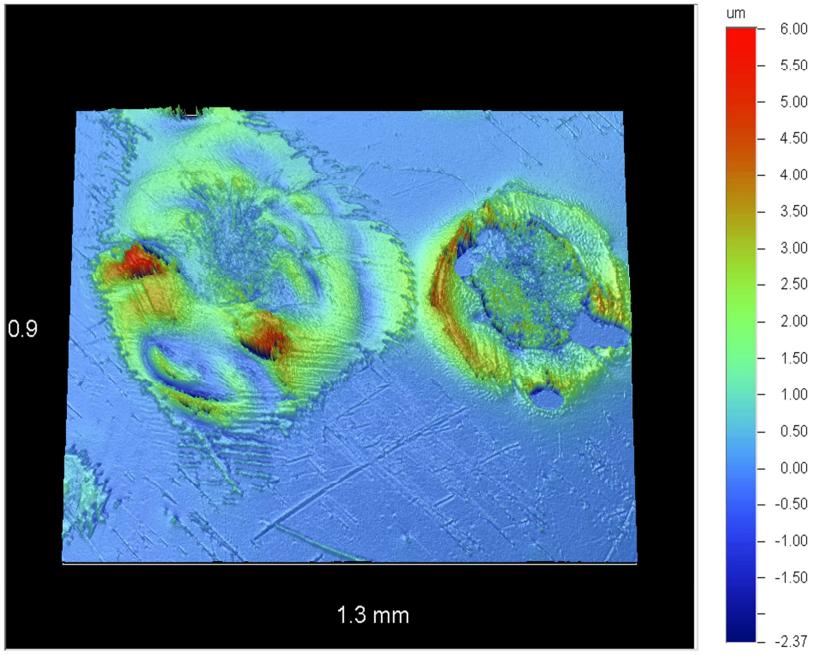


Fig. 2-9: Image de dépôts de NIP-ACN par la méthode de pulvérisation au profilomètre optique

2.4.3 Le dépôt à la tournette

2.4.3.1 Principe

Le dépôt par centrifugation est une méthode usuelle de dépôt qui permet la réalisation de films minces par enduction centrifuge. La surface à revêtir est fixée à un support motorisé. Ensuite, un volume de la solution est déposé puis étalé de façon homogène par force centrifuge. Le procédé de la méthode spin-coating qui été décrit par ***Bornside et al***. comporte les quatre étapes suivantes [136] :

- La première étape consiste à déposer une quantité de liquide en excès et de l'étaler lentement sur le substrat (*Fig. 2-10*(1)).
- Dans la seconde étape, la mise en rotation avec une rampe d'accélération, génère une force centrifuge qui permet l'étalement radial du liquide vers l'extérieur jusqu'à recouvrir la totalité du substrat (*Fig. 2-10*(2)).
- Le film liquide s'homogénéise en épaisseur et l'excès de liquide est évacué du substrat par la force centrifuge au cours de la troisième étape correspondant à un palier en vitesse (*Fig. 2-10*(3)).
- Dans la dernière étape (gélification), le solvant s'évapore en laissant un film mince sur le substrat.

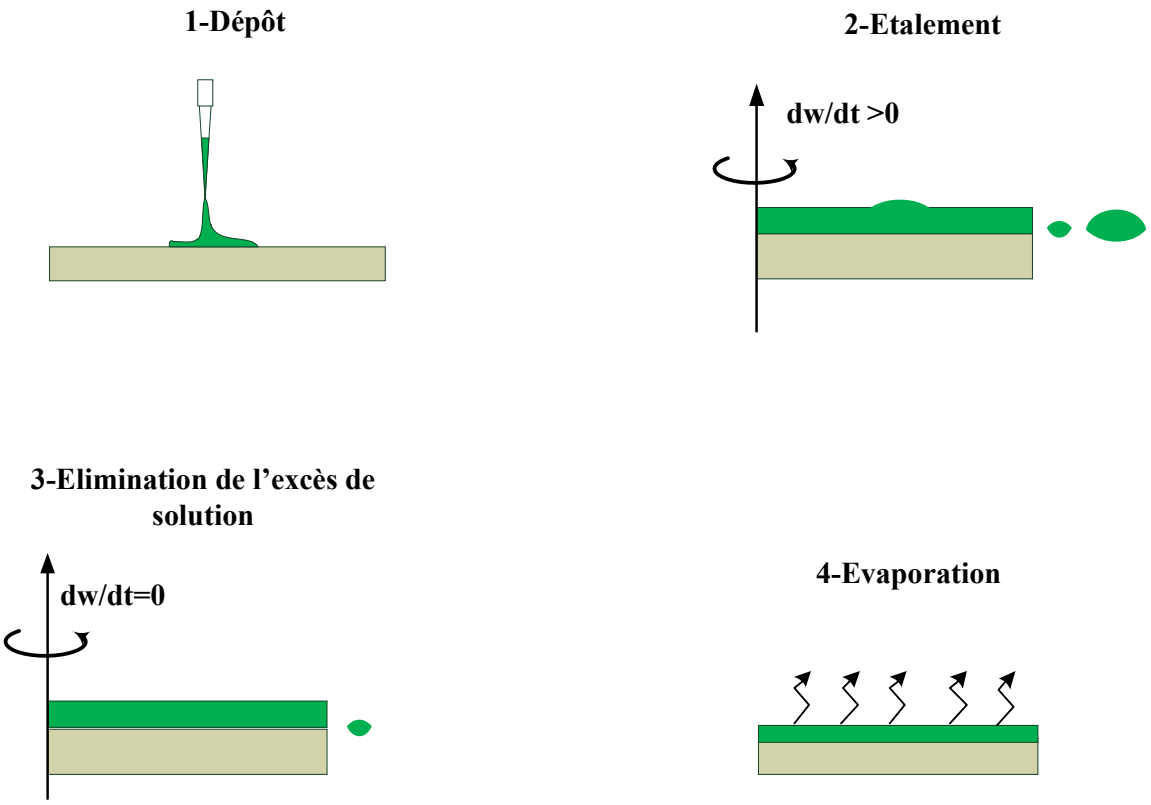


Fig. 2-10: Etapes du processus de dépôt par spin-coating

D'après ces mécanismes, un film liquide épais et uniforme a tendance à être formé pendant la rotation, dont l'épaisseur (e) est décrite par l'équation 2-5 :

$$e(t) = \frac{e_0}{\sqrt{1 + \frac{4\rho\omega^2 t e_0^2}{3\eta}}} \qquad (2\text{-}5)$$

Avec e_0 l'épaisseur initiale, t le temps de rotation, ω la vitesse angulaire, ρ la densité de la solution, η la viscosité de la solution.

Cette méthode présente l'avantage d'une grande facilité de mise en œuvre permettant d'obtenir un film de polymère uniforme sur un substrat. Les films sont très stables et peuvent généralement être stockés ou utilisés pour une durée indéterminée. Deux inconvénients peuvent être notés. Tout d'abord, la nécessité de promouvoir l'adhérence en modifiant chimiquement la surface. De plus, le solvant piégé dans le film de polymère peut nuire à sa performance [137].

2.4.3.2 Protocole de dépôts

La tournette utilisée au laboratoire IMS est un appareil de marque SÜSS Microtech, de modèle CT62 présenté en Fig. 2-11.

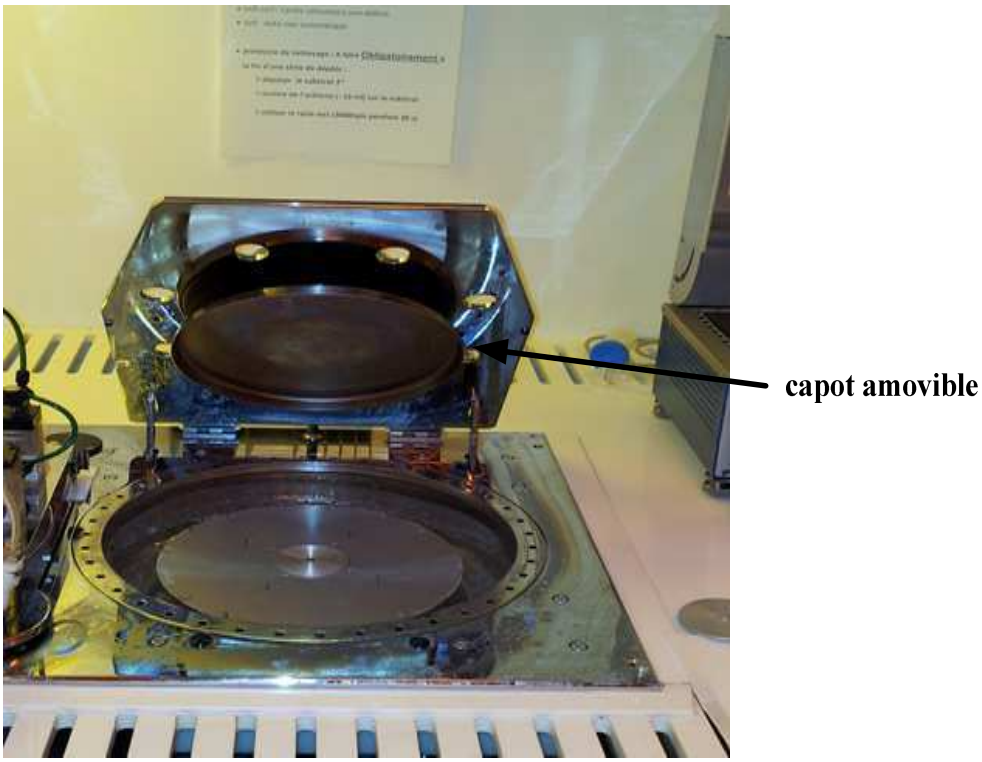


Fig. 2-11: Photographie de la tournette (spin-coater)

Le capot amovible dont il est muni, permet d'isoler de manière semi-étanche la couche liquide de l'atmosphère ambiante. La fermeture immédiate du capot après le dépôt de la solution sur le substrat, permet de confiner le solvant en ralentissant son évaporation.

Les paramètres importants influant sur l'épaisseur et la qualité du dépôt sont les suivants :

-Le temps de rotation qui est paramétrable : nous avons utilisé des valeurs comprises entre 10 et 60 secondes pour tous les dépôts réalisés.

-L'accélération programmable, avec laquelle est atteinte la vitesse. C'est un paramètre influant sur la qualité du dépôt, nous avons choisi de tester des valeurs comprises entre 300 et 4000 rpm/s.

-La vitesse de rotation : la tournette utilisée, permet d'atteindre des vitesses de rotation de 7000 rpm. Lors de nos essais, nous avons réalisé les dépôts à des vitesses de rotation comprises entre 400 et 2000 rpm.

-le volume de solution : ce paramètre influe sur la quantité de matière introduite et sur l'épaisseur du dépôt réalisé. Lors de notre étude, nous avons préalablement recouvert l'ensemble du substrat de la solution à déposer avant la mise en rotation. Les volumes utilisés sont compris entre 5 et 20 µL pour les dépôts sur lames de verre.

Une bonne maîtrise de ces paramètres conduit à l'obtention d'un dépôt d'épaisseur très homogène.

Avant dépôt, les lames sont nettoyées dans des bains successifs d'acétone et d'éthanol. Elles subissent un traitement sous UV-Ozone pendant 10 min afin d'améliorer le mouillage de la surface par la solution. Le mélange prépolymérisé contenant les différents réactifs est déposé par centrifugation. Tous les dépôts sont réalisés systématiquement à capot fermé du début jusqu'à la fin de la procédure de spin-coating. Un programme de dépôt a été mis au point de manière à obtenir des couches minces homogènes (cf. Tab. 2-5).

Tab. 2-5 : Synthèse du protocole de dépôt à la tournette de films minces de NIP-ACN sur des lames de verre

Lames de verres : (76mm x 26mm ép. 1,1mm, bords rodés 90°)	
1-Nettoyage	- Nettoyage à l'acétone puis à l'éthanol des deux lames de verre. - Traitement à l'UV-OZONE de la lame support.
2-Dépôt	- Réglage tournette pour 2 à 10 µL de solution : - v= 1000 rpm. - a=300 rpm/s. - t=10 - 15 s.
3-Polymérisation	- Polymérisation UV à 365nm pendant 3h sous atmosphère inerte.

Les résultats préliminaires de dépôts sans prétraitement des lames de verres, ayant mis en évidence un problème d'adhérence, une étape de fonctionnalisation a été ajoutée de nouveau. Ainsi afin de s'affranchir de ce problème d'adhérence et d'améliorer l'étalement des solutions, la surface des substrats a été soumise à un traitement chimique de surface, composé d'une première étape de nettoyage utilisant un mélange piranha, et d'une silanisation pour obtenir un greffage covalent du polymère à la surface. L'ensemble du protocole de dépôt est synthétisé sur le tableau 2-6.

Tab. 2-6 : Synthèse du protocole de dépôt à la tournette de film de NIP-ACN, avec silanisation

Lames de verres : (76mm x 26mm ép. 1,1mm, bords rodés 90°)		**Détails et observations**
1-Nettoyage	-Bain piranha (15 min). -Rinçage abondant avec de l'eau DI puis séchage à l'azote.	-Amélioration de la mouillabilité de la surface des substrats.
2-Silanisation	-Lavage au solvant de silanisation (toluène). -Silanisation (2% en vol) toute une nuit à température ambiante. -Stabilisation de la couche par recuit à l'étuve à 200°C pendant 30 min.	-Greffage covalent du polymère à la surface du substrat.
3-Dépôt	-Réglage tournette pour 2 à 50 µL de solution : - v=400-2000 rpm. - a=300-4000 rpm/s. - t=10-40 s.	
4-Polymerisation	-Polymérisation UV à 365 nm pendant 3h sous atmosphère inerte.	

2.4.3.3 Résultats et caractérisation des dépôts

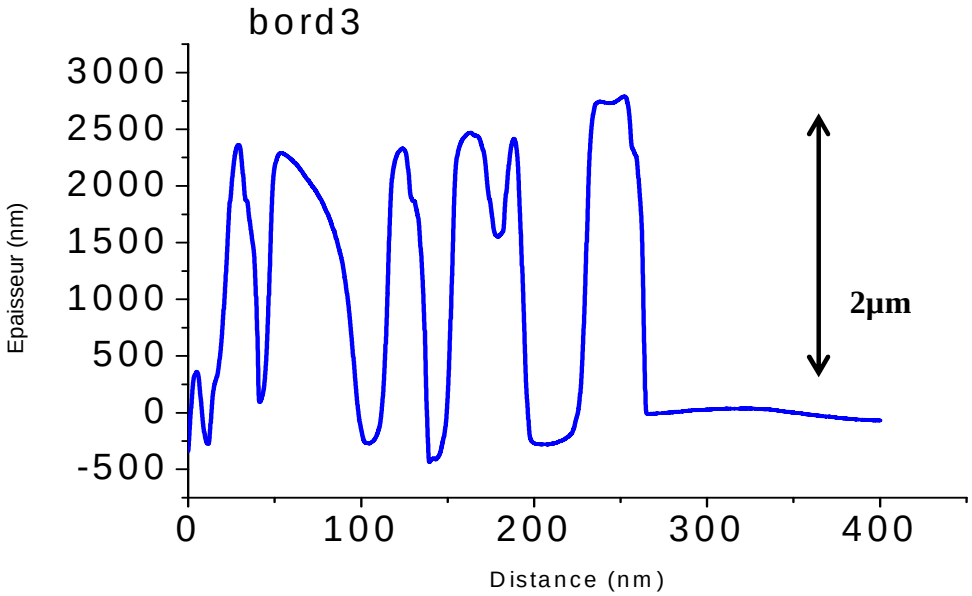
2.4.3.3.1 Résultats de dépôts préliminaires sans prétraitement

Le tableau Tab. 2-7 résume les conditions testées et les résultats obtenus :

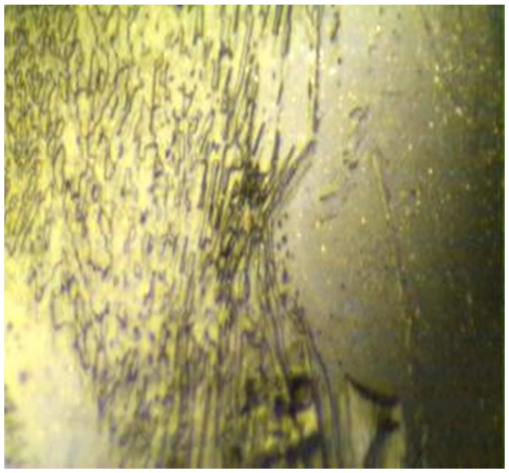
Tab. 2-7 : Essais de dépôt par centrifugation réalisés avec une solution de polymère non imprimé sur des lames de verre non silanisées

Tests	**Vitesse (rpm)**	**Volume (µL)**	**Accélération (rpm/s)**	**Durée (s)**	**Remarques**
1	700	20	300	30	Dépôts hétérogènes
2	900	20	300	60	Dépôts hétérogènes
3	1000	20	2000	40	Dépôts hétérogènes
4	1500	10	300	30	Dépôts hétérogènes
5	2000	5	4000	15	Dépôts hétérogènes

La Figure 2-12a montre l'épaisseur d'un film mince et la Figure 2-12b, le cliché pris par la caméra du profilomètre à stylet d'un dépôt de NIP-ACN. Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 2-12b, les films minces obtenus lors des premiers essais, étaient pour la plupart hétérogènes. Quels que soient, le temps de rotation, le volume de solution utilisé, la vitesse ou l'accélération, le dépôt résultant a tendance à se localiser sur une partie du support et ne s'étale pas de manière homogène, ce qui indique une difficulté de la solution à mouiller le substrat.



(a)



(b)

Fig. 2-12: Caractérisation par profilométrie mécanique a) profil du bord de la couche mince de NIP-ACN, b) image de surface (zoom : 600x)

2.4.3.3.2 Influence du prétraitement et limitation de la zone de dépôt

Les résultats de dépôts et les différents paramètres testés sont synthétisés dans le tableau 2-8:

Tab. 2-8 : Essais de dépôt à la tournette de films minces de NIP-ACN sur des lames de verre

Tests	**Vitesse (rpm)**	**Volume (µL)**	**Accélération (rpm/s)**	**Durée (s)**	**Nombre d'essais**	**Remarques**
1	3000	15	300	40	12	Dépôts homogènes d'épaisseur = 900 nm
2	3500	20	400	40	7	Dépôts homogènes d'épaisseur = 700 nm
3	4000	10	400	40	8	Dépôts homogènes d'épaisseur = 500 nm
4	4000	10	400	40	4	Dépôts homogènes d'épaisseur = 400 nm
5	400	5	400	40	6	Dépôts homogènes d'épaisseur = 3µm

En comparaison avec les essais de spin coating réalisés sans aucune procédure de prétraitement, les résultats (Cf. Fig. 2-13 et 2-14) montrent que les dépôts obtenus sont homogènes et mettent en évidence l'importance d'une étape de traitement de surface pour réaliser des dépôts de bonne qualité. En effet, à chaque fois, les dépôts étaient homogènes avec une bonne reproductibilité. Ces tests préliminaires sur les lames de verre visaient à démontrer la faisabilité du couplage de matériau à empreinte moléculaire sur des substrats ayant une chimie de surface proche que celle de nos capteurs. Par conséquent nous avons pu procéder par la suite au test sur les dispositifs à ondes acoustiques.

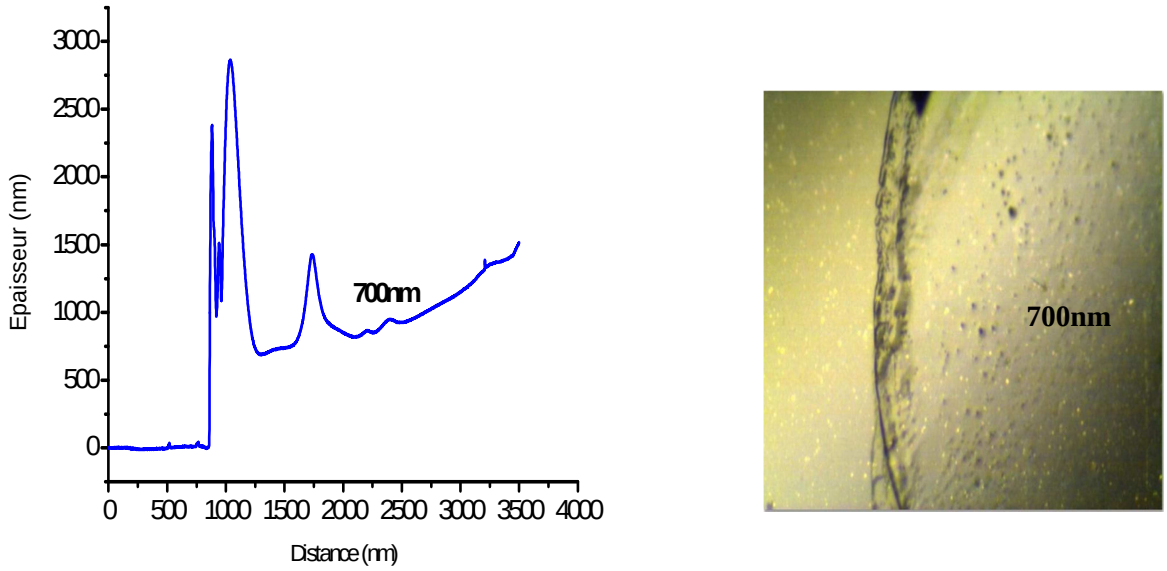


Fig. 2-13 : Caractérisation par profilométrie mécanique a) profil du bord de la couche mince de NIP-ACN, b) image de surface (zoom : 600x)

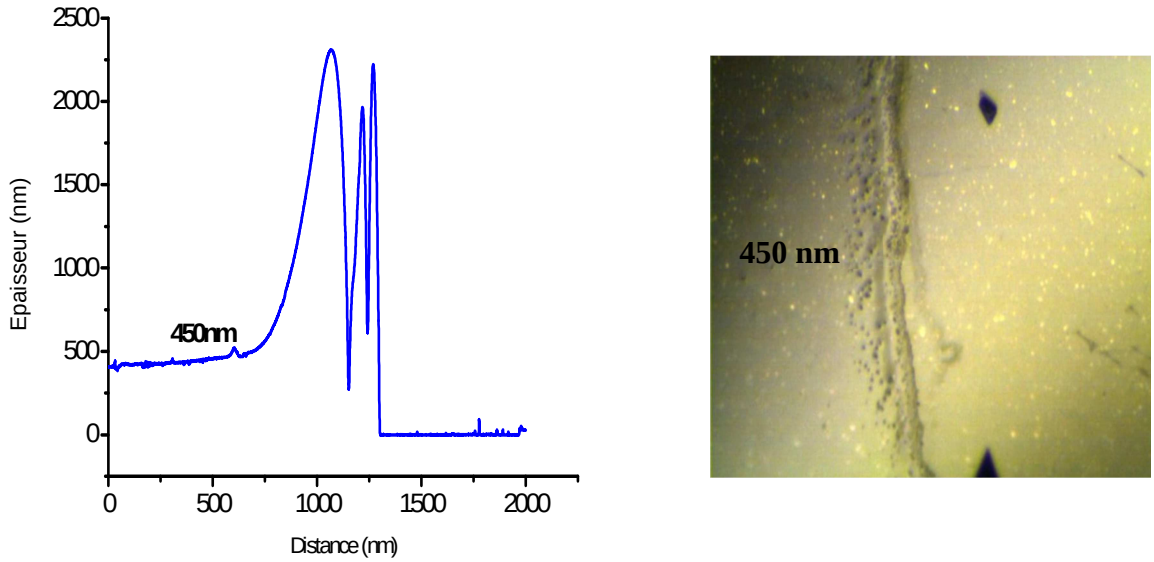


Fig. 2-14 : Caractérisation par profilométrie mécanique a) profil du bord de la couche mince de NIP-ACN, b) image de surface (zoom : 600x)

De plus, des tests de limitation de la zone de dépôt sur les lames de verre en vue du dépôt de NIP-ACN sur le chemin de propagation du capteur à onde acoustique ont été réalisés en utilisant un film adhésif (Kapton). Il recouvre les zones choisies pendant le dépôt afin d'obtenir un dépôt sur une zone prédéfinie. La solution est ensuite déposée par force centrifuge. La Figure 2-15 présente une image du film mince de NIP-ACN réalisée avec la

caméra du profilomètre à stylet. Le film recouvre la zone délimitée par le Kapton. Par ailleurs, les Figures 2-13 et 2-14 montrent l'existence d'effets de bord liés à l'utilisation du Kapton.

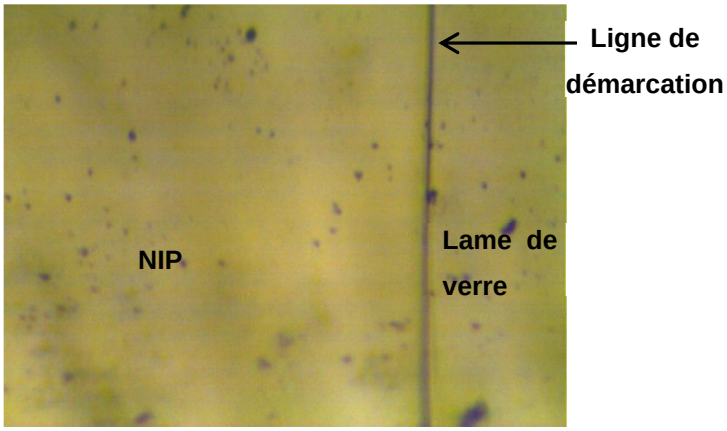


Fig. 2-15 : Image de surface par la caméra du profilomètre à stylet de NIP-ACN avec la limite du dépôt due au masquage par Kapton (zoom : 600x)

2.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons exposé dans un premier temps la méthodologie de préparation des solutions prépolymérisées ainsi que le protocole de fonctionnalisation chimique de la surface du substrat par l'intermédiaire d'une couche d'accroche de silane (3MPS). Ce protocole de silanisation a permis de coupler de manière covalente les couches minces de polymères non imprimés à la surface du substrat. Comparée à d'autres méthodes (l'immobilisation par affinité ou l'immobilisation par des liaisons ioniques), la silanisation permet un couplage covalent très stable.

Parmi les différentes techniques de dépôt à notre disposition, les résultats de dépôts obtenus nous ont amenés à sélectionner un dépôt à la tournette (spin-coating), adaptée pour l'obtention de films minces homogènes d'épaisseurs contrôlées sur des substrats de tests. En vue du dépôt local de polymère sur le chemin acoustique des capteurs, nous avons réalisé des tests de dépôt sur des zones prédéfinies en utilisant du Kapton.

Ainsi, après la validation du protocole de dépôt reproductible sous forme de couches minces homogènes (200 nm), nous allons procéder aux mêmes tests sur des capteurs à ondes acoustiques qui seront exposés au chapitre suivant.

3 Intégration du film mince sur le capteur

3.1 Introduction

Pour les diverses applications des capteurs à ondes acoustiques à la détection et à la caractérisation de milieux, la stabilité des paramètres de propagation de l'onde acoustique représente l'un des paramètres les plus importants. Ainsi, toute variation d'un ou plusieurs paramètres physico-chimiques extérieurs tels que le dépôt d'un film mince de polymère, modifiera les caractéristiques de propagation de l'onde.

Dans le chapitre précédent, nous avons déterminé le dépôt par centrifugation comme méthode de dépôt permettant d'obtenir les meilleurs résultats. Les premières expériences réalisées sur des lames de verre, ont ainsi permis de définir les paramètres permettant d'obtenir des couches minces homogènes. A partir de cette base, un premier objectif était de trouver un moyen approprié de déposer localement sur le chemin acoustique du transducteur, un matériau à empreinte moléculaire, compatible avec la propagation de l'onde acoustique. Ces essais ont pour dessein de montrer la faisabilité et l'intérêt de la réalisation d'une plateforme de détection à partir de l'association d'un matériau à empreinte moléculaire et d'un dispositif à ondes de Love.

Dans ce chapitre dans un premier temps, nous présenterons brièvement les caractéristiques des capteurs à onde de Love utilisés lors de ces travaux. Ensuite, nous détaillerons les résultats du couplage des films minces de polymères (NIP-ACN, MIP/NIP-DMSO) à la surface du capteur à onde acoustiques, avec l'adaptation du protocole présenté au chapitre précédent, au changement de support puis au changement de solvant qui sera nécessité par le passage au polymère imprimé avec une cible commerciale, sélectionnée parallèlement par le partenaire ICOA. Nous exposerons également les caractérisations électriques des dispositifs après dépôts, pour valider la propagation de l'onde, ainsi que les caractérisations des films par profilométrie et microscopie électronique à balayage qui permettront notamment de valider l'extraction des empreintes puis leur recapture par les films MIP.

3.2 Le capteur à onde de Love

3.2.1 Structure de la ligne à retard

Les dispositifs à ondes de Love utilisés dans le cadre de ces travaux sont ceux développés et réalisés selon un protocole établi en collaboration entre l'IMS et la plateforme technologique du LAAS (**Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes UMR CNRS 8001**) de Toulouse. Les capteurs ont une épaisseur totale de 500 µm. Comme déjà abordé au chapitre 1, ils sont constitués de deux lignes à retard, qui comportent chacune un transducteur d'entrée qui génère l'onde élastique par effet piézoélectrique inverse, tandis que le transducteur de sortie transforme de nouveau cette onde mécanique en signal électrique, par effet piézoélectrique direct.

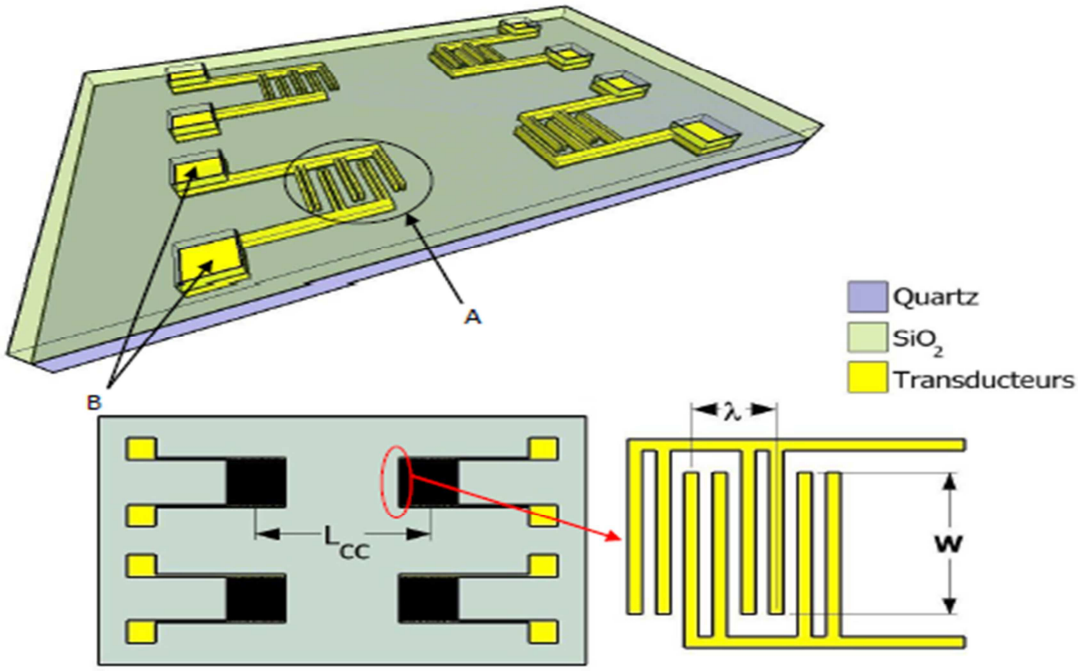


Fig. 3-1: Capteur à onde de Love [48]

Les principales caractéristiques des lignes à retard sont décrites ci-dessous (Cf. *Fig. 3-1*) :

- Le substrat en quartz, de coupe cristallographique AT (angles d'Euler :0°, 121.5°, 90°), choisie pour conférer au capteur à onde de Love une sensibilité maximum, et une propagation perpendiculaire à X qui permet de générer des ondes purement transverses horizontales.

- Les transducteurs composés de 44 paires d'électrodes interdigitées (IDTs) (Figure 2-1-A) et de deux plots de contacts (Figure 2-1-B), sont, en général, réalisés par dépôt de couches minces en Titane/Or déposées par évaporation sur le substrat. La périodicité spatiale des électrodes (ou doigts), λ est de 40 µm. L'ouverture des transducteurs, W, est de 40λ.

- La couche guidante est un élément essentiel du fonctionnement du dispositif à ondes de Love. Cette couche permet de confiner l'énergie acoustique et augmente ainsi la sensibilité à l'effet de masse du capteur à ondes de Love. C'est une couche de SiO_2, de 4 à 5 µm d'épaisseur typiquement déposée par PECVD (Plasma Enhanced Vapor Deposition) à une température (300°C) inférieure à la température de changement de phase du quartz. A la suite de ce dépôt, la couche est gravée chimiquement, après une nouvelle étape de photolithographie, afin de libérer les contacts électriques. Le choix du SiO_2 est justifié par les nombreux avantages suivants :

- bonne rigidité
- faibles pertes acoustiques,
- bonne stabilité chimique et mécanique (résistance à de nombreux traitements chimiques),
- célérité acoustique inférieure à celle du quartz,
- compatibilité avec les milieux biologiques,
- possibilité de fonctionnaliser sa surface,
- réutilisable.

3.2.2 La sensibilité à l'effet de masse

Le principe de détection d'espèces cibles par les capteurs à ondes acoustiques s'appuie principalement sur l'effet de masse, ou de manière plus générale sur un effet mécanique. C'est-à-dire que la sorption d'espèces entraîne une modification des propriétés physico-chimiques. Il s'ensuit une perturbation de l'onde acoustique et notamment un changement de sa vitesse de phase et une variation de la fréquence d'oscillation comme illustré en Figure 3-2.

La sensibilité à l'effet de masse est définie comme la variation relative de vitesse ramenée à la variation de masse surfacique due au dépôt ou à une modification de la couche sur le chemin de propagation de l'onde acoustique. Cette sensibilité est définie par la relation suivante [107][138] :

$$S = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{1}{\Delta \rho_0 b} \qquad (3\text{-}1)$$

Avec :

- $\Delta V = V_0 - V_1$, la variation de vitesse,
- V_0 : la vitesse de phase du dispositif initial sans couche sensible ou avec couche non modifiée,
- V_1 : la vitesse de phase du dispositif après effet de masse ou avec couche modifiée,
- $\Delta\rho_0$: la masse volumique de la couche sensible ou sa variation,
- b : l'épaisseur de la couche sensible,

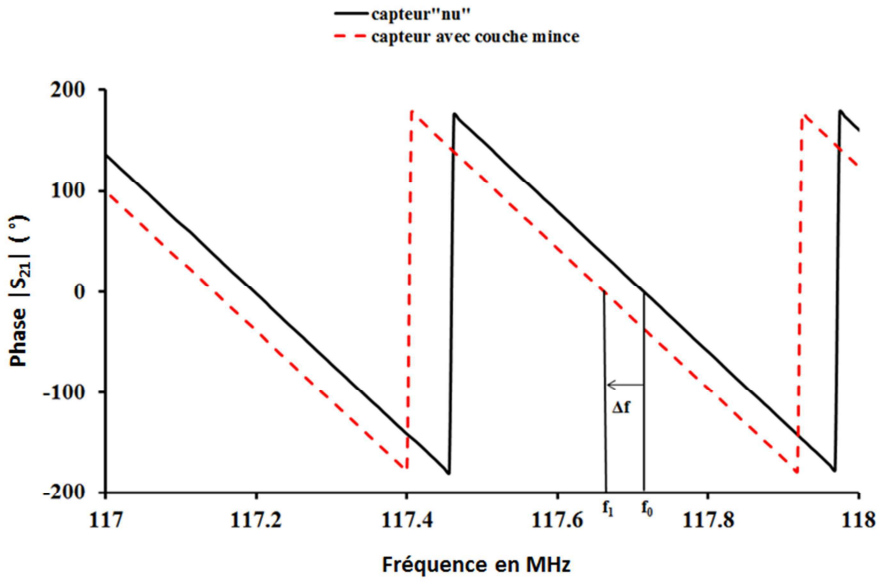


Fig. 3-2: Décalage de la réponse de phase en transmission suite à un ajout de masse sur le capteur à onde acoustique

3.2.3 Caractérisation électrique des capteurs à ondes de Love

Les changements des conditions de propagation de l'onde de Love se traduisent par une modification de la vitesse et une atténuation de l'onde. Ces mesures ont été réalisées au moyen d'un analyseur de réseaux ANRITSU MS4623B (voir Fig. 3-3), pour nous permettre de contrôler le bon fonctionnement des dispositifs et de préciser leurs caractéristiques notamment en ce qui concerne les pertes d'insertion.

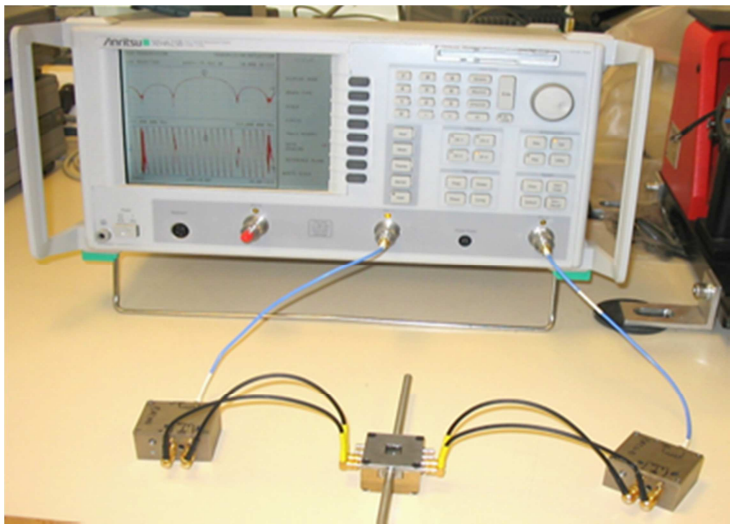
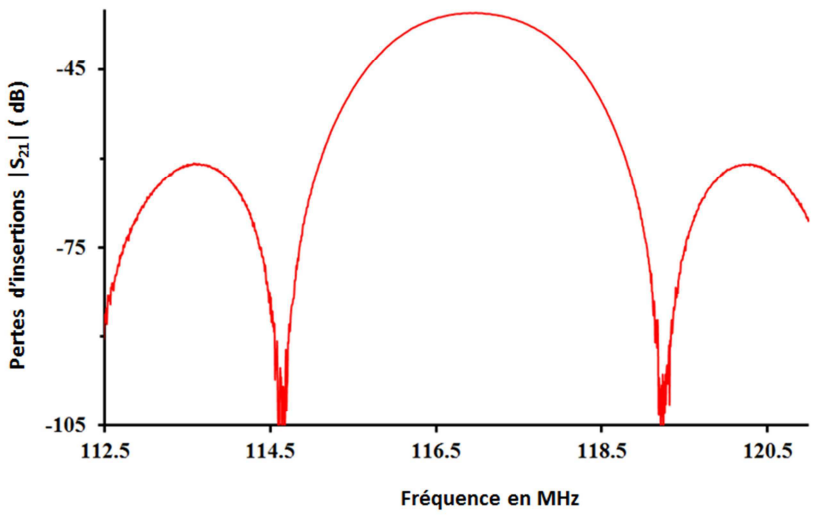


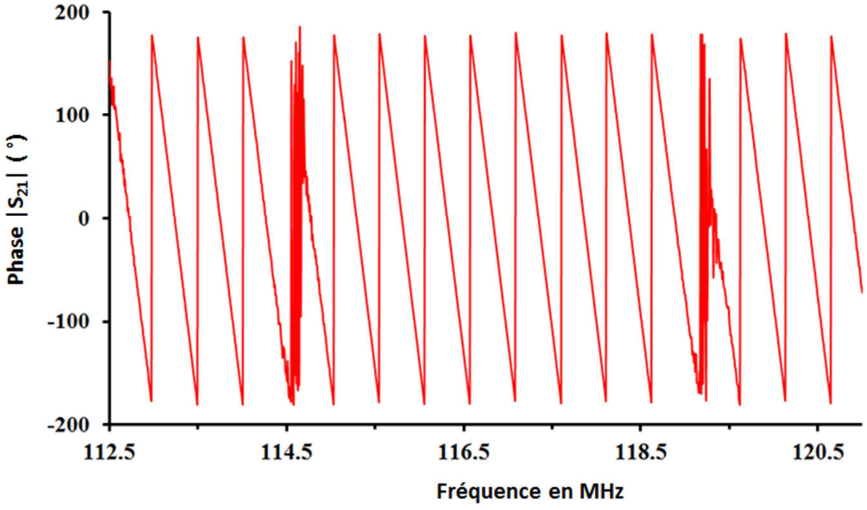
Fig. 3-3: Caractérisation des capteurs à ondes de Love à l'analyseur de réseau

3.2.3.1 Réponse fréquentielle

Les réponses en transmission S_{21}, soit le gain en amplitude et en phase caractéristique d'une ligne à retard à ondes de Love en fonction de la fréquence, sont présentées en Figure 3-4. La réponse en gain permet de retrouver une fréquence de résonance proche de 117 MHz qui correspond à la fréquence de fonctionnement attendue. Les niveaux des pertes d'insertions s'élèvent à -35 dB. La ligne de base qui se rapporte au niveau de bruit, est rejetée à des valeurs de -100 dB. En outre, nous pouvons remarquer la bonne linéarité de la phase dans toute la bande de transmission.



(a)



(b)

Fig. 3-4: Réponse fréquentielle observée à l'analyseur de réseau: (a), amplitude, (b) phase

3.2.3.2 Réponse temporelle

La réponse temporelle en transmission du dispositif de test est obtenue en transposant dans le domaine temporel par transformée de Fourier inverse, les résultats obtenus dans le domaine fréquentiel. La Figure 3-5 représente une réponse temporelle typique de la ligne à retard. Le pic principal de la réponse (marqueur1) représente l'onde acoustique. Ce signal est retardé du temps mis par l'impulsion générée par le transducteur d'entrée pour atteindre le

transducteur de sortie, et il présente un retard de 1,98 µs. Ce retard peut être déterminé à partir de la vitesse de phase de l'onde et de la distance centre à centre Lcc des deux électrodes interdigitées par la relation suivante :

$$\tau = \frac{L_{cc}}{V_p} \tag{3-2}$$

Avec :

- L_{cc} : distance centre à centre des deux électrodes
- V_p : vitesse de phase de l'onde

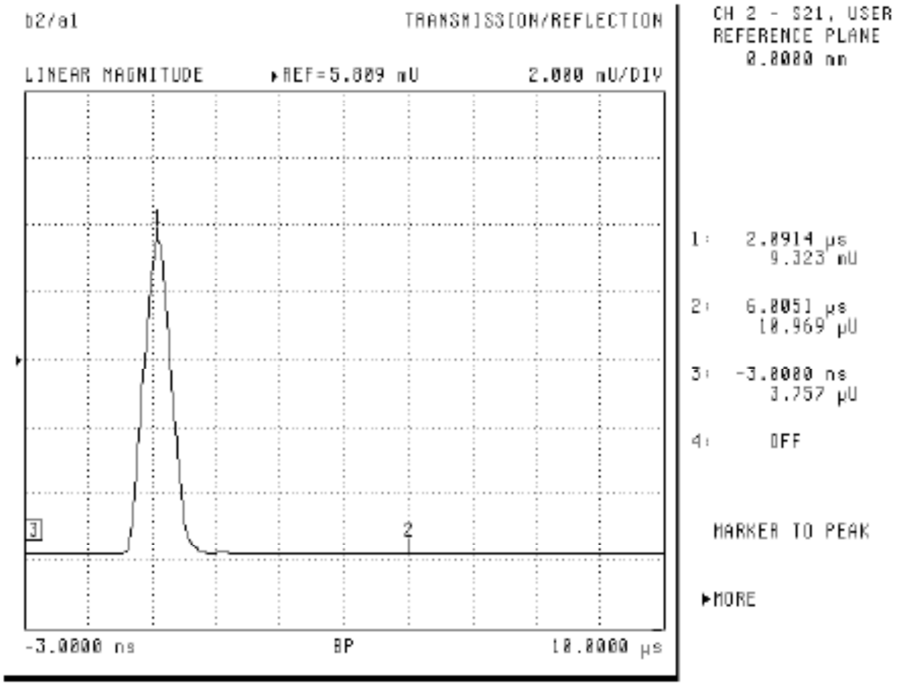


Fig. 3-5: Réponse temporelle observée à l'analyseur de réseau d'un capteur à onde de Love

3.3 Elaboration et caractérisation de la couche mince de NIP-ACN

3.3.1 Protocole de dépôt

La formulation de la solution de prépolymérisation est la même que pour les dépôts sur des lames de verre. Cependant, le protocole a pu être adapté au dépôt sur les dispositifs à ondes acoustiques afin d'obtenir des dépôts localisés sur la zone de propagation de l'onde (chemin acoustique).

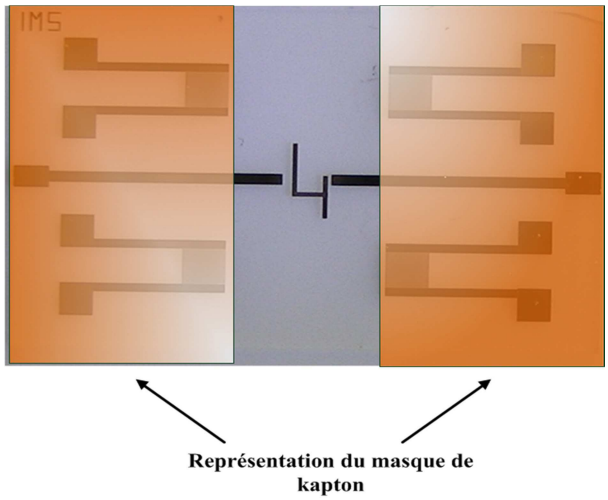


Fig. 3-6: Localisation de la couche mince de polymère à empreinte moléculaire sur la zone centrale de la double ligne à retard et dessin du masque de kapton

Un film polyimide adhésif de 50 µm d'épaisseur (Kapton®) a été déposé de part et d'autre du capteur laissant libre une bande de la largeur de la zone active (voir Fig. 3-6) avant dépôt du polymère. L'utilisation de ce ruban de Kapton, présente l'avantage de ne pas altérer le substrat lorsqu'il est retiré. Il est également simple à utiliser et possède une bonne stabilité mécanique et chimique. Pour limiter au maximum les effets de bord, le Kapton est retiré rapidement juste après le dépôt.

Tab. 3-1 : Synthèse du protocole de dépôt de NIP sur les capteurs

Capteurs (**dimensions** : 24 mm x 15 mm, ép. : 0.1 mm)	
1 –Nettoyage	-Bain piranha (15min). -Rinçage abondant à l'eau DI puis séchage à l'azote.
2-Silanisation	-Lavage au solvant de silanisation (toluène). -Silanisation (2% en vol) une nuit à température ambiante. -Stabilisation de la couche par recuit à l'étuve à 200°C pendant 30 min.
3-Dépôt	-Réglage tournette pour 2 à 50 µL de solution : - v=1000-3000 rpm. - a=300-4000 rpm/s. - t=10-40 s.
4-Polymérisation	-Polymérisation UV à 365 nm pendant 3h sous atmosphère inerte.

3.3.2 Résultats et caractérisation

3.3.2.1 Mise au point des paramètres de dépôt

Après application du masque polyimide, les dépôts sur les capteurs à ondes acoustiques sont réalisés à l'aide de la technique de centrifugation (spin-coating) selon le protocole synthétisé sur le tableau 3-1. Suite au changement du support de test, les premiers résultats utilisant les paramètres sélectionnés lors des dépôts sur lames de verre n'étant pas concluants, nous avons alors procédé à de nouveaux tests en ajustant les paramètres de la tournette (vitesse de rotation, nombre de paliers de vitesse, accélération et durée) afin d'obtenir des films minces homogènes. Les résultats de ces essais mènent à des dépôts homogènes avec une grande gamme dans les épaisseurs obtenues, celles-ci étant comprises entre 17 µm et 200 nm. L'ensemble des résultats de dépôts réalisés, est présenté au tableau 3-2.

Tab. 3-2 : Résultats des dépôts à la tournette, réalisés avec une solution de NIP-ACN sur des dispositifs à ondes acoustiques

Capteurs	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Vitesse (rpm)	$V_1 = 400$ $V_2 = 1000$	1000	1000	2000	$V_1=400$ $V_2=2000$	1500	2000
Accélération (rpm/s)	4000	4000	4000	4000	2000	2000	2000
Durée (s)	$T_1 = 10$ $T_2 = 5$	40	20	20	$T_1 = 13$ $T_2 = 5$	10	10
Quantité (µL)	5	30	10	30	30	40	50
% en vol du silane	2	2	2	2	2	2	2
Remarques	Polymère épais : **17µm**	Polymère épais : **8 µm**	Polymère épais : **6 µm**	Polymère très fin : **200 nm**	Polymère fin : **500 nm**	Polymère très fin : **350 nm**	Polymère très fin : **220 nm**

3.3.2.2 Caractérisation électrique des capteurs à ondes acoustiques à base de NIP-ACN

Les capteurs équipés de ces couches minces de NIP-ACN ont ainsi été caractérisés électriquement sous analyseur de réseau ANRITSU avant et après dépôt, afin de contrôler le bon fonctionnement des capteurs lors de leur réception, et de quantifier le déphasage et surtout les pertes liées au dépôt des films minces de polymère et vérifier que celles-ci demeurent acceptables pour un fonctionnement avec la boucle d'oscillation.

Les Figures 3-7 et 3-8 présentent les réponses fréquentielles en transmission S_{21} en gain et en phase du capteur r26b06 et du capteur r22 a04, avant et après dépôt du polymère non imprimé d'épaisseur 200 nm et 6 µm respectivement. On note une bonne linéarité de la phase dans la bande de transmission (cf. Fig. 3-7 b et Fig. 3-8 b), typique d'une ligne à retard.

Les réponses en gain montrent une fréquence de résonance proche de 117 MHz pour le capteur r26b06 et 115 MHz pour le capteur r22a04.

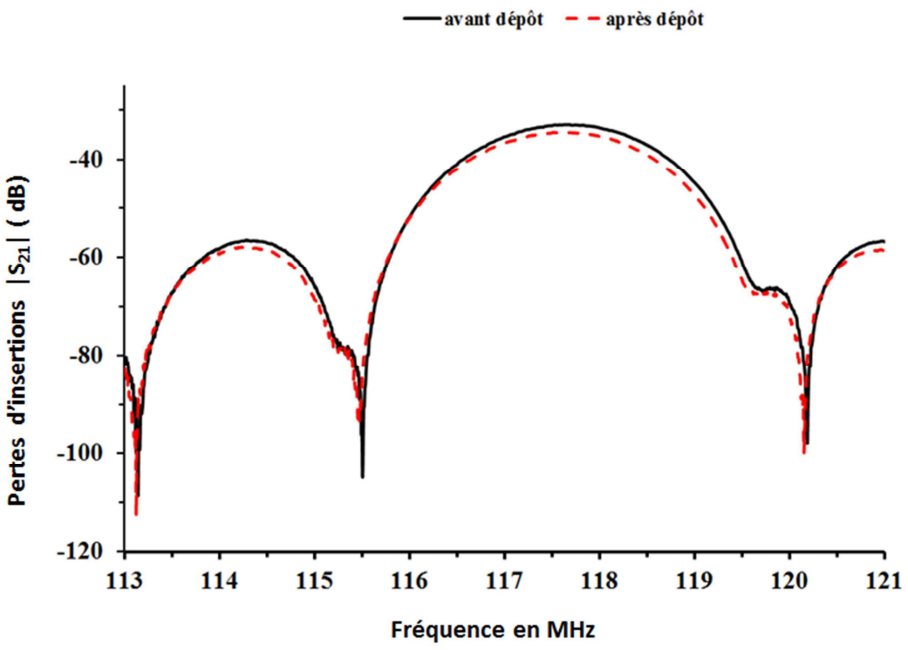
On n'observe pas d'augmentation des pertes d'insertion significative pour le capteur r26b06, mais une légère variation de la fréquence de résonance. La courbe de phase permettant de déterminer la diminution de fréquence $\mathbf{\Delta f_0}$ (à phase constante) liée au dépôt du film mince, est de l'ordre de 50 kHz pour une épaisseur d'environ 200 nm.

En revanche, pour les films plus épais (épaisseur 6 µm), la réponse du capteur r22 a04 après dépôt de la couche, montre une augmentation des pertes de 22 dB et une variation de fréquence de 160 kHz (cf. Fig. 3-8).

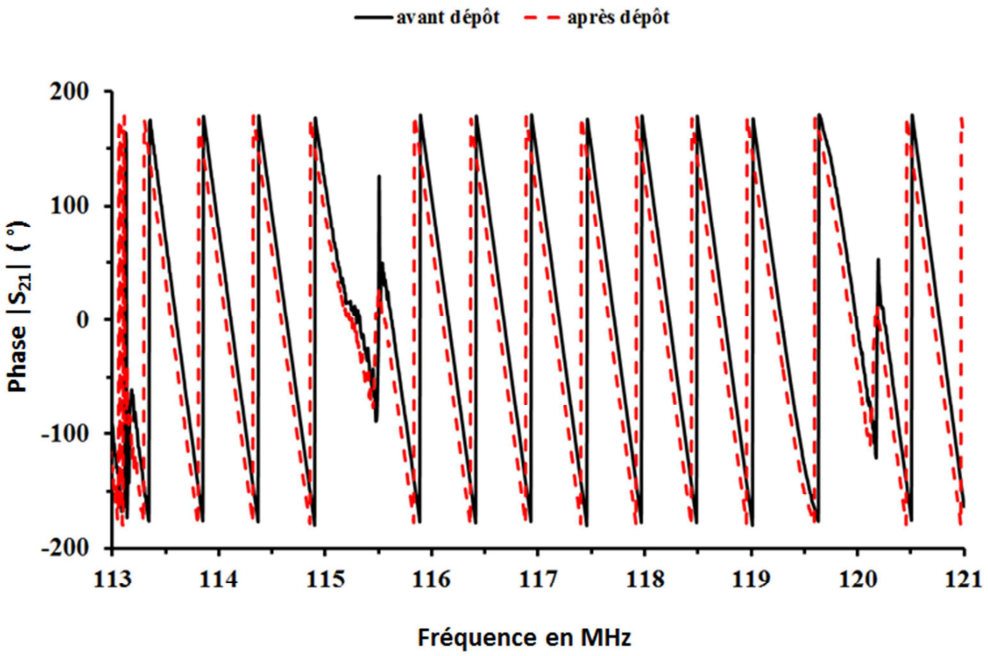
Ces résultats permettent de conclure qu'à partir de 6 µm, les pertes d'insertions sont trop importantes et pourraient devenir prohibitives pour un fonctionnement en oscillateur. Néanmoins, les films épais de polymères contiennent plus de pores et présentent ainsi une surface active plus importante qui permettrait d'obtenir une plus grande sensibilité du capteur. Pour exploiter au mieux le potentiel des capteurs à base de MIP, un compromis est essentiel.

Par la suite, nous avons choisi de limiter l'épaisseur du polymère à 200 nm. Les conditions ayant permis l'obtention de cette épaisseur avec les meilleurs résultats sont :

- une vitesse de 2000 rpm,
- un temps de 20 s ou 10 s,
- une accélération supérieure ou égale à 2000 rpm / s.

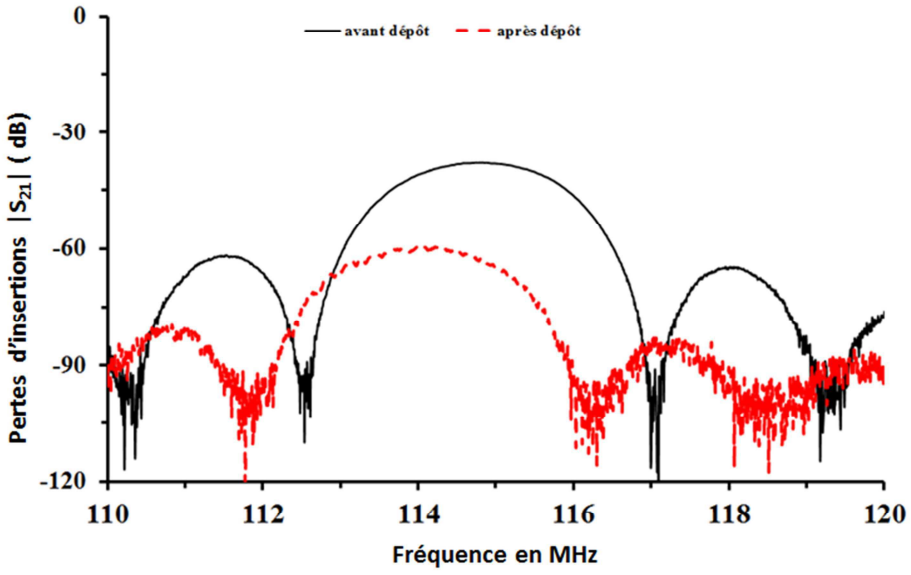


(a)

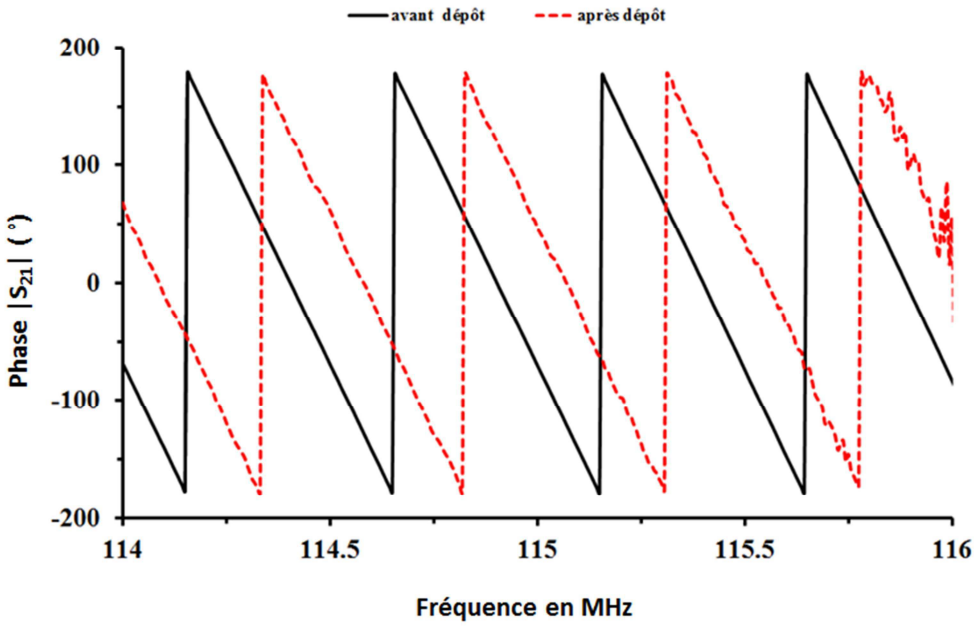


(b)

Fig. 3-7: Réponse fréquentielle en transmission S_{21} avant et après dépôt de la couche de MIP-ACN (200 nm) du capteur r26b06, a) gain, b) phase



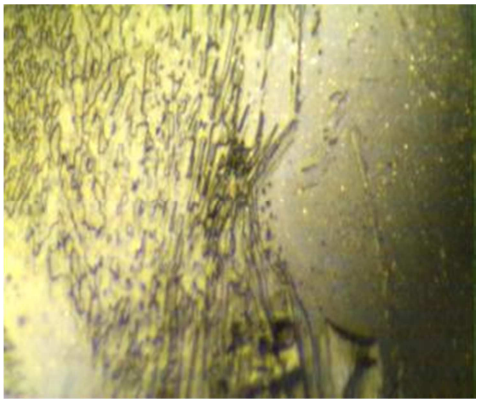
(a)



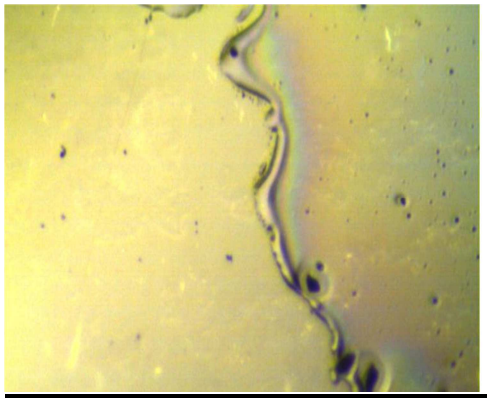
(b)

Fig. 3-8: Réponse fréquentielle en transmission S_{21} avant et après dépôt de la couche MIP-ACN (6 µm) du capteur r22 a04, a) gain, b) phase

3.3.2.3 Influence de la quantité de solvant porogène sur les dépôts en couches minces



(a)



(b)

Fig. 3-9: Image par profilomètre à stylet du film mince de NIP-ACN, a) avant diminution, b) après diminution de la quantité du solvant porogène

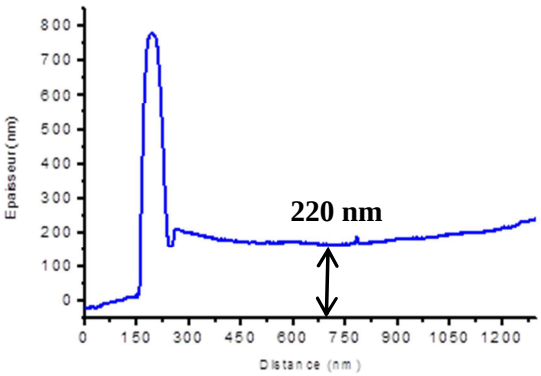
Les couches minces de NIP-ACN obtenues sont pour la plupart non homogènes sur la zone de dépôt du polymère. Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 3-9a, un grand nombre de petits amas, suivi de vide, sont visibles à la surface du capteur, le polymère ne recouvrant pas toute la zone. Nous avions déjà rencontré ce problème sur quelques cas, lors des tests préliminaires sur les lames de verres. Néanmoins ce phénomène est plus récurent pour les dispositifs à ondes acoustiques.

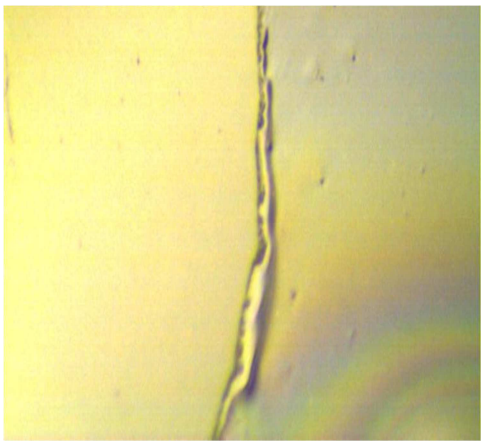
Par ailleurs, la composition de notre solution prépolymérisée étant celle utilisée pour la synthèse de NIP sous format monolithique (Bulk), elle conduit à un faible contrôle de la porosité en couche mince. En effet, comme nous l'avions décrit au Chapitre 1, le pourcentage total en solvant porogène dans le mélange de polymérisation constitue un paramètre primordial qui permet de déterminer les caractéristiques du réseau poreux, et donc celle de la taille et du volume des pores. Ce paramètre nécessitait donc un ajustement pour obtenir un matériau avec une distribution poreuse adéquate. Pour cela nous avons divisé par deux la quantité de solvant (volume initial = 2mL, volume actuel = 1mL) dans la composition du mélange réactionnel (cf. Tab. 2-2). Cette diminution de la quantité de solvant porogène nous a permis d'obtenir des dépôts avec une distribution poreuse homogène (voir *Fig. 3-9*b).

3.3.2.4 Profilométrie mécanique

La Figure 3-10 présente l'épaisseur du film mince de NIP-ACN réalisée, mesurée avec un profilomètre à stylet. Le film présente une épaisseur d'environ 200 nm avec une bonne

homogénéité. On peut néanmoins remarquer des effets de bords liés à l'utilisation du Kapton malgré son retrait directement après le dépôt de la solution. Nous avons considéré que l'effet de cette surépaisseur localisée, étant donnée sa largeur de quelques dizaines de nanomètres par rapport à la longueur d'onde de 40 µm de la ligne à retard, était négligeable en première approximation sur la réponse du dispositif.





(a) **(b)**

Fig. 3-10: Caractérisation par profilométrie mécanique a) profil du bord de la couche mince de NIP-ACN (220 nm) sur le capteur, b) image de surface (zoom : 600x)

3.4 Elaboration et caractérisation de la couche sensible de MIP/NIP-DMSO

Comme mentionné en introduction générale, les polymères à empreintes moléculaires sont utilisés dans de nombreux travaux comme couche sensible comportant des sites de reconnaissance spécifique d'espèces ciblées. La mise au point du procédé de dépôt reproductible en couche mince de NIP-ACN sur les capteurs à ondes acoustiques nous a permis de proposer un protocole de dépôt en couches minces en adaptant le protocole de dépôt sous format bulk.

L'objectif final étant d'imprimer et de détecter des nucléosides modifiés urinaires par une approche de type « Capteur », et les nucléosides modifiés urinaires ainsi que le MIP correspondant étant en cours de réalisation, nous nous sommes orientés vers le dépôt d'un MIP commercial visant la détection d'un nucléotide (AMP : adénosine monophosphate). Cette étape avec une cible commerciale disponible visait à évaluer le comportement du capteur ainsi équipé et d'étudier les phases d'extraction et de recapture de la molécule

empreinte, constituant la phase clé de la faisabilité du capteur. Pour mener à bien cette étude, nous avons été amenés à modifier la formulation de la solution, avec le choix d'un nouveau solvant porogène (DMSO en remplacement de l'ACN) et l'ajout d'un co-monomère, ce qui a nécessité une nouvelle adaptation des paramètres de dépôt afin d'obtenir les épaisseurs escomptées (environ 200 nm).

3.4.1 La molécule empreinte

Comme nous venons de le mentionner, le choix de la molécule empreinte s'est donc porté sur un nucléotide : l'adénosine-5-monophosphate. Les nucléotides sont des molécules essentielles qui constituent les unités de base dans les acides nucléiques. Les nucléotides et nucléosides forment une famille de molécules impliquées dans la communication intercellulaire. De nombreux exemples de MIPs employant des bases nucléotides ont été reportés dans la littérature [147] [148] [149].

La structure générale de la molécule d'adénosine monophosphate est schématisée sur la Figure 3-11. Cette molécule est constituée d'un sucre à cinq carbones (ribose), de l'une des 5 bases azotées (l'adénine pour l'AMP) et la liaison d'un groupement phosphate.

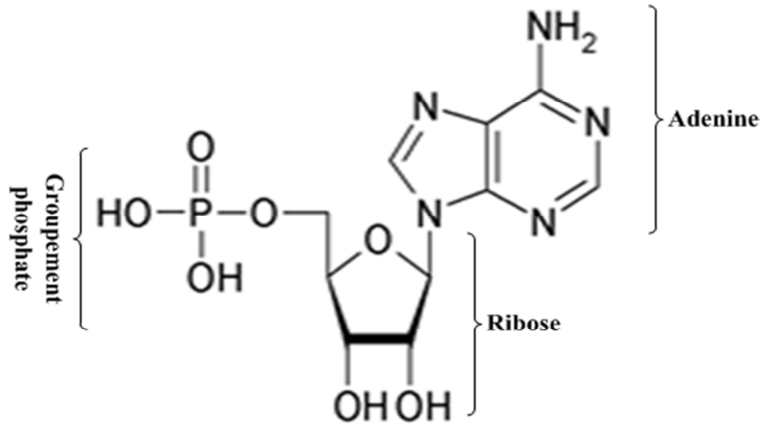


Fig. 3-11: Schéma et structure générale de l'adénosine monophosphate

3.4.2 Préparation de la solution prépolymérisée

Le choix du monomère fonctionnel est un facteur clé dans la formulation du polymère, car c'est lui qui interagit fortement avec les fonctions chimiques de la molécule empreinte. L'acrylamide (AA) a été conservé comme monomère car c'est l'un des meilleurs monomères fonctionnels qui permet de complexer par liaisons hydrogène les nucléobases et les riboses. Afin d'obtenir une bonne sélectivité, un autre monomère (co-monomère) a été introduit dans la formulation de la solution, le 2-diméthylamino-éthyl-méthacrylate (DMAEM) pour créer

des liaisons ioniques avec le groupement phosphate de l'AMP. L'utilisation de l'EGDMA étant très courante dans nombre de travaux de publications, il été sélectionné à nouveau comme réticulant. Le choix du solvant porogène s'est porté sur le DMSO comme solvant organique capable de solubiliser la molécule d'AMP, d'où la notation MIP/NIP-DMSO. Enfin nous avons repris l'AIBN comme initiateur en quantité molaire égale à 1% mol de la somme des quantités molaires de réticulant, de monomère fonctionnel et de template. Le polymère non imprimé (NIP-DMSO) a été synthétisé dans les mêmes conditions mais sans l'ajout de la molécule empreinte. La constitution de cette solution prépolymérisée pour le MIP-DMSO est synthétisée dans le tableau 3-3.

Tab. 3-3 : Formulation de la composition de la solution prépolymérisée de MIP/NIP-DMSO

Constituants	Fonction	Masse molaire (g/mol)	Densité (g/ml)	Quantité de matière (mmol)	Masse (mg)	Volume (µL)	Equivalence
Acrylamide (AA)	Monomère fonctionnel : (solide)	71	-	0,70	15	-	10 eq
2-(diméthylamino) éthylméthacrylate (DMAEM)	Co-monomère : (liquide)	157	0,934	0,02	3,3	3,5520	1 eq
Ethylène glycol-dimethacrylate (EGDMA)	Réticulant : (liquide)	198	1,1135	3,51	696,4	625	55 eq
Adénosine monophosphate (AMP)*	Template : (solide)	347	-	0,02	7,3	-	1 eq
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Solvant porogène : (liquide)	-	-	-	-	1000	1mL
Azobisisotyrinitrile (AIBN)	Initiateur : (solide)	256	-	0,04	10,8	-	1% ($n_{monomère} + n_{réticulant}$)

3.4.3 Protocoles de dépôt de la couche mince de MIP/NIP-DMSO

Le protocole de dépôt du MIP-DMSO sous forme de couche mince, est synthétisé dans le tableau 3-4:

Tab. 3-4 : Synthèse du protocole de dépôt de MIP/NIP-DMSO sur les dispositifs à ondes acoustiques

Capteurs

(**dimensions** : 24 mm x 15 mm, ép. : 0.1 mm)	
1 –Nettoyage	- Bain piranha (15 min). - Rinçage abondant avec l'eau DI puis séchage à l'azote.
2-Silanisation	- Lavage au solvant de silanisation (toluène) - Silanisation (2% en volume) une nuit à température ambiante. - Stabilisation de la couche par recuit à l'étuve à 200°C pendant 30 min.
3-Dépôt	- Réglage tournette pour 20 µL de solution : - v=1000 à 2000 rpm. - a= 1000 à 4000 rpm/s. - t=10, 20 s.
4-Polymérisation	- Polymérisation UV à 254 nm pendant 1h30 sous atmosphère inerte.

3.4.4 Protocoles d'extraction et de réinsertion de la molécule empreinte

3.4.4.1 L'étape d'extraction de la molécule empreinte

L'étape d'extraction est une étape importante dans la synthèse des matériaux à empreintes moléculaires qui requiert l'optimisation des conditions opératoires afin d'obtenir des taux d'extractions quantitatifs idéaux. Sa mise en œuvre repose sur le système étudié. Le rôle du mélange d'extraction est de favoriser les interactions solvants / molécule empreinte (template) afin de faciliter l'extraction de la cible de la matrice polymérique. En effet, le mélange de solvant choisi doit permettre la rupture des liaisons entre le monomère fonctionnel et la molécule cible, et selon la nature des interactions, plusieurs choix de solvants sont possibles. Cependant, la plupart des interactions mises en jeu sont généralement des liaisons hydrogènes et les solvants utilisés pour l'extraction sont polaires. Les mélanges de solvants les plus rencontrés sont ainsi des mélanges acétonitrile/acide acétique, ou méthanol/acide acétique [12,13]. Dans notre cas, c'est un mélange méthanol/ammoniaque.

Pour la phase d'extraction, nous avons placé le capteur dont la zone sensible est recouverte d'une couche de MIP/NIP dans un bécher (cf. Fig. 3-12) et suivi le protocole suivant.

Ce protocole consiste à préparer la solution d'extraction en mélangeant 4 mL d'ammoniaque (hydroxyde d'ammonium: 37%) dans 70 mL d'eau ultra pure. A ce mélange est ajouté, 30 mL de méthanol. Les substrats sont ensuite immergés dans cette solution pendant toute une nuit dans le réfrigérateur à (+4°). Puis ils sont rincés abondamment avec l'eau ultra pure (4 fois) et lavés au méthanol afin d'éliminer les particules fines du polymère.

Le dispositif est alors récupéré et séché au flux d'azote. Le polymère dépourvu d'empreintes moléculaire (NIP), subit également cette phase d'extraction afin d'éliminer toutes molécules non liées au réseau du polymère.

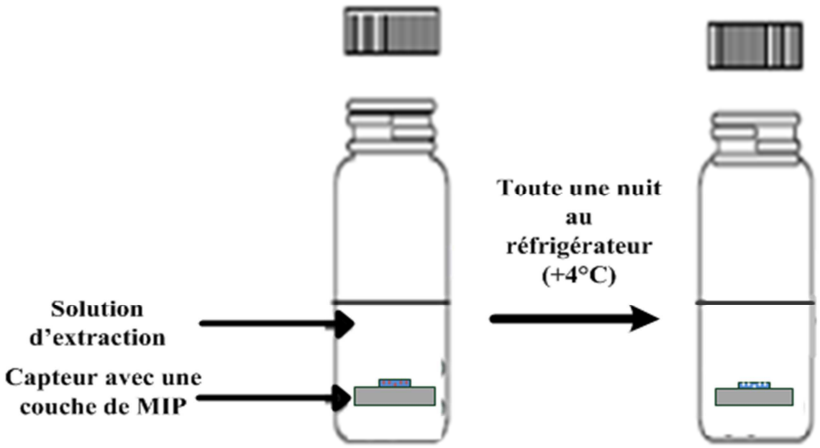


***Fig. 3-12**: Schéma du dispositif utilisé pour l'étape d'extraction*

3.4.4.2 L'étape de réinsertion de la molécule empreinte

L'étape de la recapture de la molécule empreinte a également été réalisée dans des conditions statiques, en l'absence de tout flux continu de solvant.

Elle consiste à placer le capteur recouvert de couche mince de MIP après l'étape d'extraction dans une solution de concentration connue en molécule. Pour notre étude, nous nous limiterons dans un premier temps à une concentration d'empreintes (AMP) égale à 5 mg/L soit 5000 ppm ou encore 14 mM. La même expérience est réalisée avec un polymère non imprimé (NIP).

Les capteurs sont successivement immergés dans les différentes solutions, Le protocole suivi est le suivant :

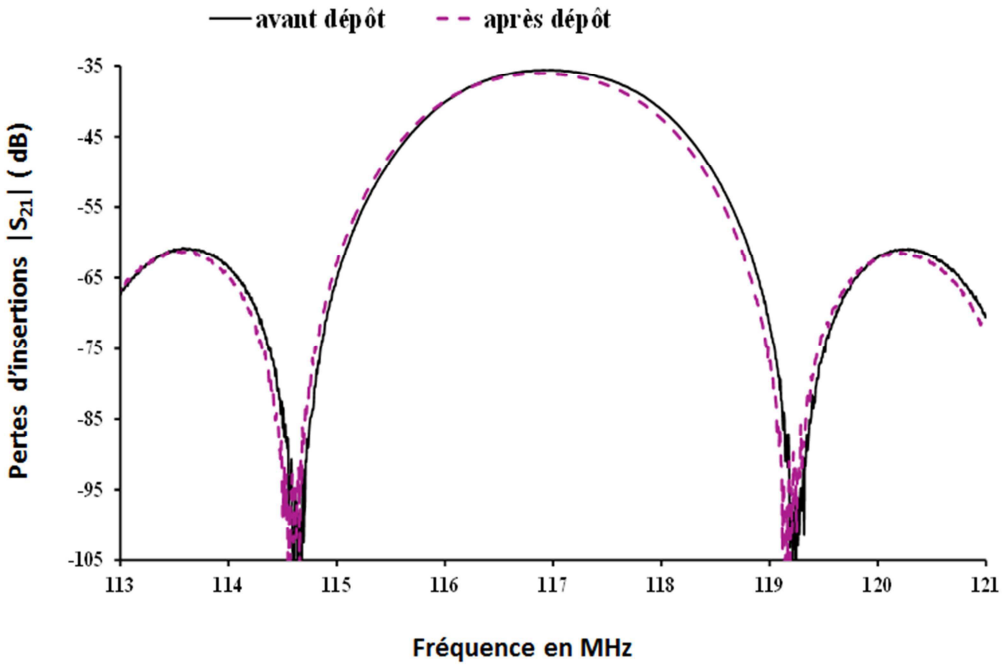
- 1ère étape : solution tampon 1 mL (acide acétique/ hydroxylamine) 1 mM, pH 7
- 2ème étape : solution de nucléotides 1 mL (solution tampon + 5 mg/L de nucléotides)
- 3ème étape : solution tampon 1,5 mL ($AcOH/NH_2OH$), 1 mM, pH7
- 4ème étape : solution de lavage pour éliminer les composants restants 1mL (ammoniaque/méthanol) (70/30 : v/v)

3.4.5 Caractérisation des couches minces de MIP/NIP-DMSO

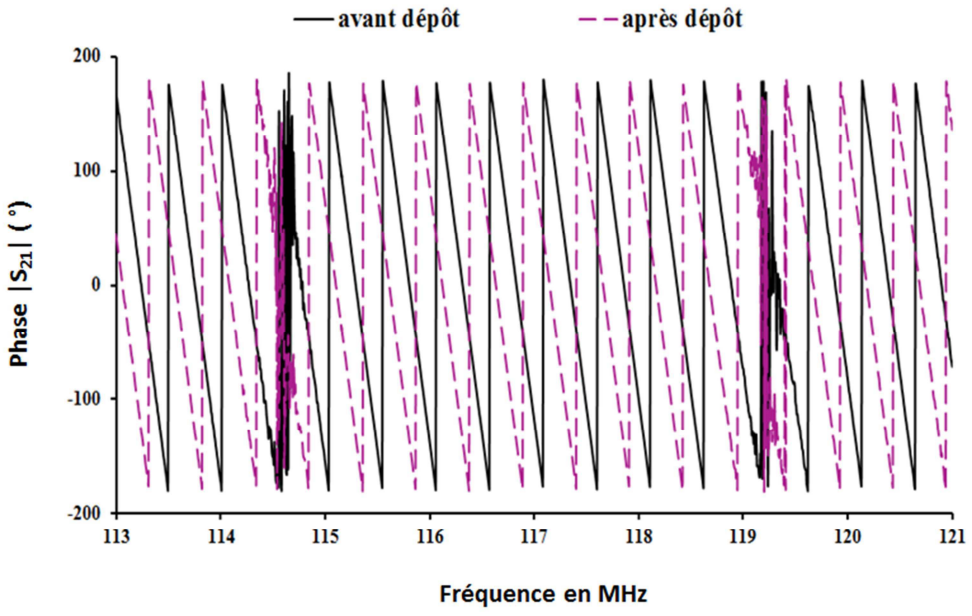
A l'issue des dépôts de ces couches minces, plusieurs voies de caractérisation des films obtenus ont été entreprises. Les différents moyens de caractérisation mis en œuvre, et les résultats obtenus sont exposés ci-dessous.

3.4.5.1 Caractérisation électrique des capteurs à ondes acoustiques à base de MIP/NIP-DMSO

Afin d'étudier l'influence des dépôts de couche mince de MIP/NIP-DMSO, placés sur le chemin sensible du capteur à onde acoustique, la réponse électrique des dispositifs avant et après l'étape de dépôt est relevée à l'analyseur de réseau. La Figure 3-13 montre la réponse en transmission $\mathbf{S_{21}}$ en gain et en phase du capteur avant et après dépôt, pour un polymère imprimé (MIP-DMSO) d'épaisseur 200 nm. Le minimum de pertes d'insertion apparaît à la fréquence 117,5 MHz. Comme pour le dépôt de NIP-ACN, nous observons sur cette figure un faible décalage en fréquence (Fig. 3-13 b) et peu de variation sur le gain maximum (Fig. 3-13 a) et donc pas d'augmentation des pertes d'insertions. Nous pouvons ainsi considérer que le dépôt du film de MIP-DMSO d'épaisseur 200 nm, n'influe que très peu sur la réponse fréquentielle des capteurs, qui restent ainsi adaptés pour une utilisation ultérieure en montage oscillateur, dans le cadre d'un fonctionnement en temps réel.



(a)

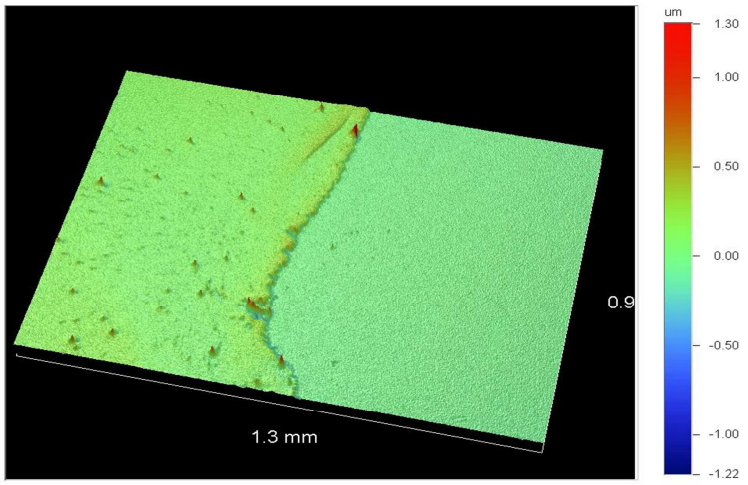


(b)

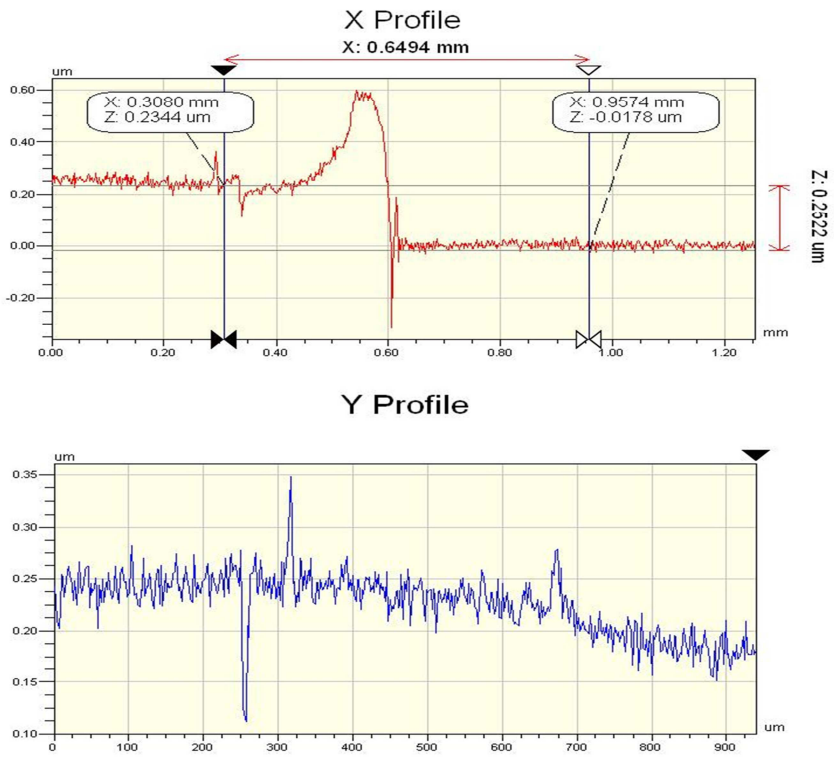
Fig. 3-13: Réponse fréquentielle en transmission S_{21} typique, avant et après dépôt de la couche mince de MIP-DMSO (200nm), a) gain, b) phase

3.4.5.2 Profilométrie mécanique et optique

Les caractéristiques morphologiques et l'état de surface des films minces de MIP-DMSO ont été caractérisés par profilométrie mécanique et optique (Veeco). Les épaisseurs des films minces ont également été systématiquement mesurées par ces deux techniques.



(a)



(b)

Fig. 3-14: Observation par profilométrie optique des films minces de MIP-DMSO (avant extraction), a) image 3 D, b) profil 2 D

Le protocole de dépôt a permis d'obtenir des films de NIP/MIP-DMSO présentant de bonnes caractéristiques. Comme nous pouvons le voir sur la Figure 3-14a, l'utilisation du profilomètre optique (Veeco) permet de visualiser les structures en 3D. L'image obtenue représente une zone de 1,3x0,9 mm^2, au niveau de la bordure des films minces. En outre, cette technique permet, d'estimer l'épaisseur des dépôts (Fig 3-14b, profil X) et l'état de surface (rugosité : cf. Fig**.** 3-14b, profil Y). L'analyse des coupes met ainsi en évidence l'homogénéité du film mince.

3.4.5.3 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique classiquement employée dans l'analyse des surfaces. Elle permet notamment d'étudier la morphologie de la surface (et certaines propriétés chimiques de la plupart des matériaux solides). Cette méthode de caractérisation offre une très grande profondeur de champ et donne des vues qualitatives de l'état des surfaces d'une grande utilité.

L'analyse par microscopie électronique à balayage a été réalisée sur des échantillons de wafer de silicium en utilisant le même procédé de dépôt que pour les capteurs à ondes acoustiques. Ces clichés nous ont permis de visualiser les formes et les tailles réelles des pores des MIPs. L'observation microscopique de la surface des polymères à empreintes moléculaires obtenue dans ces conditions, a révélé la présence d'une structure poreuse avec des sections de pores de dimensions différentes dans les couches minces de MIP (Fig. 3-15 à 3-18).

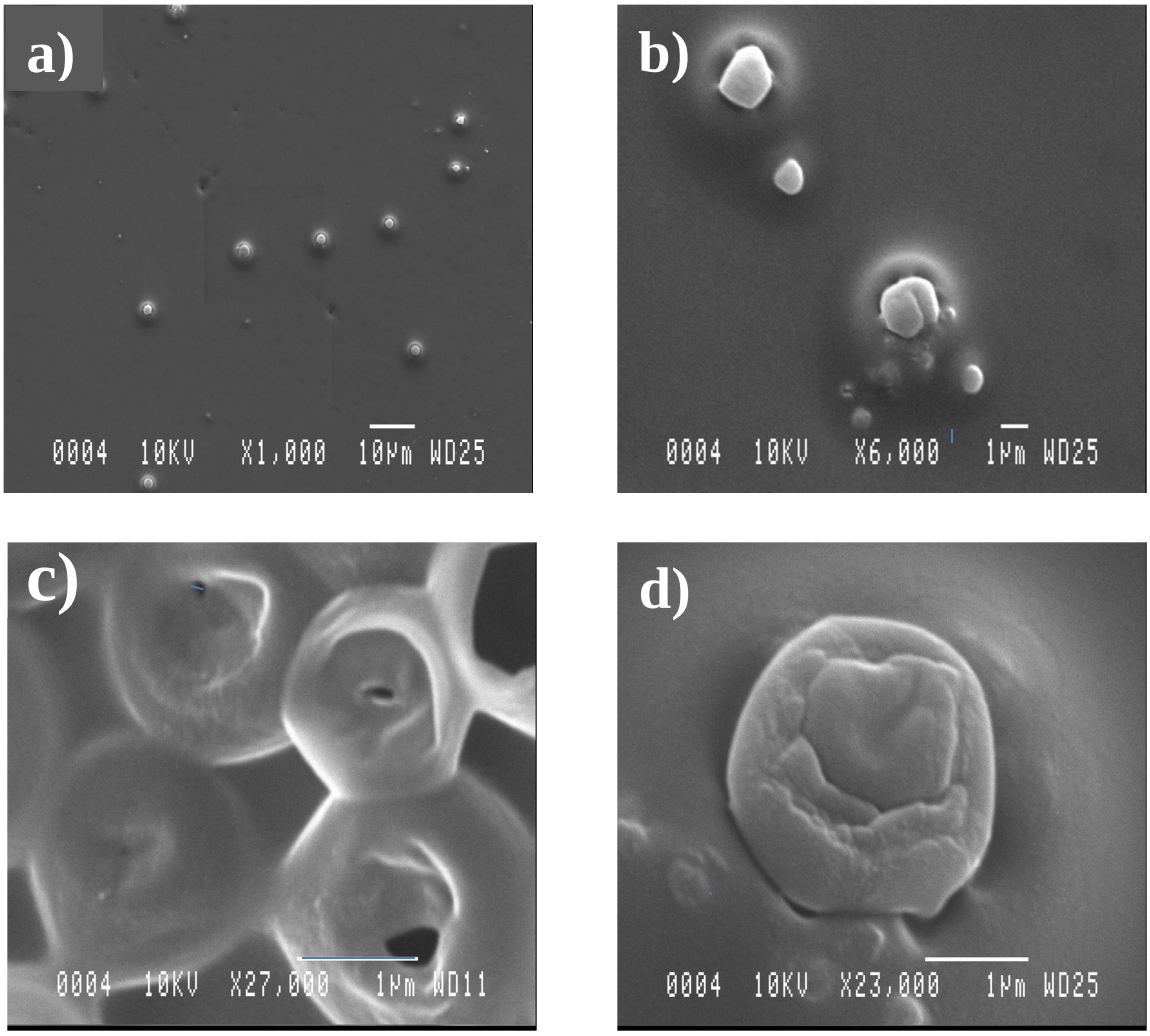
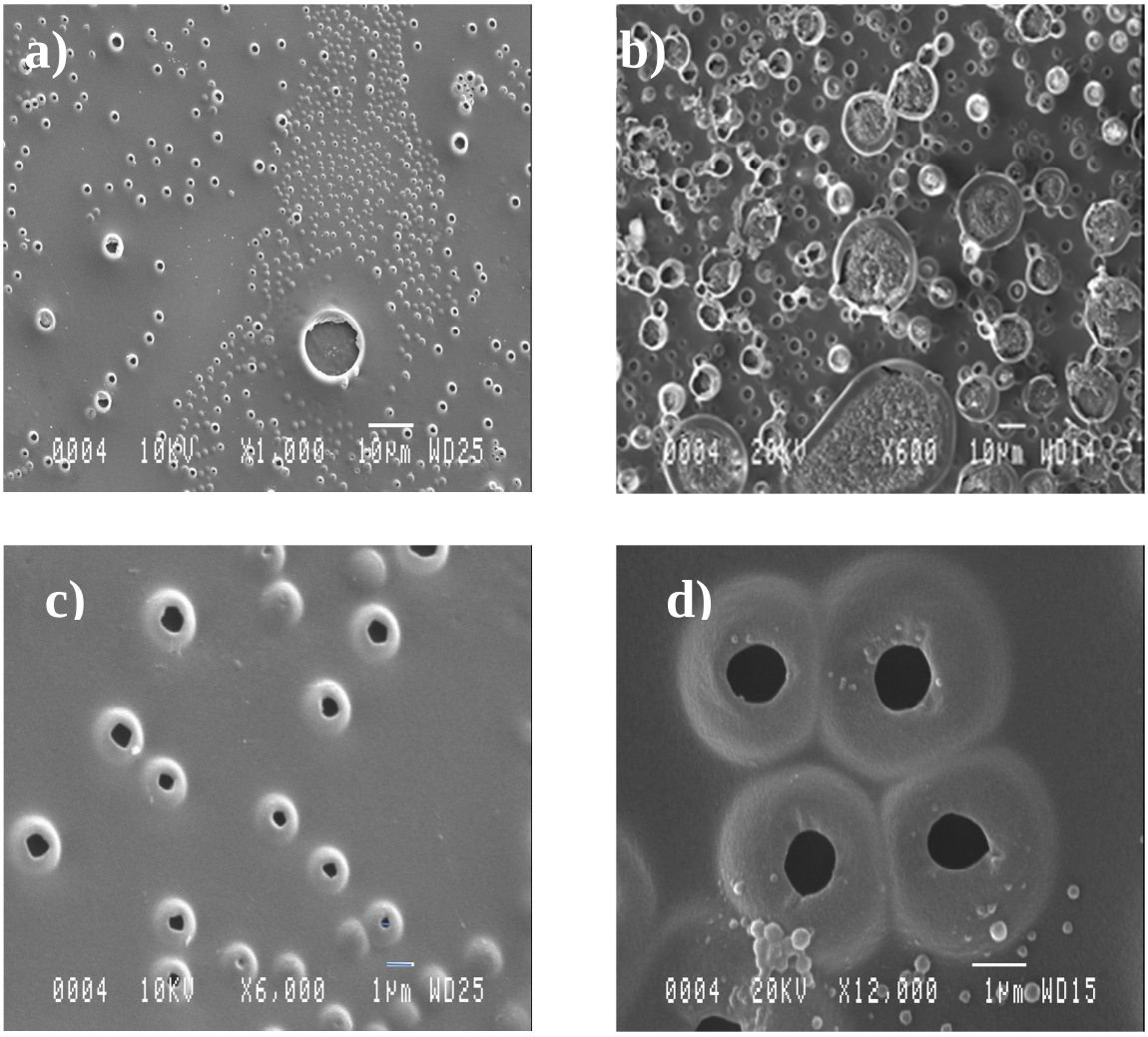


Fig. 3-15: Clichés MEB de couches MIP-DMSO avant extraction de la molécule empreinte en fonction de l'épaisseur : a) et c) 1 µm, b) et d) 400 nm

L'analyse par microscopie électronique à balayage (MEB) avant l'étape d'extraction montre des échantillons possédant une faible distribution poreuse (Cf. Fig. 3-15a et 3-15b). Sur les clichés Fig. 3-15b et 3-15d, l'aspect obtenu semble représenter la molécule empreinte encore fixée aux pores spécifiques de la matrice polymérique



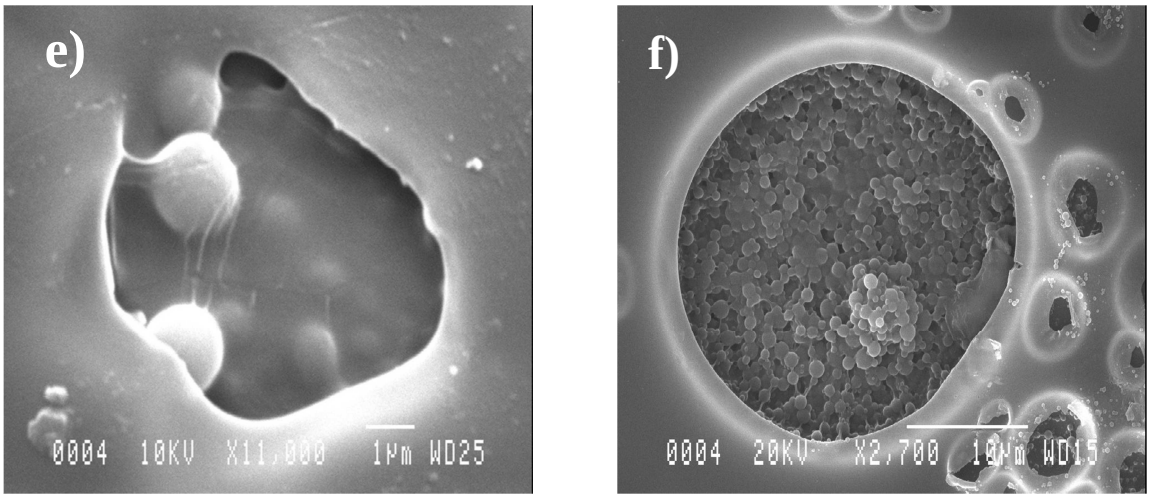


Fig. 3-16: Clichés MEB de couches MIP-DMSO après extraction de la molécule empreinte, en fonction de l'épaisseur : a, c et e) 200 nm, b, d et f) 1,4 µm

Comme nous pouvons l'observer sur les clichés de la Fig. 3-16 (a, b, c, d, e, f), les dépôts de MIP-DMSO après l'étape d'extraction de molécule empreinte (*template)*, réalisée selon le protocole proposé précédemment (§ 3.4.4), montrent une certaine variation dans la forme et le diamètre des pores pour un même film de polymère. En comparaison avec les images avant extraction, sur ces clichés nous observons une distribution poreuse beaucoup plus importante. Les Figures 3-16a et 3-16b, montrent que le film après extraction présente une densité et une distribution macroporeuse caractéristiques du diméthylsulfoxide (DMSO) qui est un solvant à faible pouvoir solvatant générant des mésopores et des macropores [139]. De plus nous avons observé que la morphologie des films (taille et densité poreuse) varie en fonction de leur épaisseur (Cf. Fig. 3-16 c, d, e, f). En effet, nous observons clairement la présence de pores plus importants en taille et en densité pour les films d'épaisseur 1,4 µm comparé aux films plus minces d'épaisseur 200 nm.

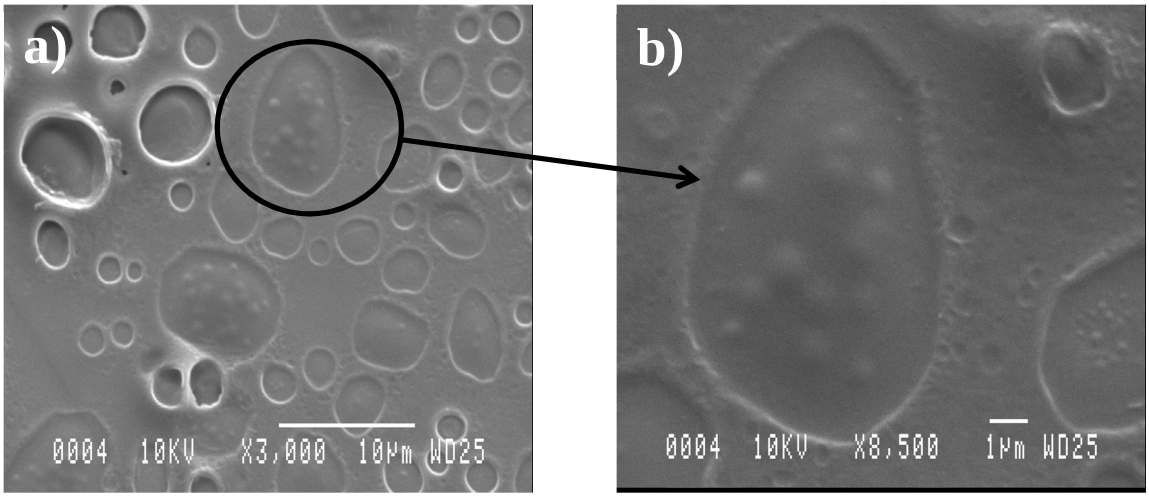


Fig. 3-17: Clichés MEB de couches MIP-DMSO après recapture de la molécule empreinte

Les clichés présentés en Figure 3-17a et3-17b, correspondent aux échantillons de MIP-DMSO après l'étape de réinsertion des molécules empreintes. L'analyse de ces photos révèle que les pores semblent remplis de nouveau car on observe une coque qui recouvre les pores, comme attendu après la recapture des molécules empreintes.

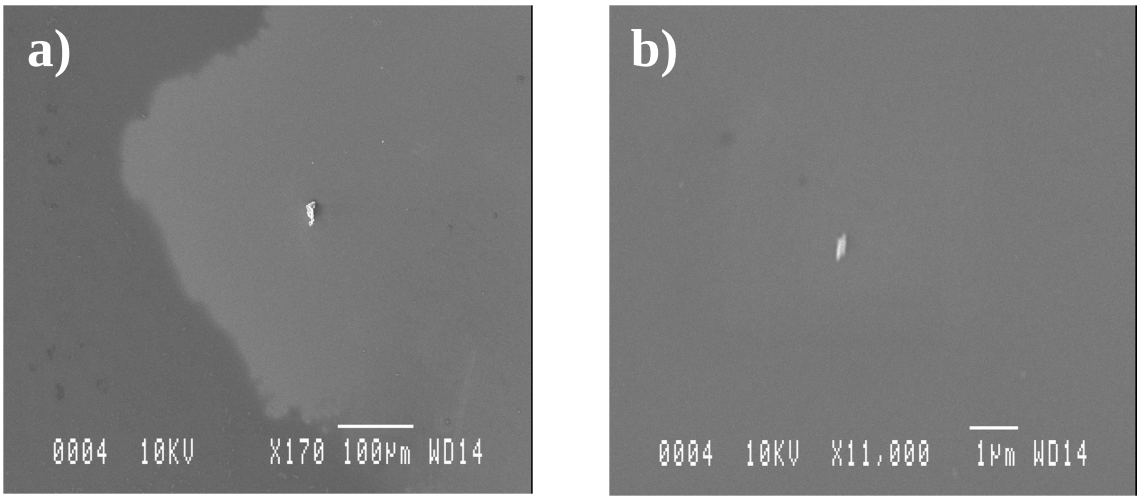


Fig. 3-18: Clichés MEB de couches minces de NIP-DMSO : a) bord du film de NIP-DMSO, b) sur la couche de NIP-DMSO

Les images MEB réalisées pour les couches minces de NIP-DMSO sont présentées sur la Figure 3-18. Ces images manquent de netteté, en raison de l'homogénéité du dépôt qui ne possède aucune aspérité sur laquelle faire la mise au point. Le film obtenu est parfaitement lisse et homogène.

3.5 Conclusion

Ce chapitre a exposé l'élaboration d'un procédé de dépôt par centrifugation de polymères à empreintes moléculaires sous forme de films minces sur des capteurs à ondes acoustiques. Ainsi, le protocole utilisé précédemment pour le dépôt de NIP-ACN a été adapté au dépôt de MIP commercial visant la détection d'un nucléotide (AMP : adénosine monophosphate) notamment en utilisant le diméthylsulfoxide comme porogène.

Les caractérisations électriques des dispositifs à ondes de Love recouverts de ces couches minces de MIP-DMSO et NIP-DMSO, ont été effectuées au moyen d'un analyseur de réseau. Ces résultats de caractérisation présentent des niveaux de pertes compatibles avec notre application, et ainsi valide la faisabilité et l'efficacité du couplage entre les dispositifs à ondes acoustiques et les polymères à empreintes moléculaires. Le ratio du solvant déterminant

la porosité résultante de polymère a été étudiée afin de comprendre l'apport dans la structure poreuse du polymère à empreinte moléculaire et modifiée pour obtenir une porosité adéquate.

De plus, l'étude de la morphologie et de l'état de surface des films de MIP/NIP-DMSO a été réalisée par imagerie MEB. Ces images ont permis d'évaluer la porosité des films minces et d'apprécier les différences de morphologie du MIP entre les étapes précédant et suivant l'extraction et la recapture de la molécule empreinte.

L'étape suivante consiste à mettre en évidence la formation d'empreinte moléculaire et d'étudier la morphologie de ces couches minces de MIP/NIP-DMSO en réalisant des caractérisations sous gaz. Cela fera l'objet du prochain chapitre.

4 Application à la détection de gaz

4.1 Introduction

Nous avons vu aux chapitres précédents, l'élaboration et la caractérisation de couches minces de MIP/NIP couplées aux capteurs à onde de Love. Pour réaliser ces couches minces homogènes de polymères, une méthode de dépôt par centrifugation a été mise au point.

Ce chapitre est consacré aux caractérisations sous gaz de dispositifs à ondes de Love à base de polymères non imprimés (NIP-ACN/DMSO) et imprimés (MIP-DMSO). Le banc de test comportant la cellule de test et le générateur de gaz sont présentés. Les capteurs équipés de ces MIPs/NIPs déposés en couches minces homogènes uniquement sur le chemin de propagation de l'onde acoustique, ont été soumis à des mesures de détection en milieux gazeux (toluène et éthanol) pour étudier dans un premier temps leurs propriétés structurales telles que la porosité, la surface spécifique, et dans un second temps la reformation de la rupture des liaisons entre molécule d'intérêt et le MIP.

Par ailleurs, les résultats expérimentaux obtenus avec les capteurs équipés de ces couches minces de MIPs/NIPs sont comparés aux résultats obtenus au cours des travaux antérieurs avec des capteurs recouverts de films minces mésoporeux.

4.2 Banc de test

4.2.1 Cellule de test

Une cellule de test [6] a été mise en œuvre afin de réaliser des tests en milieux gazeux et ultérieurement en milieu liquide. Elle est représentée sur la Figure 4-1.

Les lignes à retard dont le chemin acoustique est recouvert de films minces de matériaux à empreintes moléculaires (MIP/NIP-DMSO), sont placées directement sur la partie inférieure de la cellule de test, qui comporte trois éléments encastrables:

- l'élément inférieur sur lequel est positionnée la ligne à retard
- l'élément intermédiaire constitué de pointes de touche à ressort qui sont au contact avec les plots de connexion du capteur. Ces pointes sont reliées à des connecteurs radiofréquences de type SMB. Les deux parties inférieures sont en laiton.

- l'élément supérieur est en inox pour l'utilisation en milieu gazeux avec deux ouvertures de 6 mm de diamètre pour la circulation du gaz et comporte également un joint permettant d'assurer l'étanchéité de la cellule.

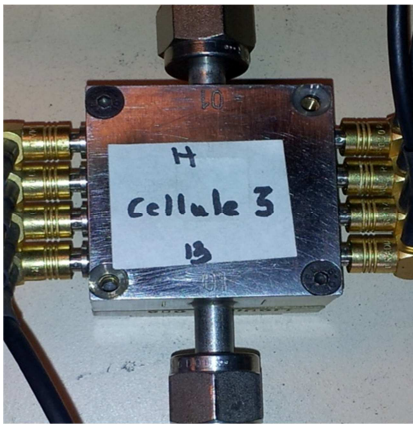


Fig. 4-1: Cellule de test

4.2.2 Electronique de conditionnement

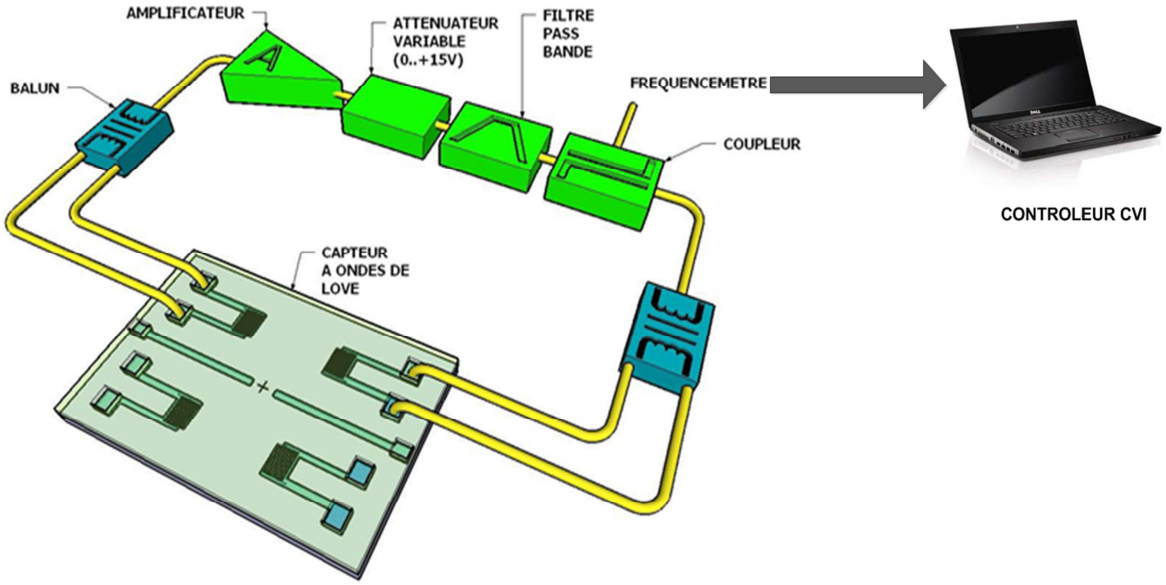


Fig. 4-2: Schéma du montage en oscillateur d'une ligne à retard[48]

La ligne à retard, placée dans la cellule de test décrite précédemment, est connectée dans la chaîne de rétroaction d'un amplificateur (Cf. Fig. 4-2), formant ainsi un oscillateur, qui permet de convertir en temps réel, les variations de vitesse de propagation de l'onde acoustique dues à l'action de paramètres extérieurs en variations de fréquences. Le signal à la sortie de la ligne à retard est amplifié avec une chaîne amplificatrice faible bruit, atténué de

manière variable et filtré. Un coupleur permet de prélever une partie de ce signal pour en mesurer la fréquence à l'aide d'un fréquencemètre (Agilent Technologies, HP53132A, 255 MHz Universal Counter) à base de temps thermostatée. La fréquence de fonctionnement du dispositif est proche de 118 MHz. La stabilité à court-terme de l'oscillateur est de l'ordre de 1 Hz/s.

Les conditions d'oscillation sont déterminées par les équations de Barkhausen en gain et en phase :

$$G_{ligneàretard} + G_{amplificateur} + G_{autresélèments} = 0dB \qquad (4\text{-}1)$$

$$2\pi f_o \frac{L_{cc}}{V_p} + 2\Phi_{IDT} + \Phi_E = 2\pi n \qquad 4\text{-}2)$$

Avec :

- $2\pi f_o \frac{L_{cc}}{V_p}$: déphasage introduit par la ligne à retard (f_0 : fréquence d'oscillation, *Lcc* : distance centre à centre des transducteurs et V_P : vitesse de phase de l'onde de Love),
- Φ_{IDT} : déphasage introduit par un transducteur,
- Φ_E : déphasage introduit par la chaîne amplificatrice,
- n : entier naturel.

Le gain de l'amplificateur doit être supérieur aux pertes introduites par la ligne à retard (eq 4-2). Un gain de boucle voisin de l'unité assure une oscillation harmonique (eq 4-1). Pour plus de détails concernant l'électronique de conditionnement le lecteur pourra se référer aux travaux de thèse de N. Moll [63].

4.2.3 Générateur de vapeurs

Au laboratoire IMS, les vapeurs de gaz appliquées aux capteurs, sont générées par un équipement développé par la société Calibrage (voir photographie en Fig. 4-3 et schéma du principe en Fig. 4-4). Il est composé d'un four qui assure la génération d'une vapeur à concentration et à débit donnés et d'un étage de dilution permettant de régler la concentration de la vapeur dans un gaz porteur (l'azote) et enfin d'un étage de régulation du débit. L'appareil est piloté par l'intermédiaire d'un automate programmable, permettant la génération de séquences d'échelons de concentrations programmées par un pupitre de commande.

Le four chauffe un cylindre (saturateur) rempli du polluant désiré (éthanol et toluène), en phase liquide, balayé par un flux de gaz porteur (azote) à débit constant. La concentration

de gaz ainsi générée est fixée par la température du four. L'azote permet de disposer d'une concentration variable de gaz en sortie du four, en diluant une partie du gaz grâce à l'étage de dilution. Ainsi, en ajustant la quantité d'azote, la concentration finale en polluant est maîtrisée. Le dernier étage permet d'obtenir un débit fixe [150].

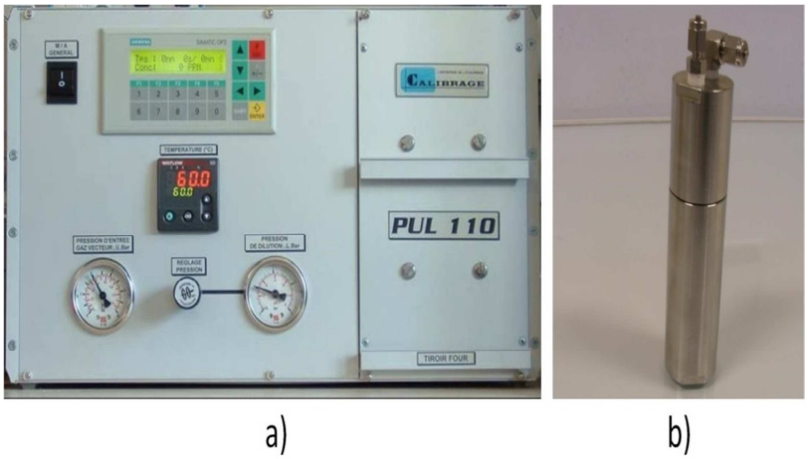


Fig. 4-3: a) Photographie du générateur de vapeur de type PUL110, b) saturateur

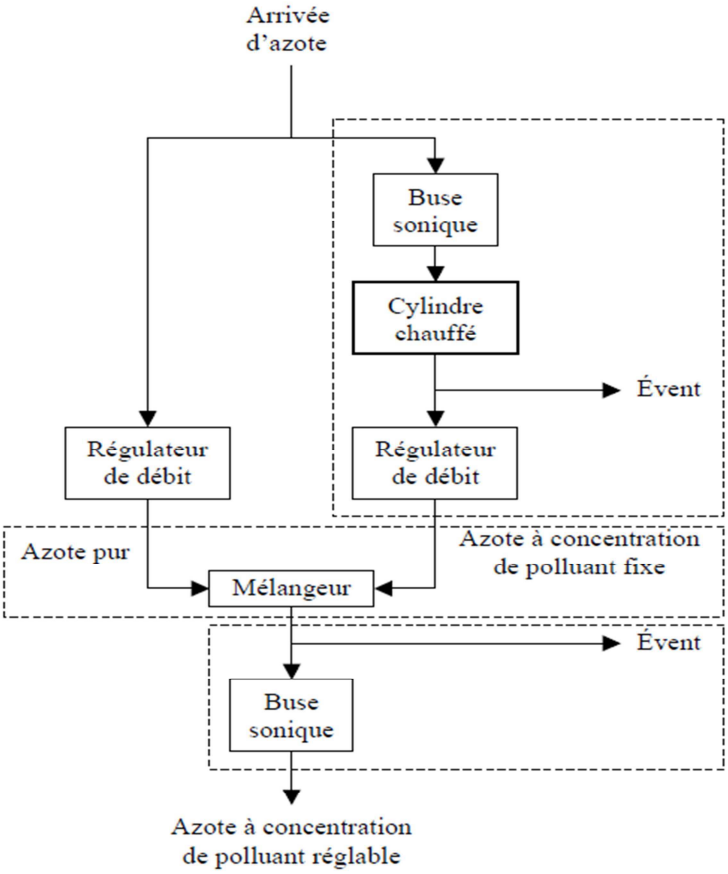


Fig. 4-4: Schéma de principe du générateur de vapeurs [150]

4.3 Validation sur polymère non imprimé

Dans l'objectif de déterminer les propriétés mécaniques des films minces de NIP-ACN (porosité, surface spécifique), une série de mesures de détections de composés gazeux volatiles (COV) a été réalisé. Lors de ces tests, les dispositifs à ondes de Love sont montés dans la cellule de test en configuration oscillateur. Ils sont alors exposés aux séquences de concentrations d'éthanol et de toluène afin de vérifier leur sensibilité et observer la dynamique de réponse. Les variations de fréquence de résonance des capteurs par rapport à la variation de concentration considérée sont mesurées. Ces tests ont été conduits avec un débit total de 0,1 $L.min^{-1}$, sous azote. La séquence des paliers de concentration d'éthanol et de toluène typiquement utilisée, est détaillée dans le tableau 4-1. Chaque palier dure 20 minutes, permettant ainsi au régime permanent de s'établir.

L'unité ppm signifie partie par million, c'est-à-dire que l'on a 1 molécule polluante parmi un total d'un million de molécules. La conversion de la concentration en mg/m^3 vers les ppm molaires est donnée par l'équation (4-3) :

$$C_g\left(ppm\right) = \frac{C_g\left(mg/m^3\right)\times V_M}{M_g} \tag{4-3}$$

Avec :

- C_g : concentration du gaz,
- V_M : volume molaire du gaz
- M_g : masse molaire du gaz.

Tab. 4-1 : Séquences de concentration des vapeurs d'éthanol et de toluène

Paliers	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Toluène / Ethanol (mg/m^3)	30	1000	30	2000	30	3000	30	4000	30
Toluène (ppm)	8	265	8	531	8	797	8	1063	8
Ethanol (ppm)	16	531	16	1063	16	1594	16	2126	16

Les résultats typiquement obtenus sont représentés en suivant.

4.3.1 Résultats sous COV avec les couches minces de NIP-ACN

La Figure 4-5 présente les réponses en fréquence enregistrées en temps réel, d'un dispositif à ondes de Love muni d'une couche de NIP-ACN d'épaisseur 200 nm et d'un capteur sans couche sensible utilisé comme référence, soumis à différentes concentrations de toluène et d'éthanol.

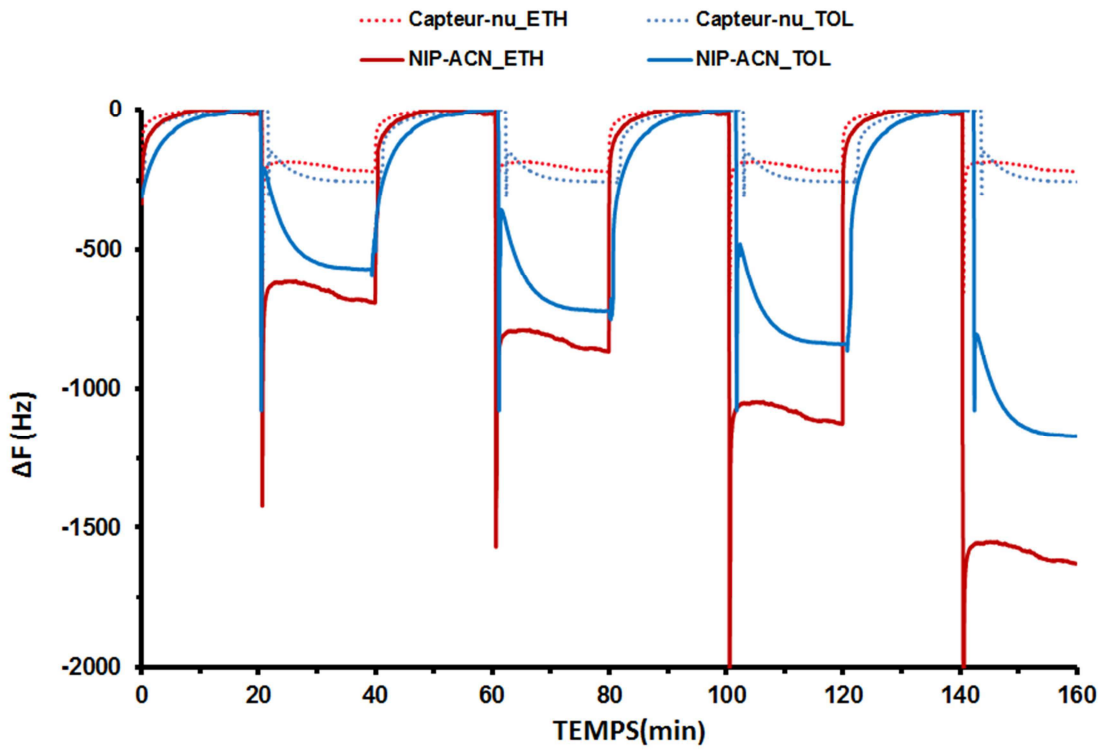


Fig. 4-5: Comparaison des variations de fréquence typiques en temps réel d'un capteur avec une couche sensible de NIP-ACN et d'un capteur nu, soumis à différentes concentrations de toluène et d'éthanol

Les courbes de cette figure montrent que la présence de gaz induit une variation quasi-instantanée de la fréquence d'oscillation des capteurs, suivie d'un état stable après quelques secondes. Cette diminution de fréquence est en cohérence avec l'ajout de masse sur la zone sensible du dispositif à onde de Love dû à l'adsorption du gaz dans la structure poreuse du film mince de NIP-ACN.

Nous avons constaté que ces variations de fréquences, liées à l'adsorption des molécules de COV à la surface des pores du film de NIP-ACN, sont plus importantes pour l'éthanol que pour le toluène. Cette différence de l'énergie d'interaction de la surface du film de NIP-ACN avec les polluants, a été attribuée à la force de la liaison physico-chimique des molécules d'éthanol et de toluène avec la surface poreuse [151]. La matrice polymérique est

majoritairement constituée par le réticulant (EGDMA) qui possède des groupements carbonyles. La partie alcool de la molécule d'éthanol interagit fortement avec ces groupements carbonyles à la surface des pores du polymère en formant des liaisons hydrogènes tandis que l'interaction du toluène et des pores est principalement due aux électrons de sa liaison π. D'autre part, l'encombrement stérique de la molécule de toluène est plus important que celui de la molécule d'éthanol, ce qui augmente la probabilité de sorption de cette dernière. En ce qui concerne la désorption, l'immobilisation stérique de la molécule de toluène semble être la raison principale de la différence de temps de désorption observée.

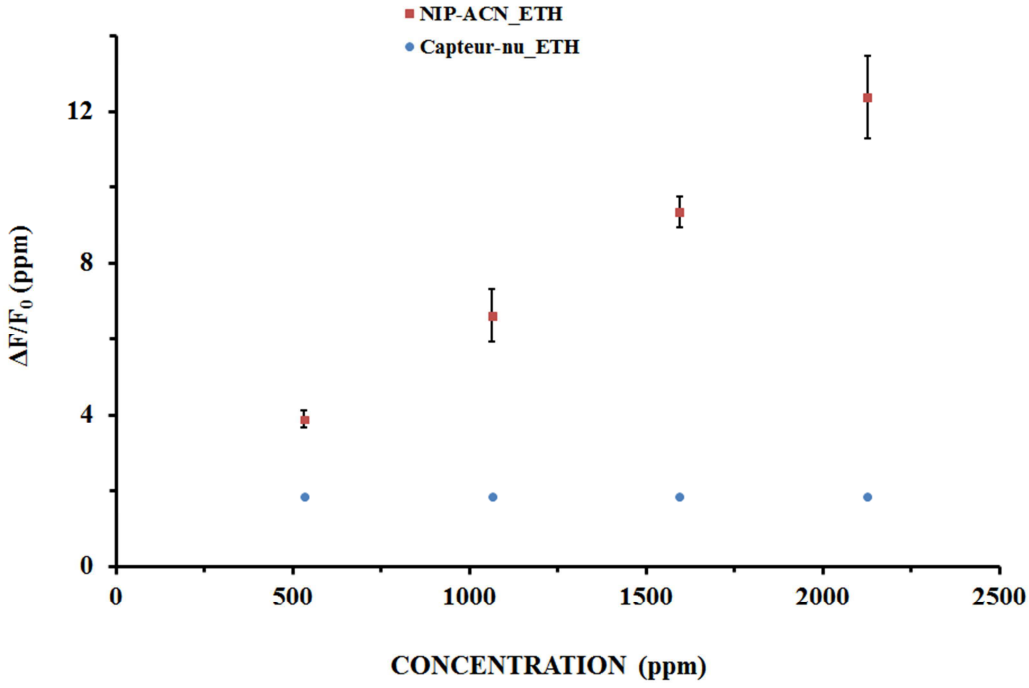


Fig. 4-6: Variations de fréquence en régime permanent de capteurs avec une couche mince de NIP-ACN (200 nm) soumis à différentes concentrations d'éthanol et reproductibilité des résultats. Les valeurs moyennes et les barres d'erreur ont été calculées à partir de 4 expériences avec différentes lignes à retard

Les réponses du dispositif de référence (capteur nu) montrent des variations de fréquence de valeurs assez proches (200 et 250 Hz) pour les deux gaz, quelle que soit la concentration de COV introduite. Comme il pouvait être prévisible, le capteur sans couche sensible présente de plus faibles variations que le capteur avec une couche de NIP-ACN, qui présente une certaine porosité (non spécifique) susceptible d'offrir une surface d'interaction plus grande.

Les résultats de détection de polluants (toluène et éthanol) obtenus avec 4 capteurs équipés de films minces de NIP-ACN ont été comparés entre eux et à ceux obtenus à l'aide de capteurs nus (référence). Les variations relatives de fréquence en régime permanent en fonction de la concentration sont représentées sur les Figures 4-6 et 4-7. Ces graphiques présentent une assez bonne reproductibilité des résultats. De manière générale, l'éthanol induit des variations plus grandes que le toluène (facteur 2 environ).

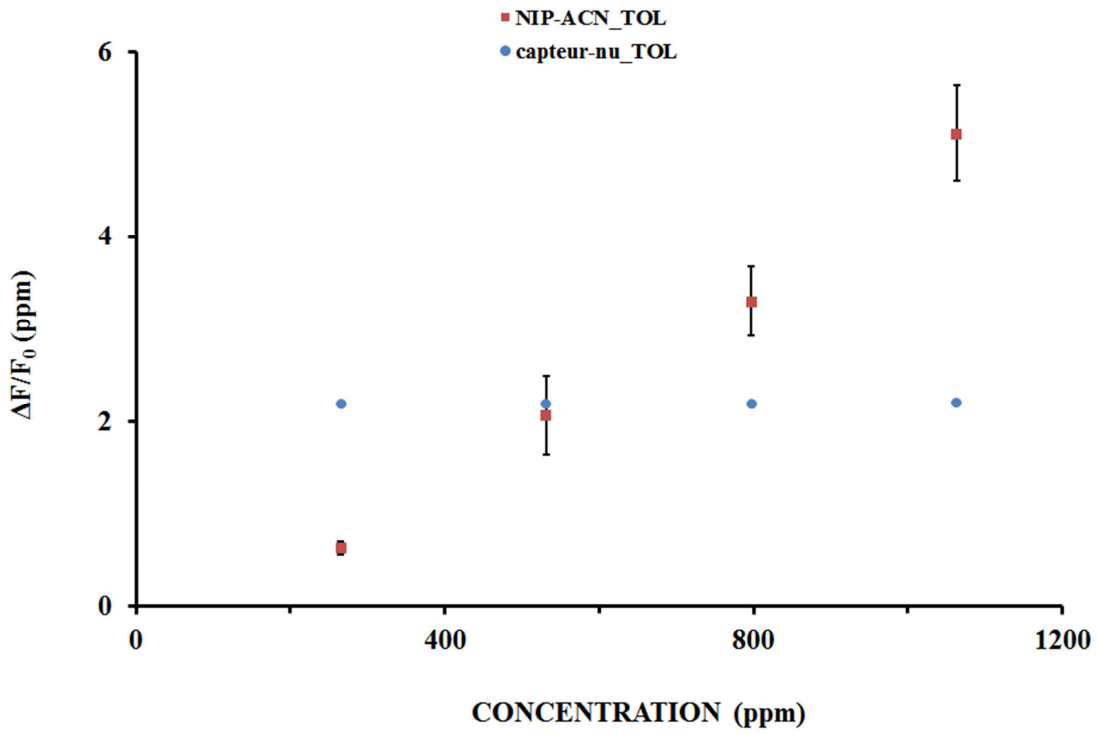


Fig. 4-7: Variations de fréquence en régime permanent de capteurs avec une couche mince de NIP-ACN (200 nm) soumis à différentes concentrations de toluène et reproductibilité des résultats. Les valeurs moyennes et les barres d'erreur ont été calculées à partir de 4 expériences avec différentes lignes à retard

4.3.2 Résultats sous COV avec les couches minces de NIP-DMSO et comparaison avec les couches minces de NIP-ACN

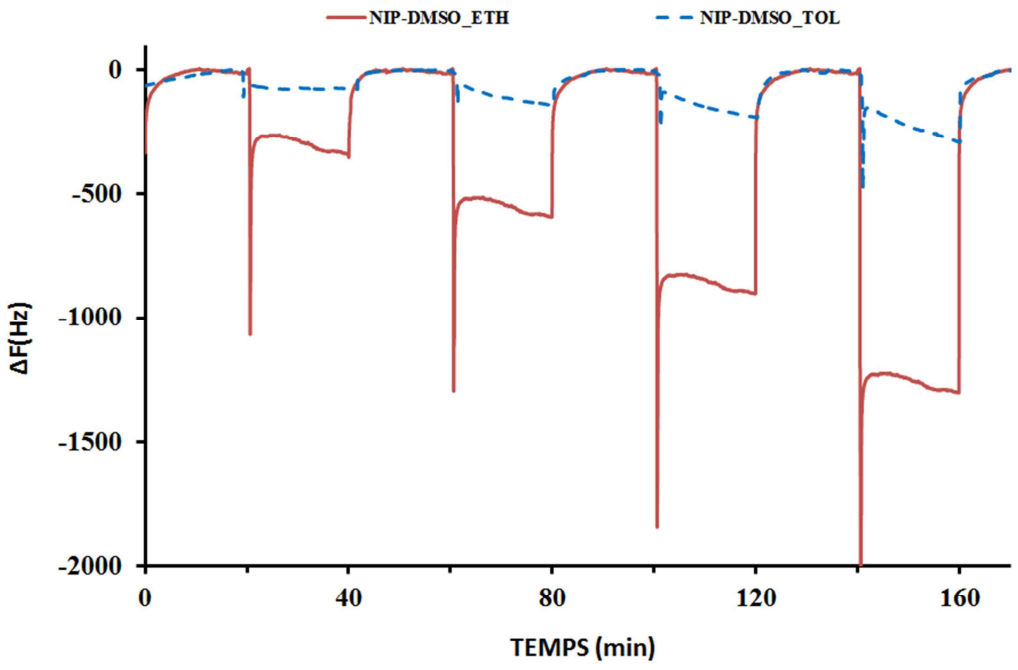
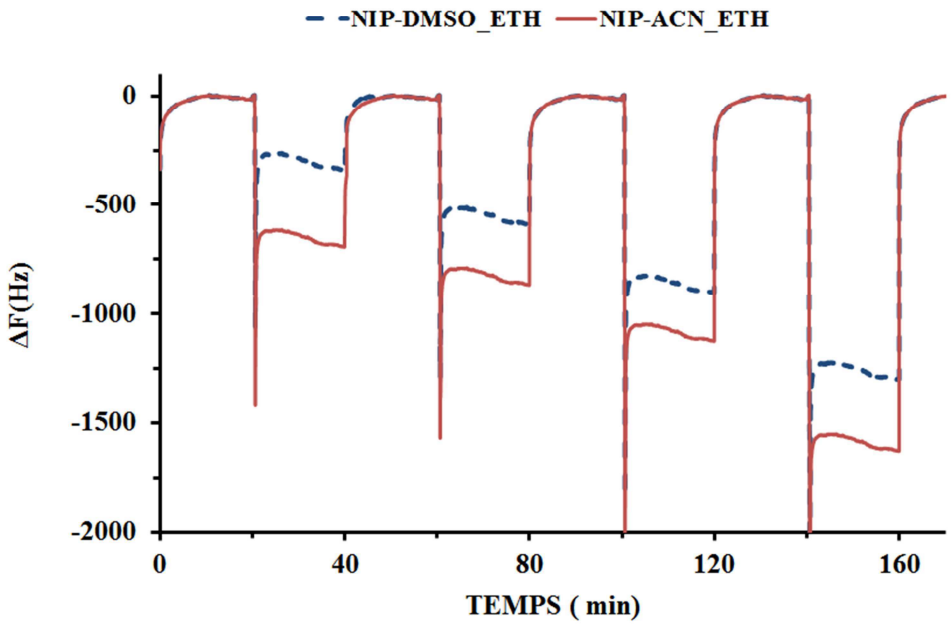
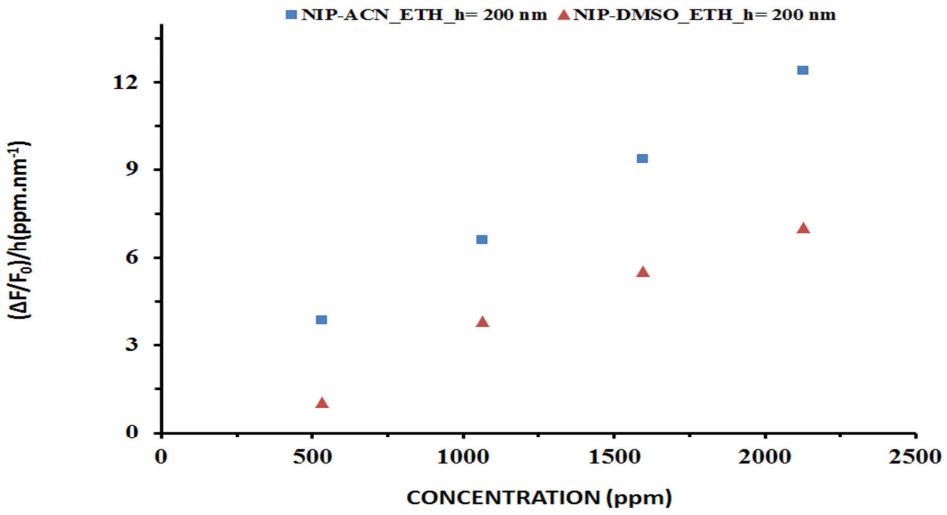


Fig. 4-8 : Variations de fréquence de capteur doté d'une couche mince de NIP-DMSO, exposés à différentes concentrations d'éthanol et de toluène

Suite au changement de solvant porogène détaillé précédemment (Cf. Chapitre 3.4.2), les couches minces de NIP-DMSO ont été également caractérisées sous gaz (éthanol, toluène). La Figure 4-8 présente les réponses en fréquence de l'oscillateur en temps réel. Les résultats font apparaître de nouveau que la détection de COV engendre une variation relative de fréquence dépendant des concentrations introduites. De plus, les variations de fréquence obtenues sous toluène sont de nouveau beaucoup plus faibles que celles obtenues sous éthanol.

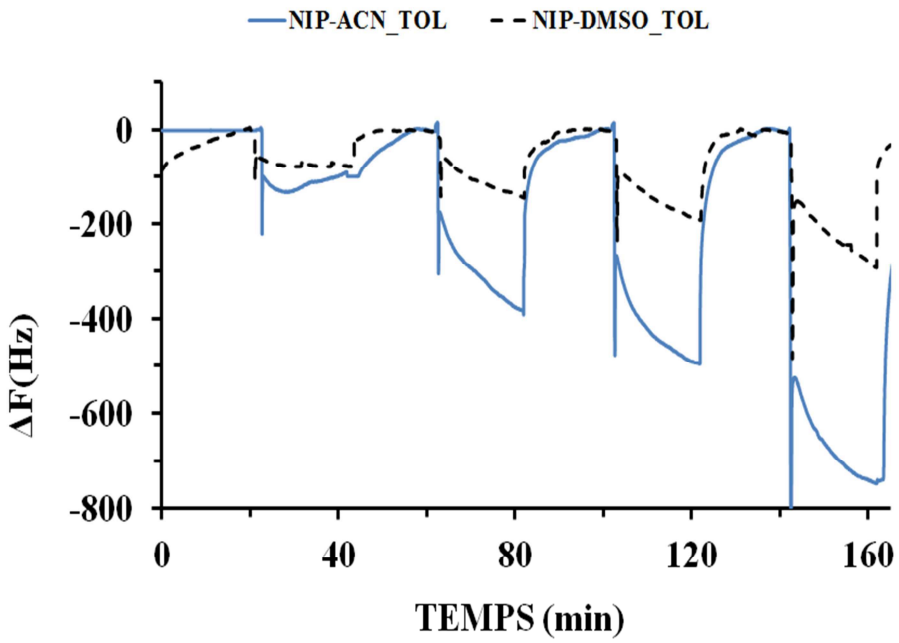


(a)

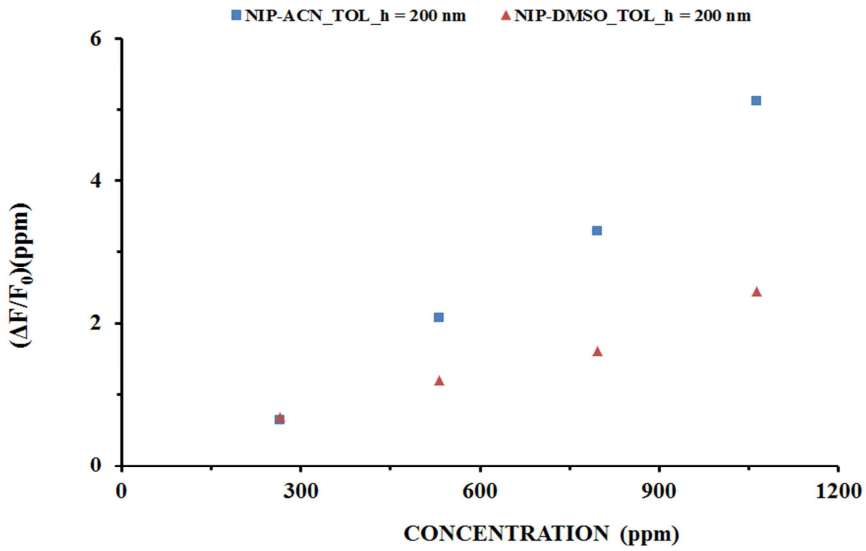


(b)

***Fig. 4-9**: Comparaison des variations de fréquence d'un capteur équipé d'une couche mince de NIP-ACN et d'un capteur avec une couche de NIP-DMSO, exposés à différentes concentrations d'éthanol, a) en temps réel, b) en régime permanent*



(a)



(b)

Fig. 4-10: Comparaison des variations de fréquence d'un capteur équipé d'une couche mince de NIP-ACN et d'un capteur avec une couche de NIP-DMSO, exposés à différentes concentrations de toluène, a) en temps réel, b) en régime permanent

Les réponses aux tests de gaz (éthanol, toluène) des couches minces de NIP-DMSO sont également reportées sur les Figures 4-9 et 4-10 en temps réels et en régime permanant,

superposées aux réponses des capteurs équipés de couches minces de NIP-ACN présentées au § 4.4.1. Nous remarquons que les diminutions de fréquence avec les films minces de NIP-ACN sont nettement plus importantes que celles obtenues avec les films minces de NIP-DMSO, d'un facteur proche de deux pour l'éthanol et presque trois pour le toluène.

La différence observée peut s'expliquer par la capacité d'adsorption de polluants dans les structures macroporeuses, liée à la superficie de la surface apparente et surtout à la présence de micropores. En effet, les micropores jouent un rôle beaucoup plus important dans le mécanisme d'absorption des analytes, que les mésopores et macropores. De plus, le diméthylsulfoxide est à l'instar de l'acétonitrile un porogène à faible pouvoir solvatant et génère ainsi une porosité similaire. Cependant d'après les résultats obtenus pour les détections sous gaz, il semble raisonnable de considérer que la porosité des films minces de NIP-ACN et de NIP-DMSO tout en étant assez proches ne sont pas identiques, avec un nombre de micropores plus élevé dans les films de NIP-ACN que dans les films de NIP-DMSO.

4.4 Validation sur polymères imprimés (MIP-DMSO)

4.4.1 Résultats des caractérisations sous gaz

Les capteurs équipés de couches minces d'épaisseurs égales à 200 nm de MIP/NIP seront caractérisés sous gaz. Les variations de fréquences obtenues avant et après extraction, puis après recapture seront comparées entre elles et à celles obtenues avec les couches de NIP. La comparaison de ces résultats permettra d'évaluer la rupture et la reformation de liaisons entre la molécule empreinte et la matrice polymérique. Des variations de fréquence plus importantes avec le MIP après l'étape d'extraction que celles obtenues avec le MIP avant extraction et avec le NIP, sont attendues liées à la porosité dues à la formation de sites de reconnaissance spécifique dans les couches minces de MIP.

Comme précédemment, les dispositifs à ondes de Love montés dans la cellule de test en configuration oscillateur ont été exposés aux mêmes séquences de concentrations d'éthanol et de toluène (cf. Table 3-1 au chap.3).

4.4.1.1 Résultats sous COV avant l'extraction de la molécule empreinte

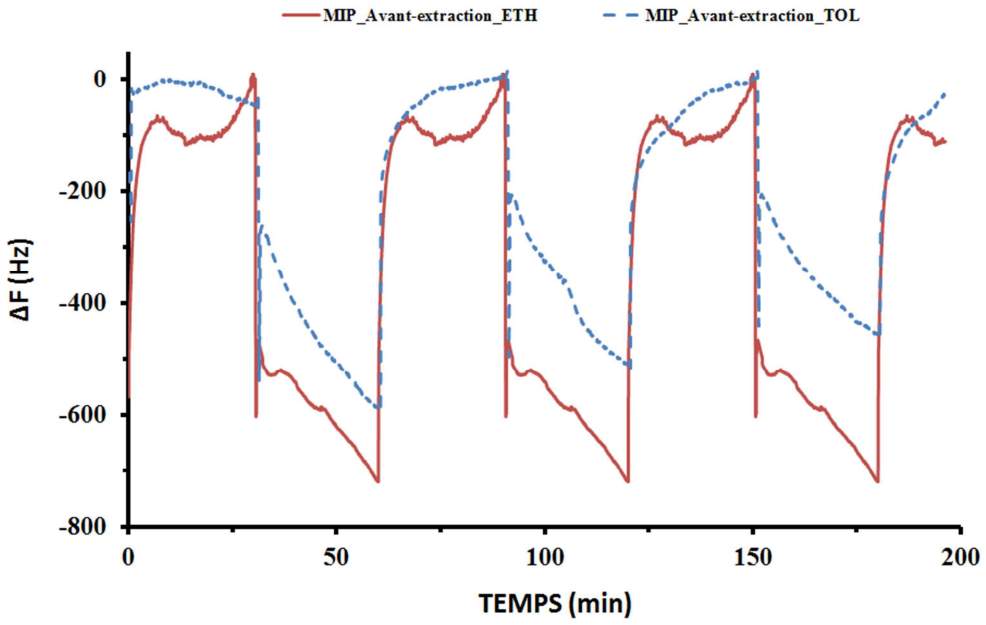


Fig. 4-11:Variations de fréquence d'un capteur recouvert d'une couche mince de MIP-DMSO avant l'étape d'extraction, soumis à 4000 mg/m3 de toluène et d'éthanol

La répétabilité de la réponse a été estimée en effectuant une série de tests à une concentration de 4000 mg/m^3 de toluène et d'éthanol, pour un même capteur recouvert d'une couche mince de MIP-DMSO avant l'étape d'extraction. Les variations de fréquence sont représentées sur la Figure 4-11. Ces résultats montrent que l'on obtient une bonne répétabilité de la réponse pour un échelon de concentration donnée.

Les réponses fréquentielles des capteurs équipés de MIP et NIP-DMSO aux deux gaz (éthanol, toluène) ont été étudiées et comparées. Ces réponses sont représentées sur les Figures 4-12 à 4-15. Comme attendu, nous observons une variation de fréquence quasi-instantanée à chaque introduction de gaz correspondent aux variations de la vitesse de l'onde induites par l'effet de masse ou un effet mécanique au sens large. De même que pour les tests avec couches de NIP-ACN et NIP-DMSO, nous constatons que les variations de fréquence avec les films de MIP-DMSO augmentent avec la concentration en COV et que la cinétique de sorption est légèrement plus élevée pour l'éthanol que le toluène (voir Fig. 4-12). La stabilisation de la fréquence nécessite quelques minutes pour le toluène et moins d'une minute pour l'éthanol.

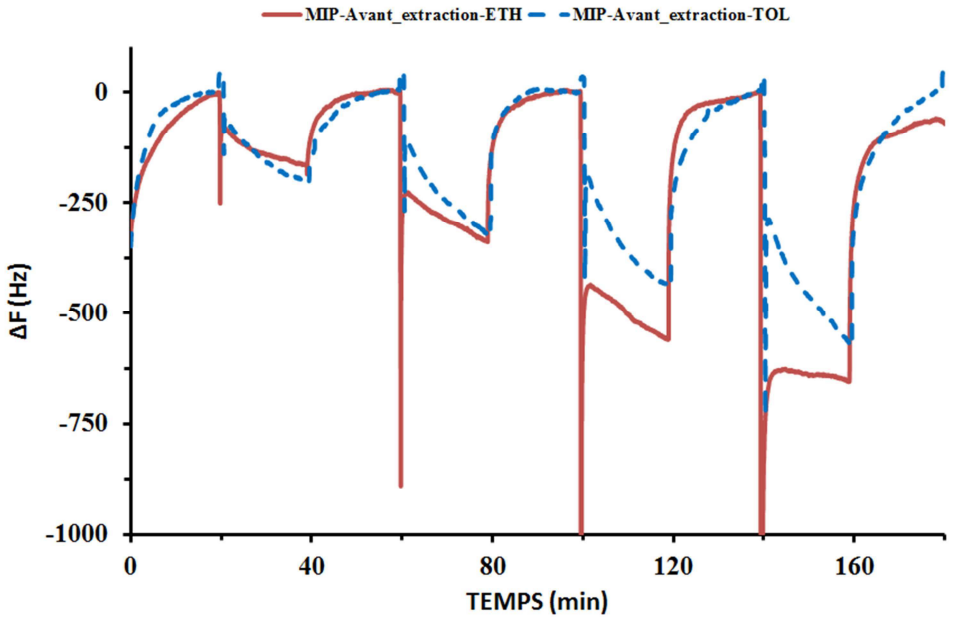


Fig. 4-12: Variations de fréquence d'un capteur équipé d'une couche de MIP-DMSO avant l'étape d'extraction soumis à différentes concentrations de toluène et d'éthanol

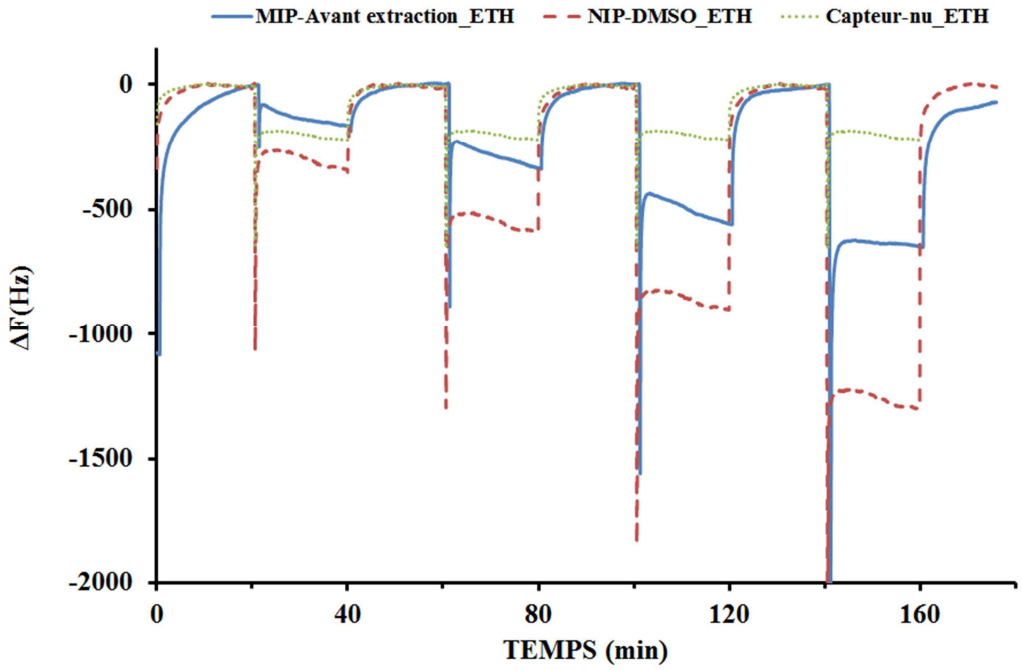


Fig. 4-13: Comparaison des variations de fréquence de capteurs, nu, avec une couche de NIP-DMSO (200nm) et avec une couche de MIP-DMSO (200nm) avant extraction soumis à différentes concentrations d'éthanol

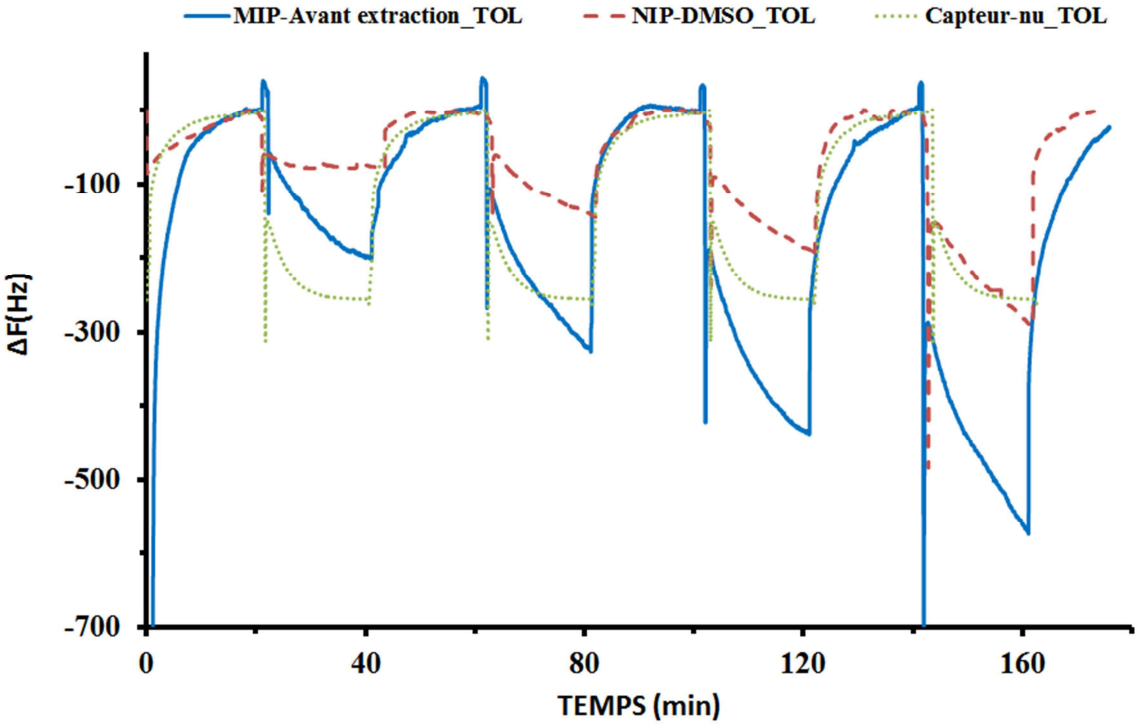
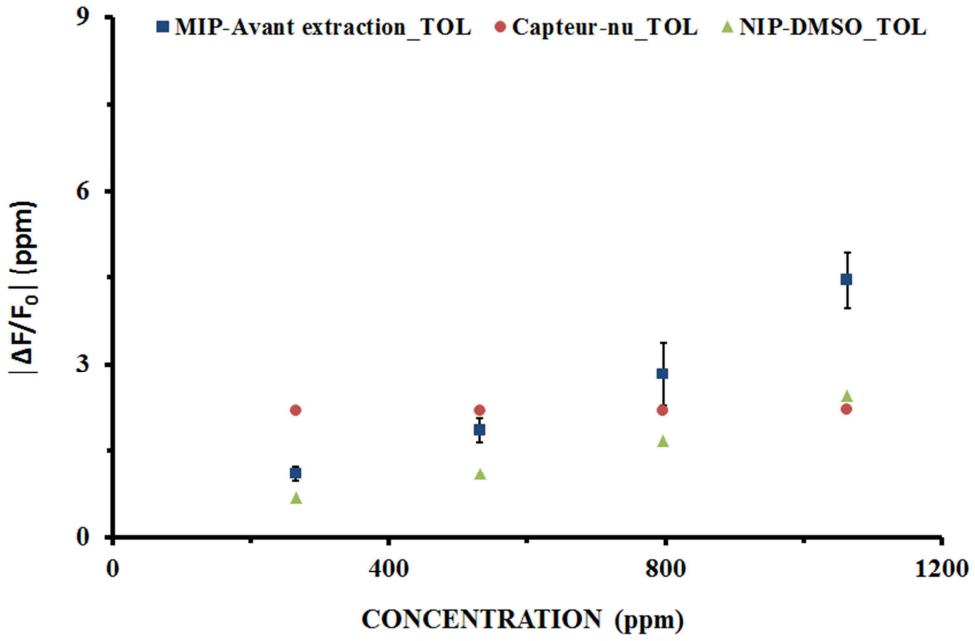


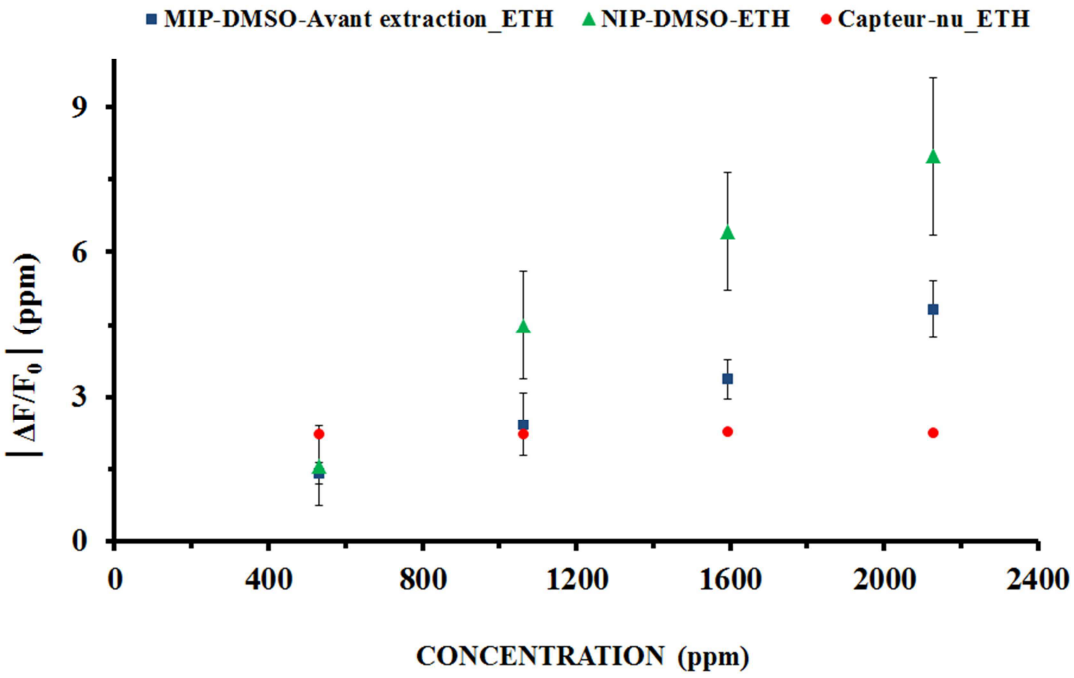
Fig. 4-14: Comparaison des variations de fréquence de capteurs, nu, avec une couche de NIP-DMSO (200nm) et avec une couche de MIP-DMSO (200nm) avant extraction soumis à différentes concentrations de toluène

Les Figures 4-13 et 4-14 représentent les réponses typiques en temps réels, respectivement à l'éthanol et au toluène, de capteurs, nu, avec film NIP-DMSO, avec film MIP-DMSO avant extraction. Ces réponses sont synthétisées sur la Figure 3-15, qui représente l'ensemble des variations de fréquence moyennes en régime permanent, obtenues ave différents capteurs. De nouveau, nous observons une assez bonne reproductibilité des résultats. Si nous retrouvons également une forte diminution de la réponse sous toluène du capteur à film NIP-DMSO, attribuée en particulier à l'encombrement stérique de la molécule par rapport à des pores de petites taille, nous observons parallèlement que les réponses des capteurs à films MIP-DMSO au toluène et à l'éthanol sont assez similaires entre elles.

Ainsi, dans le cas du MIP-DMSO, la différence d'encombrement stérique des molécules ne semble pas induire de différence importante sur les réponses, ce qui est en accord avec le fait qu'une grande partie du volume corresponde à des pores larges et occupés par la molécule empreinte, comme visualisé sur les clichés MEB (§ 3.4.5.3).



(a)



(b)

Fig. 4-15 : Variation de fréquence relative en régime permanent pour différents capteurs équipés de films minces de NIP-DMSO et MIP-DMSO avant extraction (200 nm) et d'un capteur nu à différentes concentrations (a) toluène, (b) éthanol

A partir de ces résultats, il apparaît raisonnable de proposer d'utiliser ultérieurement comme référence un capteur à film MIP-DMSO, avant extraction de la molécule empreinte, susceptible de représenter la réponse non spécifique du dispositif.

4.4.1.2 Résultats après les étapes d'extraction et de recapture de la molécule empreinte

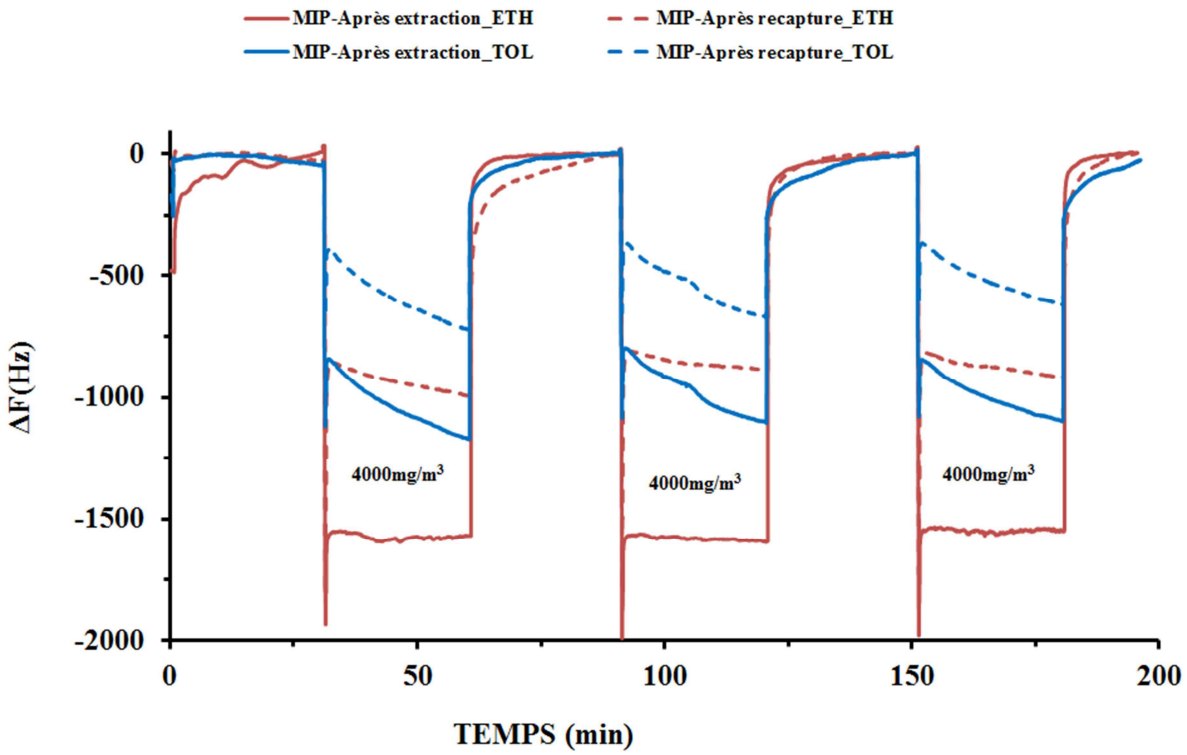


Fig. 4-16: Variations de fréquence d'un capteur avec une couche de MIP-DMSO (après extraction et recapture de la molécule empreinte) soumis à 4000 mg/m^3 d'éthanol et de toluène (répétabilité)

Comme pour les résultats obtenus avant l'étape d'extraction, la Figure 4-16 montre une bonne reproductibilité de la réponse pour le même échelon de concentration (4000 mg/m^3) caractérisée par une succession de variations de fréquences identiques.

Rappelons, que les MIP sont généralement préparés à partir de polymères réticulés contenant des cavités spécifiques. Ces cavités sont créées par copolymérisation de monomères réticulants et de monomères fonctionnels autour d'une molécule empreinte. Après la polymérisation, la molécule en question doit être retirée pour laisser son empreinte possédant des sites de reconnaissances spécifiques à l'analyte dans le matériau. Elle est de nouveau réintroduite afin de reformer les liaisons avec le MIP de manière non covalente.

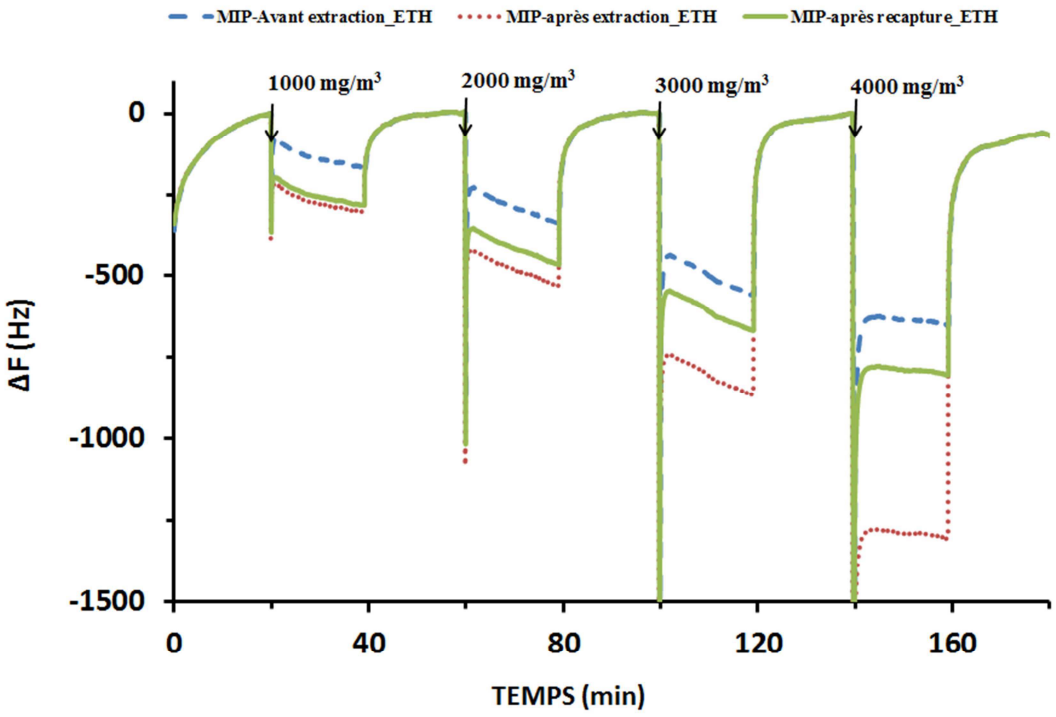


Fig. 4-17: Variations de fréquence de capteur avec une couche mince de MIP-DMSO soumis à différentes concentrations d'éthanol (avant, après extraction et après recapture)

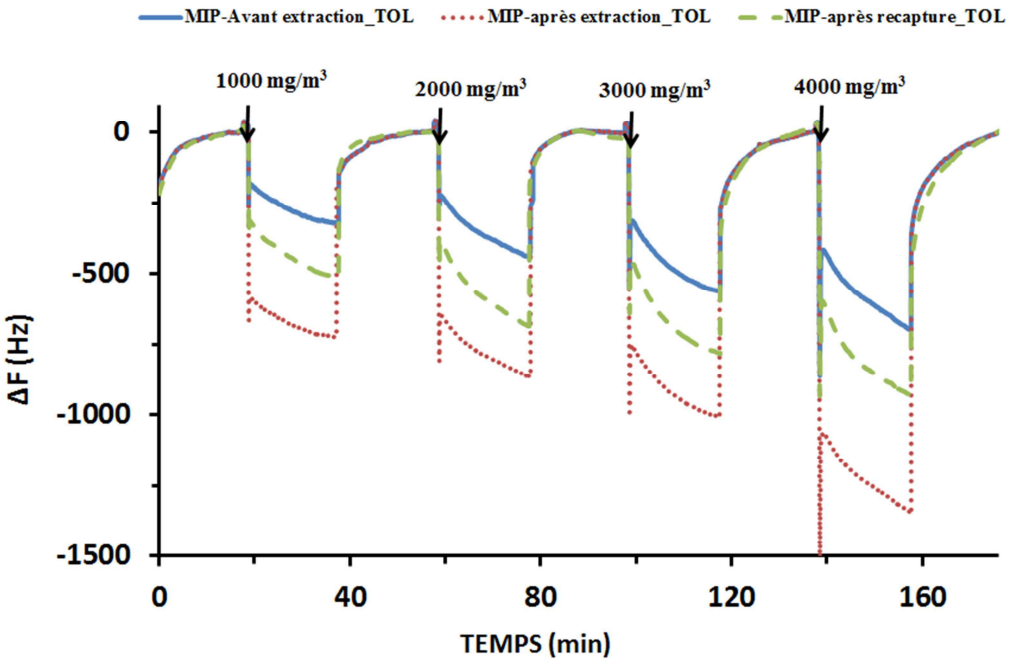


Fig. 4-18: Variations de fréquence de capteur avec une couche mince de MIP-DMSO soumis à différentes concentrations de toluène (avant, après extraction et recapture).

Les capteurs ont également été soumis aux séquences de polluants afin de vérifier la rupture et la reformation de la liaison molécule empreinte-monomère fonctionnel lors des étapes d'extraction et de recapture. Les Figures 4-17 et 4-18 présentent les résultats enregistrés en temps réel de la fréquence de l'oscillateur pour des expositions aux différentes concentrations d'éthanol et de toluène. Là encore pour les deux gaz, nous retrouvons le même type de réponse avec une variation de fréquence qui dépend de la concentration du gaz.

Les courbes montrent que la sensibilité est plus importante après l'étape d'extraction du template de la matrice polymérique. L'extraction de la molécule empreinte du réseau polymérique entraîne en effet une augmentation de la surface spécifique des films minces et donc une augmentation de la sensibilité du dispositif.

La propriété des polymères à empreintes moléculaires à reformer des liaisons avec les molécules à partir desquelles ils ont été synthétisés, est la caractéristique la plus importante de ces matériaux. De ce fait, comme nous pouvons l'observer sur les courbes des deux figures précédentes, il apparaît nettement que la sensibilité rediminue légèrement après l'étape de recapture, sans toutefois revenir complètement à la sensibilité avant extraction. Ces résultats sont cohérents si l'on considère que l'effet de masse ou mécanique plus élevé dû à l'augmentation de la surface sensible, après l'extraction du MIP, rediminue dans une moindre mesure après recapture, les sites n'étant alors pas nécessairement tous réoccupés.

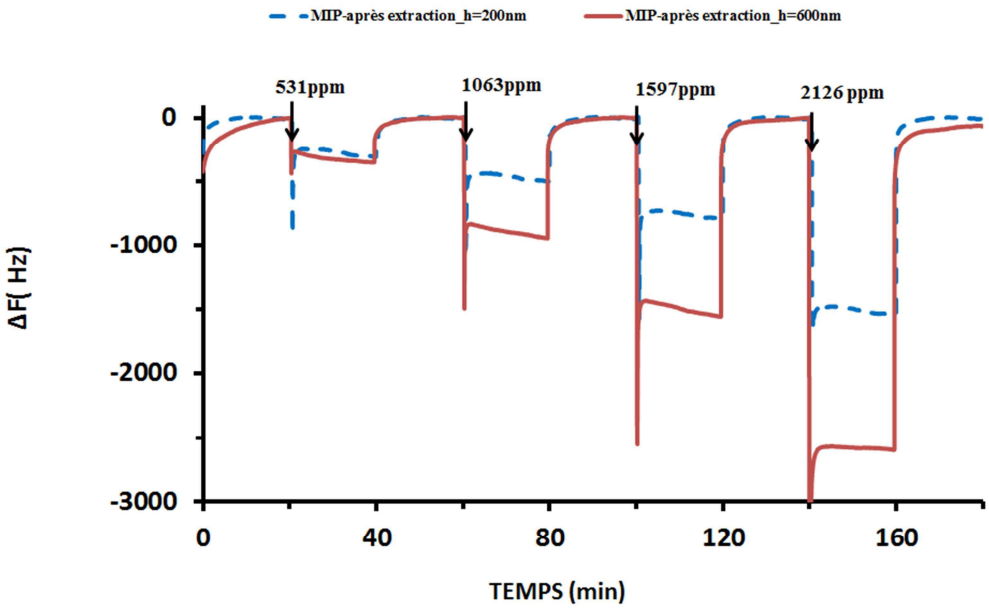
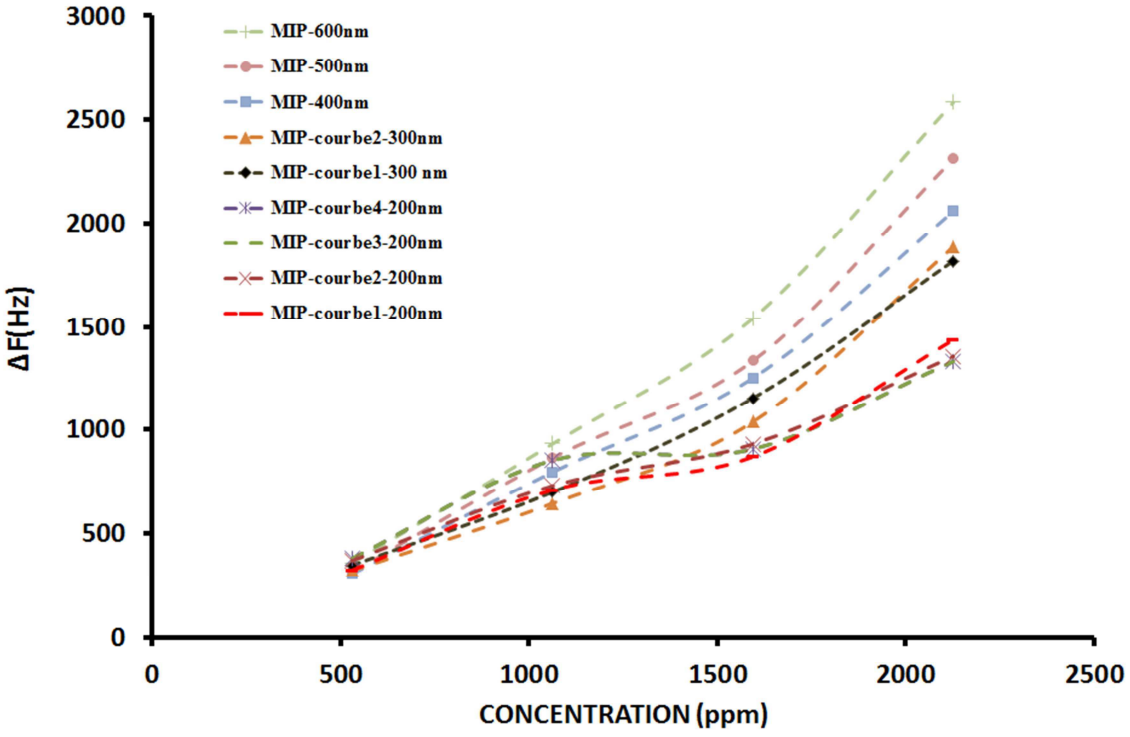
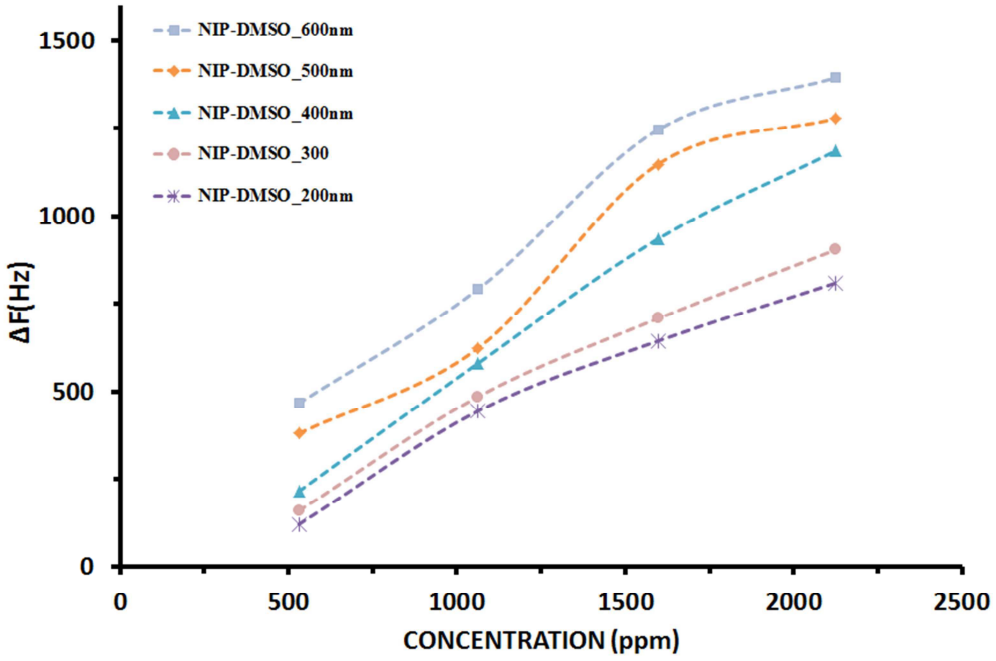


Fig. 4-19: Comparaison des variations de fréquence de capteur recouvert de couche de MIP-DMSO (après extraction) d'épaisseurs différentes (200 nm et 600 nm) soumis à des concentrations d'éthanol

La Figure 4-19 compare la réponse de dispositifs avec des couches minces de MIP-DMSO de deux épaisseurs différentes, à des séquences d'éthanol de concentration croissante. Dans les deux cas, les courbes montrent des variations de fréquence qui augmentent avec la concentration de gaz polluant. En général, les films plus minces de MIP présentent des réponses un peu plus rapides par rapport aux films plus épais. Cependant de manière qualitative, les deux films minces de MIP (200 nm et 600 nm) s'équilibrent en une minute environ suivant l'augmentation des concentrations de COV. L'augmentation de l'épaisseur de la couche de polymère se traduit surtout par une augmentation de la réponse du capteur, comme nous pouvions le prévoir. En effet, les films épais contiennent une plus grande quantité de sites de reconnaissance, ce qui se traduit par une surface spécifique plus grande et donc une sensibilité plus élevée. Néanmoins, tripler l'épaisseur du film de MIP n'engendre pas un triplement des variations de fréquences. Cela peut s'expliquer par le fait que certains sites dans le cas d'une épaisseur plus importante, demeurent stériquement inaccessibles aux espèces cibles. De plus, les films épais présentent un effet de masse plus élevé qui peut augmenter les pertes d'insertions et compromettre la propagation de l'onde acoustique. Ce paramètre nécessite donc un ajustement adéquat.



(a)



(b)

Fig. 4-20: Comparaison des variations de fréquence en régime permanent de capteurs équipés de films minces d'épaisseurs différentes (200 nm à 600 nm) soumis à des concentrations d'éthanol, a) MIP-DMSO (après extraction), b) NIP-DMSO

La représentation des courbes de variations en régime permanent sur la Figure 4-20 permet de mieux visualiser et d'étudier l'impact de l'augmentation de l'épaisseur des films minces (MIP/NIP-DMSO) sur le comportement des capteurs aux tests de sorption sous éthanol.

Les courbes des couches de MIP-DMSO montrent pour la plupart, des diminutions de fréquences plus importantes pour les valeurs de concentrations plus élevées et une sensibilité qui augmente avec l'épaisseur et avec la concentration, dans la gamme observée.

En ce qui concerne, les couches de NIP-DMSO, nous avons obtenu des profils de réponses qui augmentent de manière plus homogène avec l'épaisseur et la concentration en restant toujours inférieures aux réponses avec films MIP-DMSO (après extraction) à conditions équivalentes. Un début de saturation est visible pour toutes les épaisseurs, aux fortes concentrations, contrairement au comportement observé avec les films MIP-DMSO.

4.4.2 Synthèse et influence des tests sous gaz

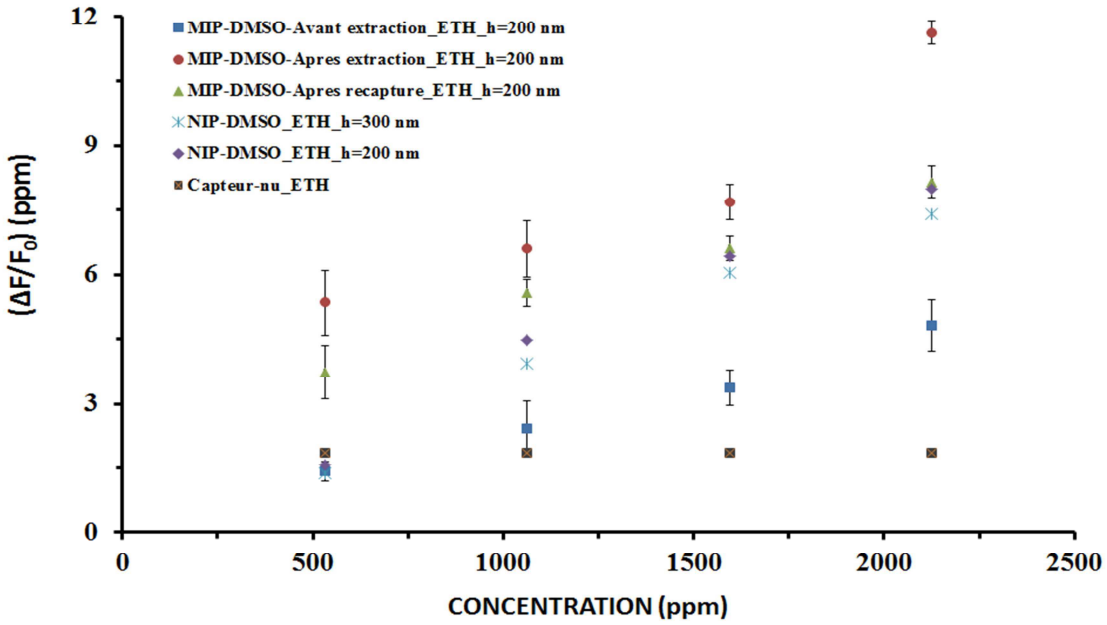


Fig. 4-21: Variations de fréquence relative de capteurs dotés de couches minces de NIP et de MIP-DMSO (après extraction) d'épaisseur 200 nm soumis à différentes concentrations d'éthanol. La reproductibilité est indiquée par des barres représentant l'écart-type autour de la valeur moyenne pour 4 tests effectués avec des capteurs différents

La Figure 4-21 montre les variations de fréquence relative en régime permanent en fonction de la concentration en éthanol, de dispositifs dotés de couches minces de NIP-DMSO et de MIP-DMSO avant l'étape d'extraction et après extraction et recapture de la molécule

empreinte. Ces réponses sont reproductibles et semblent augmenter presque linéairement avec la concentration de gaz polluant.

La comparaison des réponses ici superposées des dispositifs équipés de NIP-DMSO et de MIP-DMSO après l'extraction de la molécule empreinte montrent bien que les couches de MIP-DMSO induisent de plus forte variations de fréquence comme nous pouvions le prévoir grâce notamment à un volume poreux plus important et une plus grande surface spécifique. En effet la capacité d'adsorption des vapeurs est fortement liée aux surfaces spécifiques des matrices polymériques [152].

Comme le démontre ce comparatif des variations relatives en régime permanent, l'utilisation des détections de polluant comme outil de caractérisation permet de mettre en évidence la formation d'empreintes moléculaires au sein des couches minces de MIP-DMSO. Ce dernier point est illustré par les variations relatives qui sont beaucoup plus importantes pour les couches de MIP-DMSO après extraction de la molécule empreinte que pour les couches de NIP-DMSO. Étant donné que la composition chimique des polymères imprimés (MIP) et des polymères de contrôle (NIP) sont presque identiques, la différence de variation de fréquence observée suggère que des sites spécifiques de reconnaissance moléculaire sont formés à l'intérieur du réseau du MIP comme souhaité. Ces résultats indiquent que les cavités formées en utilisant l'adénosine monophosphate comme molécule empreinte, créent une surface spécifique plus importante dans le polymère imprimé entraînant ainsi une augmentation de la porosité et donc de l'adsorption de molécules par rapport aux polymères de contrôle (NIP).

La Figure 4-22 représente, de manière analogue les résultats des tests avec des films MIP-DMSO aux trois étapes (avant et après extraction, après recapture), en réponse au toluène. De nouveau, les réponses sont assez proches de celles obtenues sous éthanol, et la reproductibilité est assez satisfaisante.

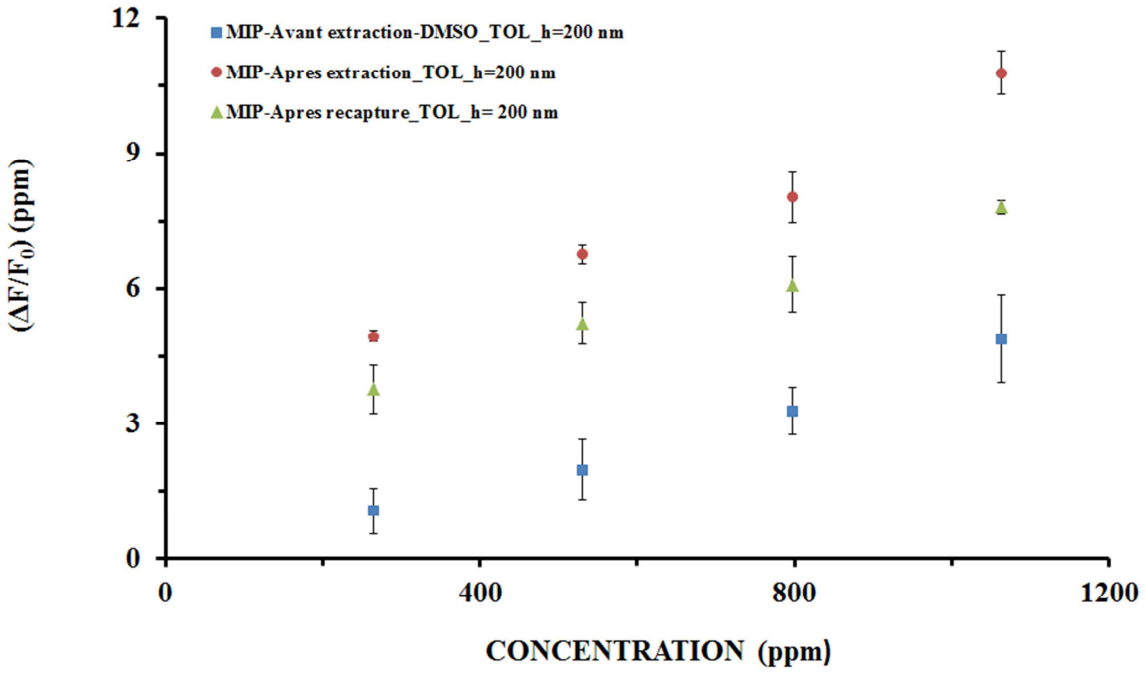


Fig. 4-22: Variations de fréquence relative de capteur doté de couche sensible de MIP-DMSO (avant et après extraction et recapture) d'épaisseur 200 nm soumis à différentes concentrations de toluène. La reproductibilité est indiquée par des barres représentant l'écart-type autour de la valeur moyenne pour 4 tests effectués avec des capteurs différents

Ainsi, ces résultats font clairement apparaître que les variations relatives de fréquence dépendent fortement de la présence ou de l'absence de la molécule empreinte du réseau polymérique quel que soit le polluant testé.

4.5 Analyse comparative avec des films mésoporeux

4.5.1 Polymères non imprimés : NIP-ACN et NIP-DMSO

La surface spécifique généralement importante que présentent les matériaux à empreintes moléculaires constitue la propriété structurale motivant son utilisation dans la conception des biocapteurs. Pour déterminer et évaluer cette structure poreuse (surface spécifique, porosité) de ces couches minces de polymères (MIP/NIP), nous avons cherché à établir une relation avec des films mésoporeux dont les caractéristiques poreuses ont été étudiées. Ces essais par comparaison avec des travaux antérieurs menés sur des films mésoporeux [150] [151], nous ont permis d'évaluer ou de confirmer certaines propriétés mécaniques (état de surface et morphologie poreuse) de notre couche de NIP-ACN/DMSO.

Les matériaux mésoporeux utilisés lors de ces tests ont été élaborés avec des couches d'oxydes de titane (FT) comportant une porosité et une surface active estimées respectivement à 43% et à 312 m^2/cm^3, et de deux couches de silice mésoporeuses ayant des tailles de pores différentes (FS, CS). La couche FS possède une porosité similaire à celle de la couche FT et une surface active de 720 m^2/cm^3 tandis que la couche CS présente une porosité et une surface active estimées à 48% et à 1132 m^2/cm^3. D'autre part, les valeurs typiques des surfaces spécifiques des polymères à empreintes moléculaires sont comprises entre 100 et 400 m^2/cm^3 [27], donc nous pouvons avancer que la surface active des couches de NIP est proche de celle de la couche d'oxyde de titane.

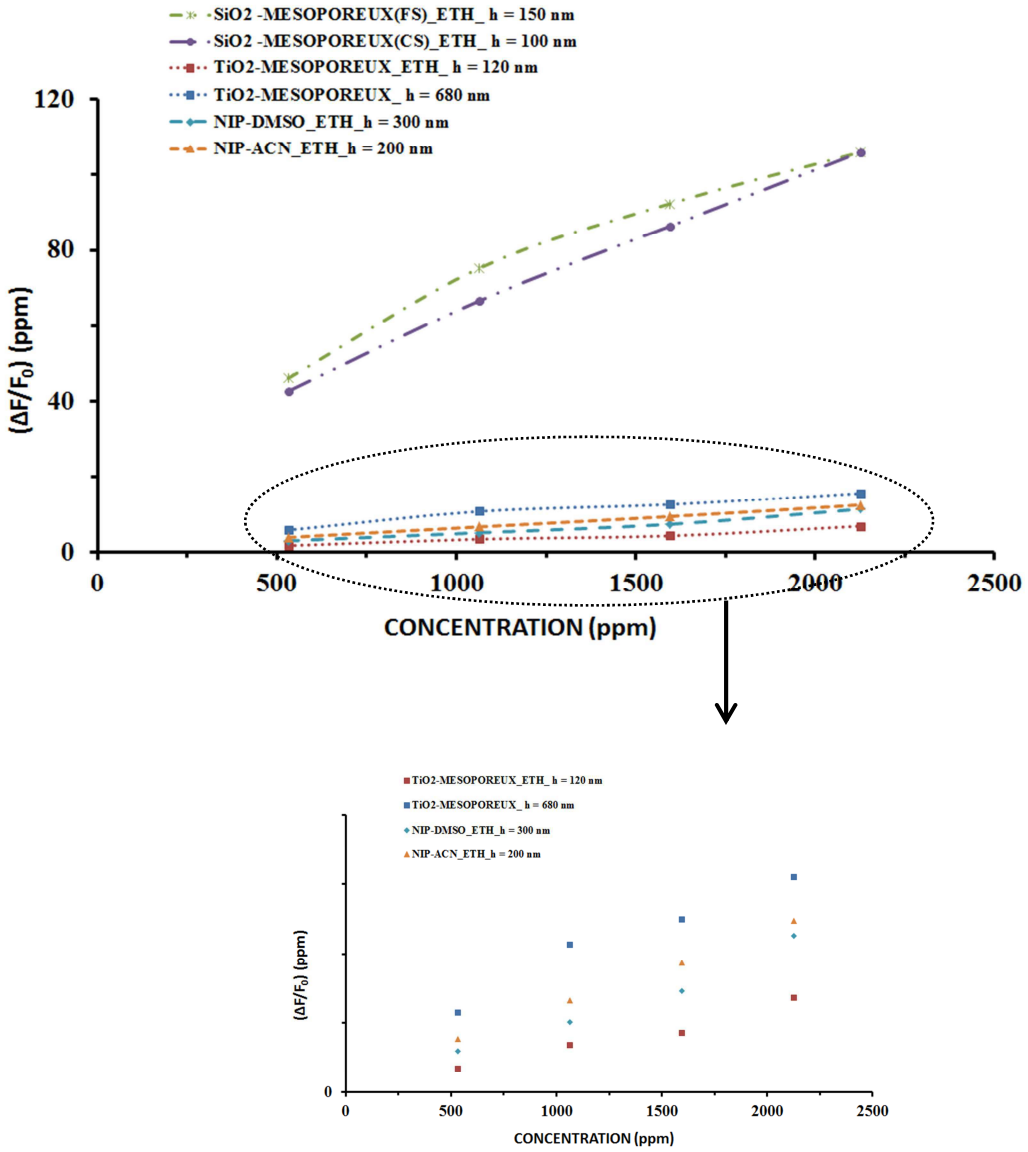


Fig. 4-23: Variations de fréquence normalisées pour les capteurs recouverts d'une couche mince de NIP et de couches mésoporeuses (FT, FS, CS) pour différentes concentrations d'éthanol

La Figure 4-23 présente les variations relatives de fréquence en régime permanent des couches mésoporeuses (silice, oxyde de titane) et des couches de NIP-ACN/DMSO obtenues en utilisant les mêmes séquences de détection et le même composé volatil (éthanol). Les couches de silice (FS, CS) induisent de plus grandes variations de fréquence que les couches de titane (FT) et les couches de NIP. Cette différence de variation peut s'expliquer par une présence de micropores plus importante dans les couches de silices que dans celles du titane, ce qui indique une plus grande sensibilité et donc des variations de fréquences plus importantes pour couches de silices [24]. De plus, les variations relatives de fréquence en régime permanent des couches de NIP, beaucoup moins importantes que celles obtenues pour les couches de silices mésoporeuses, sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec des couches de titane mésoporeuses.

Au cours de ces essais, les faibles pressions générées (0,003-0,036) en vapeur saturante indiquent que le phénomène de sorption se produit principalement dans les micropores. Par ailleurs, la porosité du film mince des matériaux à empreintes moléculaires est fixée par la nature du solvant porogène. Dans notre cas, nous avons vu que l'acétonitrile par exemple come le diméthylsulfoxide (DMSO) sont des solvants de faible pouvoir solvatant et dont la distribution de la porosité est caractérisée par une large proportion de mésopores (2-50 nm) et de macropores (largeur supérieure à 50 nm) due à la cinétique de séparation de phase qui se produit plus tôt que d'ordinaire. Les résultats obtenus indiquent une présence plus faible de micropores dans la structure des films minces de NIP-ACN/DMSO en comparaison des couches de silices mésoporeuses, d'où une sensibilité proche de celle du titane mésoporeux.

4.5.2 Polymères imprimés : MIP-DMSO

Comme dans le paragraphe précédent, nous avons comparé les résultats de détection sous gaz obtenus avec les couches de MIPs avec les travaux antérieurs menés sur des films mésoporeux.

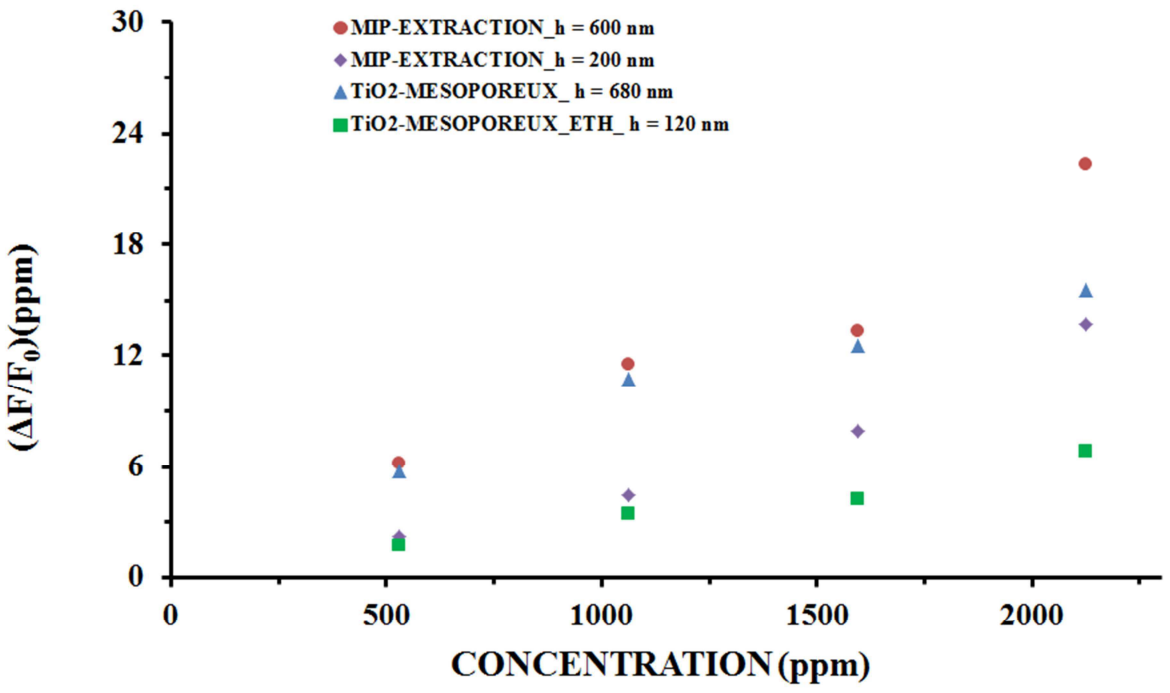


Fig. 4-24: Variations de fréquence normalisées par rapport à l'épaisseur des couches minces poreuses pour les capteurs recouverts de couches minces de MIP et de couches mésoporeuses de TiO_2 pour différentes concentrations d'éthanol

Les variations de fréquences normalisées sont reportées sur la Figure 4-24. De nouveau, ces tests nous ont permis d'évaluer les propriétés mécaniques de nos couches minces de MIP-DMSO. En effet les variations de fréquence obtenues en utilisant les mêmes séquences de détection et les mêmes composés volatiles, sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec des couches de titane mésoporeuses comme pour les couches de polymères non imprimés. De la même façon, cette similarité est en accord avec les propriétés du solvant utilisé, favorisant la présence de mésopores (2-50 nm) et de macropores (largeur supérieure à 50 nm), au détriment de micropores. Ainsi, comme pour les couches de polymères non imprimés (NIP-ACN/DMSO), la sensibilité des films MIP-DMSO est proche de celle du titane mésoporeux.

4.6 Conclusion

Ce chapitre a rapporté les tests de détection au gaz sur des capteurs à base de polymères à empreintes moléculaires. Ces tests nous ont permis de confirmer quelques

résultats. Les dispositifs à ondes élastiques de surface à base de matériaux imprimés ou non imprimés, réagissent au contact d'un gaz. Cette réaction se traduit par une variation de fréquence qui dépend de la concentration de la substance analysée. Plus la concentration du gaz augmente, plus la variation de fréquence est importante.

D’autre part, l'effet de l’impression moléculaire a été démontré par la comparaison de la porosité de la matrice polymérique imprimée et celle de la matrice non imprimée. Pour finir, nous avons mis en évidence la rupture et la reformation de la liaison molécule empreinte / monomère fonctionnel lors des étapes d’extraction et de recapture.

Grâce à tous les tests réalisés, nous avons montré la faisabilité de l’association de capteur à de Love et de la technologie à empreinte moléculaire avec notamment une bonne sensibilité.

Conclusion générale

Ces travaux constituaient une première étape d'une étude plus large visant à développer un capteur à onde de Love à base de polymères à empreinte moléculaire pour la détection de biomarqueurs urinaires du cancer colorectal. L'intérêt de l'assemblage de ces deux technologies a été souligné lors de l'état de l'art.

En premier lieu, nous avons développé un procédé de dépôts reproductibles en couches minces de polymères non imprimés (NIPs). Pour ce faire, différentes méthodes de dépôts (spin-coating, spray-coating, méthode sandwich) pour produire un film mince ont été envisagées et testées. L'étude de chacune d'elles a permis de retenir la technique de dépôt par centrifugation (spin-coating) pour l'obtention de films minces de NIP, homogènes et reproductibles sur des substrats de tests. La polymérisation est réalisée en absence d'oxygène, par une technique d'insolation par ultraviolet dans une chambre inerte, sous circulation d'azote pendant toute la durée de la polymérisation. Ces films minces polymériques ont été caractérisés par profilométrie mécanique et optique.

Par la suite, le précédent protocole a été adapté au dépôt de polymères imprimés (MIP) visant la détection d'un nucléotide commercial (AMP : adénosine monophosphate). La préparation volumique des solutions de MIP et NIP avec un nouveau solvant porogène, et les paramètres de dépôt appropriés à savoir, la vitesse, l'accélération, le temps et la quantité ainsi que les conditions de polymérisation optimales afin de réaliser des films en couches minces localisés sur le chemin acoustique de nos capteurs, ont été revus.

D'autre part, il est apparu nécessaire de trouver un traitement de surface adapté pour que la solution adhère au substrat. Ainsi, nous avons procédé à une fonctionnalisation de la surface par mélange piranha qui élimine les résidus organiques et régénère par oxydation les groupes hydroxyles (groupe OH), suivie d'une silanisation qui permet d'obtenir une polymérisation homogène par greffage covalent du polymère. Enfin, nous avions un problème d'homogénéité du film auquel nous avons remédié par des changements de la viscosité de la solution et des paramètres de dépôt cités précédemment.

Au terme de cette partie des travaux, deux protocoles ont été mis au point :

- dépôts du polymère non imprimé (NIP) à base de solvant acétonitrile (ACN),
- dépôts du polymère imprimé et non imprimé (MIP/NIP) à base d'AMP comme molécule empreinte et de dimethylsulfoxide (DMSO) comme solvant.

Par ailleurs, une étape de caractérisation structurale, typiquement par visualisation optique (profilométrie) et microscopie électronique à balayage (MEB), a été réalisée pour mesurer l'épaisseur des dépôts et étudier leur état de surface (taille des pores, densité poreuse, etc…). Des caractérisations à l'analyseur de réseau des capteurs avant et après dépôt de la couche mince, ont également été réalisées, sous air. Les courbes en transmission (paramètre S_{21}) au voisinage de la fréquence de résonance, ont montré la quasi-absence de pertes supplémentaires dues au dépôt du film de MIP/NIP (ACN ou DMSO) pour des films minces d'épaisseur proche de 200 nm. Ces éléments valident la compatibilité du film avec la propagation de l'onde, ainsi que la possibilité de fonctionner en oscillateur, comme prévu pour le dispositif final.

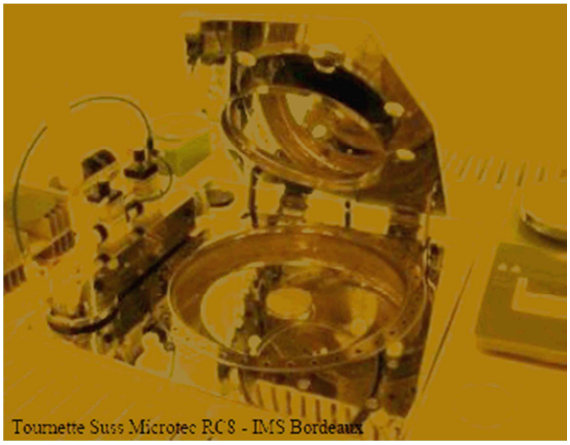
Dans l'objectif d'évaluer le comportement du capteur intégrant une couche sensible de matériaux à empreintes moléculaires, des séries de tests de détection sous gaz (toluène, éthanol) ont été réalisées, avec des capteurs équipés de ces polymères déposés en couches minces homogènes, limitée sur le chemin de propagation de l'onde acoustique. Ces résultats nous ont permis d'une part d'étudier les propriétés (porosité, surface spécifique) de ces matériaux de manière comparative avec des travaux antérieurs menés sur des films mésoporeux et d'autre part de confirmer et d'évaluer les interactions entre la molécule empreinte et le polymère lors des différents processus d'extraction et de réinsertion de cette dernière. Une caractérisation plus complète de ces propriétés de reconnaissance serait nécessaire notamment en termes de spécificité et sélectivité et surtout en termes de constantes d'association du polymère avec la molécule empreinte.

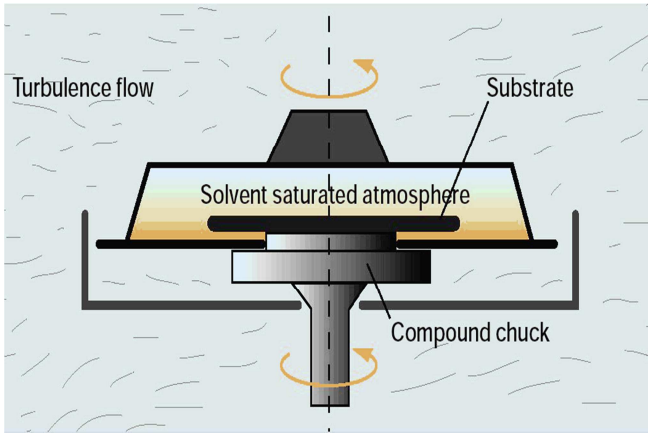
A la suite de cette caractérisation sous gaz, le principe du capteur a ainsi pu être validé, ouvrant la voie à l'application en milieu liquide (microfluidique) pour la détection de nucléosides urinaires (5 ppm) dans le cadre des travaux de thèse de Naima Lebal débutés parallèlement. Le développement d'un nouveau process pour le dépôt de MIPs pour la détection spécifique de nouvelles molécules empreintes (pseudo-uridine, 8-OH2'dG) est en cours.

En perspective de ces travaux de thèse, d'un point de vue du système de détection, un travail important reste encore à réaliser même si les capteurs à base de MIP, ont montré des propriétés intéressantes. En effet, les avancées récentes en nanotechnologie et en science des nanomatériaux ont permis le développement de capteurs nanométriques qui surpassent les biocapteurs conventionnels. De nombreux travaux de recherches qui utilisent des aptamères [153] [154] [24] et des nanoparticules (nanobilles, nanotubes, etc.) [155], [156],[157] comme éléments de reconnaissance moléculaire sont ainsi relatés dans la littérature.

Annexe 1 : Matériel salle blanche

Tournette Suss-Microtec RC8 - IMS Bordeaux





Système "GYRSET®" :

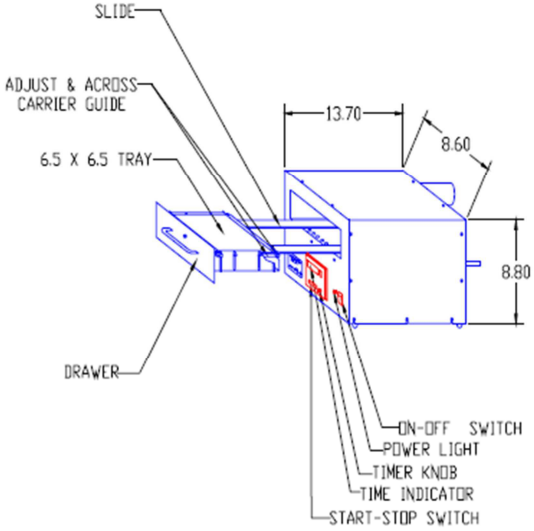
- Couvercle: atmosphère saturée en solvants
- Dépôt plus uniforme, moins d'effets de bord
- Limite la quantité de résine

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 bar
Air pressure	4 - 9 bar
Nitrogen	4 - 9 bar
Exhaust	600 l/min
Conforming to:	
European Machine Norms CE certification	
EMC Electro magnetic capability	
SEMI specifications	

Insoleuse UV-Ozone: modèle 42 JELIGHT, JELIGHT COMPANY INC.



Spécifications :

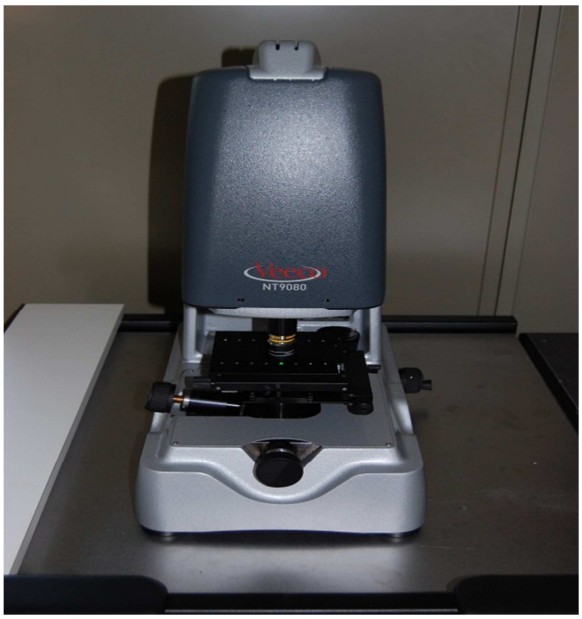
- Taille (Max) : Largeur : 9, Longueur: 18; Hauteur : 9.5
- Besoin en énergie : 115 Volts, 60 Hz., 3 Amps
- Type de lampe : Lampe mercure à faible pression de vapeur(Low Pressure Mercury Vapor Grid)
- Lamp de sortie : 28,000 µW /cm^3 , 254 nm (From 6mm Dist.)
- Taille de la plaque de l'UV-OZONE : 6.5" X 6.5"

Profilomètre mécanique Dektak

Spécifications:

- Longueur de balayage simple de 55mm (2.16pouces)
- Mesures sur de plus grande distances possible par «stitching» (voir la section Options installées)
- Accepte les substrats jusqu'à 200mm (8 pouces) de diamètre (fig.1). Des adaptateurs pour petits échantillons sont disponibles selon la configuration courante (voir la section Configuration).
- Épaisseur maximale de substrat de 90mm (3.5 pouces)
- Reproductibilité de 0.6nm à 1 sigma sur saut de marche de 0.1um
- Plage verticale de de 1mm (0.039po) (option à plage étendue)
- Résolution verticale de 0.1nm (pour la plage de 6.55um)

Profilomètre optique Veeco 9080



Specifications:

- Analyse de donnée 2D and 3D
- Plus de 200 outils d'analyses et de visualisations
- Analyse de surfaces aussi bien rugueuses (en mode confocal) que lisses (en mode interféromètre à balayage vertical – VSI) et très lisses (en mode interféromètre à décalage de phase – PSI). Le mode réflectomètre spectroscopique permet la mesure et l'analyse de couches minces transparentes
- Objectifs du microscope : 1 à 100x
- Résolution verticale: 0.1nm (en mode PSI)
- Analyse spécifique et utilisation de boite à outils standard

Annexe 2 : Composés chimiques

L'acrylamide : fiche de sécurité internationale

ACRYLAMIDE ICSC: 0091

UNEP

Institut Scientifique de la Santé Publique

2-Propénamide
Amide de l'acide acrylique
$C_3H_5NO/CH_2=CHCONH_2$
Masse moléculaire: 71.1

N° ICSC : 0091
N° CAS : 79-06-1
N° RTECS : AS3325000
N° ONU : 2074
N° CE : 616-003-00-0
10.04.2000 Revu en réunion

TYPES DE RISQUES/ EXPOSITIONS	RISQUES/ SYMPTOMES AIGUS	PREVENTION	PREMIER SECOURS/ AGENTS D'EXTINCTION
INCENDIE	Combustible. Emission de fumées (ou de gaz) irritantes ou toxiques lors d'incendie.	PAS de flammes nues.	Poudre, mousse résistant aux alcools, eau pulvérisée, dioxyde de carbone.
EXPLOSION	Les particules finement dispersées forment des mélanges explosifs dans l'air.	Eviter le dépôt de poussières; système en vase clos, équipement électrique et éclairage protégés contre les explosions.	
CONTACT PHYSIQUE		EVITER LA DISPERSION DE POUSSIERE! EVITER TOUT CONTACT!	DANS TOUS LES CAS, CONSULTER UN MEDECIN!
• INHALATION	Toux. Mal de gorge. Faiblesse.	Aspiration locale ou protection respiratoire.	Air frais, repos. Consulter un médecin.
• PEAU	PEUT ETRE ABSORBEE ! Rougeur. Douleur. (Suite, voir Inhalation).	Gants de protection. Vêtements de protection.	Retirer les vêtements contaminés. Rincer la peau abondamment à l'eau ou prendre une douche. Consulter un médecin.
• YEUX	Rougeur. Douleur.	Ecran facial, ou protection oculaire associée à une protection respiratoire.	Rincer d'abord abondamment à l'eau pendant plusieurs minutes (retirer si possible les lentilles de contact), puis consulter un médecin.
• INGESTION	Douleurs abdominales. Faiblesse.	Ne pas manger, ne pas boire ni fumer pendant le travail. Se laver les mains avant de manger.	Rincer la bouche. Faire vomir (SEULEMENT LES PERSONNES CONSCIENTES!). Donner abondamment à boire. Consulter un médecin.

DEVERSEMENTS & FUITES	STOCKAGE	CONDITIONNEMENT & ETIQUETAGE
Consulter un expert! Balayer et récupérer la substance répandue dans des récipients. Recueillir soigneusement les résidus, puis emporter en lieu sûr. Tenue de protection chimique comprenant un appareil de protection respiratoire autonome.	Séparer des oxydants. Conserver au froid. Conserver à l'abri de la lumière. Bien fermer.	Matériau spécial. Note: D, E Symbole T R: 45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62 S: 53-45 Classe de danger ONU: 6.1 Classe d'emballage ONU: III

VOIR IMPORTANTES INFORMATIONS AU DOS

ICSC: 0091 Préparé dans le cadre de la coopération entre le Programme International sur la Sécurité Chimique et la Commission Européenne (C) 1999

Fiches Internationales de Sécurité Chimique

ACRYLAMIDE ICSC: 0091

DONNEES IMPORTANTES

ASPECT PHYSIQUE; APPARENCE:
CRISTAUX BLANCS.

DANGERS PHYSIQUES:

DANGERS CHIMIQUES:
La substance va polymériser violemment >> sous l'effet d'une forte chaleur au-dessus de 85° C ou sous l'influence de la lumière et des oxydants.

LIMITES D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE (LEP):
TLV: 0.03 mg/m³, TWA; (peau); A3; (ACGIH 2004).
MAK: H;
Catégorie de carcinogénicité: 2; Catégorie de mutagènes dans les cellules germinales: 2;
(DFG 2004).

VOIES D'EXPOSITION:
La substance peut être absorbée par l'organisme par inhalation, à travers la peau et par ingestion.

RISQUE D'INHALATION:
L'évaporation à 20°C est négligeable; une concentration dangereuse de particules en suspension dans l'air peut cependant être atteinte rapidement.

EFFETS DES EXPOSITIONS DE COURTE DUREE:
La substance est irritante pour les yeux, la peau et les voies respiratoires. La substance peut avoir des effets sur le système nerveux central.

EFFETS DES EXPOSITIONS PROLONGEES OU REPETEES:
La substance peut avoir des effets sur le système nerveux , entraînant des lésions des nerfs périphériques. Cette substance est probablement cancérogène pour l'homme. Peut causer des altérations génétiques héréditaires chez l'homme.

L'éthylène glycol dimethacrylate (EGDMA) : fiche de sécurité internationale

DIMETHACRYLATE D'ETHYLENE-GLYCOL

ICSC: 1270

Diméthacrylate d'éthylène

$C_{10}H_{14}O_4/CH_2=C(CH_3)C(O)OCH_2CH_2OC(O)C(CH_3)=CH_2$

Masse moléculaire: 198.2

N° ICSC : 1270
N° CAS : 97-90-5
N° RTECS : OZ4400000
N° CE : 607-114-00-5
26.10.1995 Revu en réunion

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		OBSERVER UNE HYGIENE STRICTE!	
• INHALATION	Toux. Mal de gorge.	Ventilation, aspiration locale ou protection respiratoire.	Air frais, repos.
• PEAU	Chute des ongles.	Gants de protection. Vêtements de protection.	Retirer les vêtements contaminés. Rincer et laver la peau abondamment à l'eau et au savon. Consulter un médecin.
• YEUX	Rougeur. Douleur.	Ecran facial.	Rincer d'abord abondamment à l'eau pendant plusieurs minutes (retirer si possible les lentilles de contact), puis consulter un médecin.
• INGESTION		Ne pas manger, ne pas boire ni fumer pendant le travail.	Rincer la bouche. Donner abondamment à boire.

DEVERSEMENTS & FUITES	STOCKAGE	CONDITIONNEMENT & ETIQUETAGE
Balayer l'absorbant versé et le porter en lieu sûr.		Symbole: Xn R: 36/37 S: (2)

VOIR IMPORTANTES INFORMATIONS AU DOS

ICSC: 1270 — Préparé dans le cadre de la coopération entre le Programme International sur la Sécurité Chimique et la Commission Européenne (C) 1999

Fiches Internationales de Sécurité Chimique

DIMETHACRYLATE D'ETHYLENE-GLYCOL

ICSC: 1270

DONNEES IMPORTANTES

ASPECT PHYSIQUE; APPARENCE:
LIQUIDE INCOLORE.

DANGERS PHYSIQUES:
Les vapeurs ne sont pas stabilisées et peuvent polymériser, bloquant les évents.

DANGERS CHIMIQUES:
La substance peut polymériser.

LIMITES D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE (LEP):
Pas de TLV établie.

VOIES D'EXPOSITION:
La substance peut être absorbée par l'organisme par inhalation ou à travers la peau.

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 et les voies respiratoires.

EFFETS DES EXPOSITIONS PROLONGEES OU REPETEES:
Un contact répété ou prolongé peut causer une sensibilisation cutanée.

AIBN : fiche de sécurité internationale

AZOBIS(ISOBUTYRONITRILE)

ICSC: 1090

UNEP

Institut Scientifique de la Santé Publique

2,2'-Azobis(2-méthylpropanenitrile)
2,2'-Azodiisobutyronitrile
2,2'-Diméthyl-2,2'azodipropionitrile
$C_8H_{12}N_4$ / $(CH_3)_2(CN)CN=NC(CN)(CH_3)_2$
Masse moléculaire: 164.2

N° ICSC : 1090
N° CAS : 78-67-1
N° RTECS : UG0800000
N° ONU : 3234
N° CE : 608-019-00-1
20.04.2004 Revu en réunion

TYPES DE RISQUES/ EXPOSITIONS	RISQUES/ SYMPTOMES AIGUS	PREVENTION	PREMIER SECOURS/ AGENTS D'EXTINCTION
INCENDIE	Très inflammable. Explosive.	PAS de flammes nues, PAS d'étincelles et interdiction de fumer.	Eau en grande quantité, eau pulvérisée.
EXPLOSION	Les particules finement dispersées forment des mélanges explosifs dans l'air. Risques d'incendie et d'explosion quand dissous dans les solvants organiques.	Eviter le dépôt de poussières; système en vase clos, équipement électrique et éclairage protégés contre les explosions. Eviter l'accumulation de charges électrostatiques (par mise à la terre, par exemple). NE PAS exposer aux frottements ou aux chocs.	En cas d'incendie: maintenir les fûts, etc., à basse température en les arrosant d'eau.
CONTACT PHYSIQUE		EVITER LA DISPERSION DE POUSSIERE!	
• INHALATION		Aspiration locale ou protection respiratoire.	Air frais, repos. Consulter un médecin.
• PEAU		Gants de protection.	Retirer les vêtements contaminés. Rincer la peau abondamment à l'eau ou prendre une douche.
• YEUX		Lunettes de protection fermées ou protection oculaire associée à une protection respiratoire.	Rincer d'abord abondamment à l'eau pendant plusieurs minutes (retirer si possible les lentilles de contact), puis consulter un médecin.
• INGESTION	Maux de tête. Nausées. Faiblesse. Convulsions.	Ne pas manger, ne pas boire ni fumer pendant le travail.	Faire vomir (SEULEMENT LES PERSONNES CONSCIENTES!) Donner à boire une suspension, dans l'eau, de charbon actif. Consulter un médecin.

DEVERSEMENTS & FUITES	STOCKAGE	CONDITIONNEMENT & ETIQUETAGE
Consulter un expert! NE PAS laisser ce produit contaminer l'environnement. Ecarter toute source d'ignition. Balayer et récupérer la substance répandue dans des récipients couverts; si approprié, humidifier d'abord afin d'éviter la formation de poussière. Protection individuelle: appareil de protection respiratoire à filtre A/P2 pour vapeurs organiques et poussières nocives.	A l'épreuve du feu. Conserver au froid. Séparer des oxydants forts et des matières incompatibles (Voir Dangers Chimiques).	Symbole E Symbole Xn R: 2-11-20/22-52/53 S: 2-39-41-47-61 Classe de danger ONU: 4.1

VOIR IMPORTANTES INFORMATIONS AU DOS

ICSC: 1090

Préparé dans le cadre de la coopération entre le Programme International sur la Sécurité Chimique et la Commission Européenne (C) 1999

Fiches Internationales de Sécurité Chimique

AZOBIS(ISOBUTYRONITRILE)

ICSC: 1090

D O N N E E S

ASPECT PHYSIQUE; APPARENCE:
POUDRE BLANCHE.

DANGERS PHYSIQUES:
A l'état sec, la substance peut se charger d'électricité statique par tourbillonnement, par transport pneumatique, par écoulement, etc.

DANGERS CHIMIQUES:
La substance se décompose sous l'effet de la chaleur , produisant des fumées toxiques comme le tétraméthylsuccinonitrile (voir ICSC 1121) et le cyanure. Peut se décomposer par explosion à la suite de chocs, de frottements ou de secousses. Peut exploser après échauffement. Réagit violemment avec les alcools, les oxydants, les cétones comme l'acétone, les aldéhydes et les hydrocarbures comme l'heptane en provoquant des risques d'incendie et d'explosion.

VOIES D'EXPOSITION:
La substance peut être absorbée par l'organisme par ingestion.

RISQUE D'INHALATION:
L'évaporation à 20°C est négligeable: une concentration dangereuse de particules en suspension dans l'air peut cependant être atteinte rapidement par dispersion.

EFFETS DES EXPOSITIONS DE COURTE DUREE:
La substance peut avoir des effets sur le système nerveux central .

EFFETS DES EXPOSITIONS PROLONGEES OU REPETEES:
La substance peut avoir des effets sur le foie.

Dimethylsulfoxide (DMSO) : fiche de sécurité internationale

DIMETHYLSULFOXYDE

ICSC: 0459

Méthylsulfoxyde
DMSO
C_2H_6OS / $(CH_3)_2SO$
Masse moléculaire: 78.1

N° ICSC : 0459
N° CAS : 67-68-5
N° RTECS : PV6210000
04.10.2000 Revu en réunion

TYPES DE RISQUES/ EXPOSITIONS	RISQUES/ SYMPTOMES AIGUS	PREVENTION	PREMIER SECOURS/ AGENTS D'EXTINCTION
INCENDIE	Combustible. Emission de fumées (ou de gaz) irritantes ou toxiques lors d'incendie.	PAS de flammes nues.	Poudre, eau pulvérisée, mousse, dioxyde de carbone.
EXPLOSION	Au-dessus de 87°C, des mélanges air/vapeur explosifs peuvent se former.	Au-dessus de 87°C, système en vase clos, ventilation et équipement électrique protégés contre les explosions.	En cas d'incendie: maintenir les fûts, etc., à basse température en les arrosant d'eau.
CONTACT PHYSIQUE		EVITER LA FORMATION DE BROUILLARDS! OBSERVER UNE HYGIENE STRICTE!	
• INHALATION	Maux de tête. Nausées.	Ventilation, aspiration locale ou protection respiratoire.	Air frais, repos.
• PEAU	PEUT ETRE ABSORBEE ! Peau sèche.	Gants de protection. Vêtements de protection.	Retirer les vêtements contaminés. Rincer et laver la peau abondamment à l'eau et au savon. Consulter un médecin.
• YEUX	Rougeur. Troubles de la vue.	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	Nausées. Vomissements. Somnolence.	Ne pas manger, ne pas boire ni fumer pendant le travail.	NE PAS faire vomir. Consulter un médecin.

DEVERSEMENTS & FUITES	STOCKAGE	CONDITIONNEMENT & ETIQUETAGE
Ventilation. Recueillir le liquide répandu autant que possible dans des récipients hermétiques. Absorber le liquide restant avec du sable ou avec un absorbant inerte et emporter en lieu sûr. Attention particulière pour éviter l'absorption par la peau. (Protection individuelle spéciale: appareil de protection respiratoire pour gaz et vapeurs organiques).	Séparer des oxydants forts. Conserver au froid. Conserver à l'abri de la lumière. Conserver dans un local bien ventilé.	R: S:

VOIR IMPORTANTES INFORMATIONS AU DOS

ICSC: 0459

Préparé dans le cadre de la coopération entre le Programme International sur la Sécurité Chimique et la Commission Européenne (C) 1999

Fiches Internationales de Sécurité Chimique

DIMETHYLSULFOXYDE

ICSC: 0459

DONNEES IMPORTANTES

ASPECT PHYSIQUE; APPARENCE:
LIQUIDE HYGROSCOPIQUE, INCOLORE .

DANGERS PHYSIQUES:
La vapeur est plus lourde que l'air et peut se propager au niveau du sol; inflammation à distance possible.

DANGERS CHIMIQUES:
La substance se décompose en chauffant fortement ou en brûlant , produisant des fumées toxiques comprenant des oxydes de soufre . Réagit violemment avec les oxydants forts tels que les perchlorates.

LIMITES D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE (LEP):
Pas de TLV établie.

VOIES D'EXPOSITION:
La substance peut être absorbée par l'organisme par inhalation , à travers la peau et par ingestion.

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 et la peau . L'exposition à des concentrations élevées de la substance peut provoquer une diminution de conscience. Peut accélerer l'absorption des autres substances par la peau (voir Notes).

EFFETS DES EXPOSITIONS PROLONGEES OU REPETEES:
Un contact répété ou prolongé avec la peau peut causer une dermatite. La substance peut avoir des effets sur le foie et le sang , entraînant une insuffisance fonctionnelle et des lésions des cellules sanguines .

Acétonitrile : fiche de sécurité internationale

ACETONITRILE

ICSC: 0088

ACETONITRILE
Cyanure de méthyle
Cyanométhane
Ethanenitrile
C_2H_3N/CH_3CN
Masse moléculaire : 41.0

N° CAS : 75-05-8
N° RTECS : AL7700000
N° ICSC : 0088
N° ONU : 1648
N° CE : 608-001-00-3

TYPES DE RISQUES/ EXPOSITIONS	RISQUES/ SYMPTOMES AIGUS	PREVENTION	PREMIER SECOURS/ AGENTS D'EXTINCTION
INCENDIE	Inflammable.	PAS de flammes nues, PAS d'étincelles et interdiction de fumer. PAS de contact avec les agents oxydants.	Mousse résistant aux alcools, poudre, dioxyde de carbone.
EXPLOSION	Les mélanges air/vapeur sont explosifs. Au-dessus de 12.8°C, des mélanges air/vapeur explosifs peuvent se former. Risques d'incendie et d'explosion au contact des agents oxydants.	Au-dessus de 12.8°C, système en vase clos, ventilation et équipement électrique protégés contre les explosions. Eviter l'accumulation de charges électrostatiques (par mise à la terre, par exemple). NE PAS employer d'air comprimé pour remplir, vider ou manipuler.	En cas d'incendie: maintenir les fûts, etc., à basse température en les arrosant d'eau. Les pompiers devraient porter une tenue de protection complète comprenant un appareil de respiration autonome.
CONTACT PHYSIQUE		OBSERVER UNE HYGIENE STRICTE!	
• INHALATION	Mal de gorge. Vomissements. Respiration difficile. Faiblesse. Douleurs abdominales. Convulsions. Perte de conscience. Symptômes d'effets retardés (voir Notes).	Ventilation, aspiration locale ou protection respiratoire.	Air frais, repos. Respiration artificielle si nécessaire. Consulter un médecin.
• PEAU	PEUT ETRE ABSORBEE ! Rougeur. (Suite, voir Inhalation).	Gants de protection. Vêtements de protection.	Retirer les vêtements contaminés. Rincer la peau abondamment à l'eau ou prendre une douche. Consulter un médecin.
• YEUX	Rougeur. Douleur.	Ecran facial, ou protection oculaire associée à une protection respiratoire.	Rincer d'abord abondamment à l'eau pendant plusieurs minutes (retirer si possible les lentilles de contact), puis consulter un médecin.
• INGESTION	(Voir Inhalation).	Ne pas manger, ne pas boire ni fumer pendant le travail. Se laver les mains avant de manger.	Rincer la bouche. Donner abondamment à boire. Faire vomir (SEULEMENT LES PERSONNES CONSCIENTES!). Consulter un médecin.

DEVERSEMENTS & FUITES	STOCKAGE	CONDITIONNEMENT & ETIQUETAGE
Ventilation. Ecarter toute source d'ignition. Recueillir le liquide répandu dans des récipients hermétiques. Absorber le liquide restant avec du sable sec ou avec un absorbant inerte et emporter en lieu sûr. (protection individuelle spéciale: tenue de protection complète comprenant un appareil de protection respiratoire autonome).	A l'épreuve du feu. Séparer des acides, des oxydants. Conserver au froid. Conserver dans un local bien ventilé.	Ne pas transporter avec des aliments ni des produits alimentaires. Symbole F Symbole T R: 11-23/24/25 S: (1/2-)16-27-45 Classe de danger ONU: 3 Classe de danger subsidiaire ONU: 6.1 Classe d'emballage ONU: II

VOIR IMPORTANTES INFORMATIONS AU DOS

ICSC: 0088

Préparé dans le cadre de la coopération entre le Programme International sur la Sécurité Chimique et la Commission Européenne (C) 1993

Fiches internationales de sécurité chimique

ACETONITRILE

ICSC: 0088

DONNEES IMPORT

ASPECT PHYSIQUE; APPARENCE:
LIQUIDE INCOLORE , D'ODEUR CARACTERISTIQUE.

DANGERS PHYSIQUES:
La vapeur est plus lourde que l'air et peut se propager au niveau du sol; inflammation à distance possible. Les vapeurs se mélangent bien à l'air et des mélanges explosifs se forment rapidement. Des charges électrostatiques peuvent se former à la suite de mouvement, d'agitation, etc.

DANGERS CHIMIQUES:
Lors de sa combustion, il se forme des fumées toxiques comprenant du cyanure d'hydrogène et des oxydes d'azote. La substance se décompose au contact d'acides, de l'eau et de la vapeur , produisant des fumées toxiques et des vapeurs inflammables. Réagit avec les oxydants forts en provoquant des risques d'incendie et d'explosion. Attaque certaines formes de plastique, le caoutchouc et les recouvrements de

VOIES D'EXPOSITION:
La substance peut être absorbée par l'organisme par inhalation de ses vapeurs, à travers la peau et par ingestion.

RISQUE D'INHALATION:
Une contamination dangereuse de l'air est rapidement atteinte lors de l'évaporation de cette substance à 20°C.

EFFETS DES EXPOSITIONS DE COURTE DUREE:
La substance est irritante pour les yeux, la peau et les voies respiratoires. La substance peut avoir des effets sur la respiration cellulaire (inhibition) , entraînant une insuffisance fonctionnelle. L'exposition à des concentrations élevées peut entraîner la mort. Les effets peuvent être retardés. L'observation médicale est conseillée.

Annexe 3 : Microscope électronique à balayage (MEB)

Principe

Le fonctionnement du microscope est basé sur l'émission d'électrons produits par une cathode et la détection de signaux provenant de l'interaction de ces électrons avec l'échantillon (électrons secondaires et rétrodiffusés). Un faisceau primaire d'électrons de diamètre compris entre 5 et 20 nm et d'énergie allant de quelques kev à 50 kev est focalisé sur l'échantillon (sous vide). Ce faisceau est balayé sur la surface à étudier par un système de déflexion (Figure 1.7).

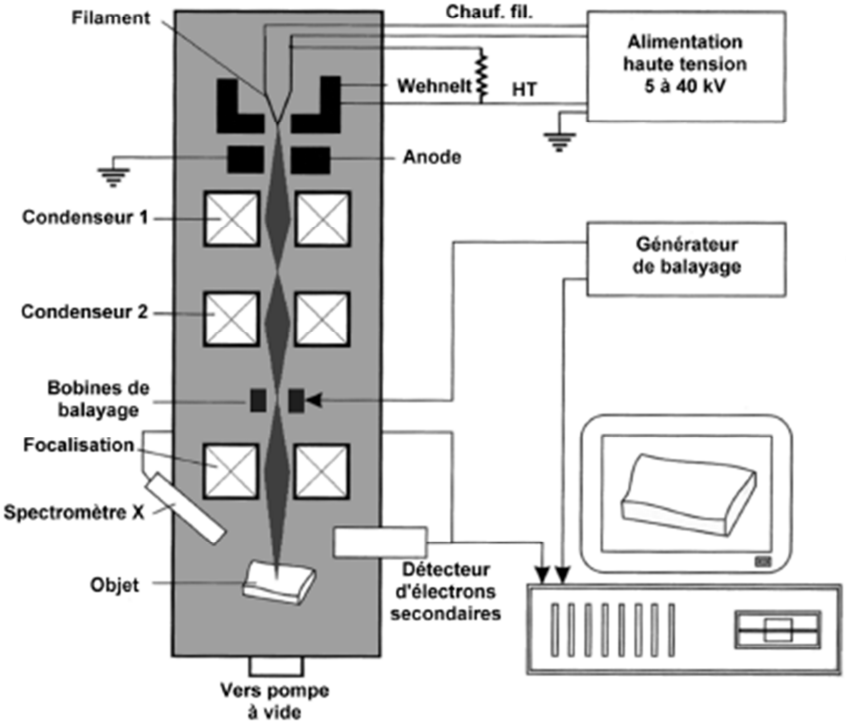


Figure : Principe du microscope électronique à balayage.

Les électrons émis par l'échantillon sont détectés par un scintillateur couplé à un photomultiplicateur. Le signal obtenu est amplifié et sert à moduler l'intensité du faisceau

d'un oscilloscope dont le balayage est synchrone avec celui du faisceau primaire. A chaque point de la zone balayée sur l'échantillon correspond donc un point sur l'écran de visualisation. L'image est obtenue séquentiellement point par point en déplaçant le faisceau d'électrons. Le grandissement s'obtient en changeant les dimensions de la zone balayée. Le contraste de l'image observée provient pour l'essentiel des différences de relief qui existent sur l'échantillon. Trois composants entrent en jeu [1] :

1. l'effet de l'angle d'inclinaison de la surface de l'échantillon avec la direction du faisceau incident. L'émission des électrons secondaires augmente lorsque cet angle diminue.
2. l'effet d'ombrage : le détecteur, monté latéralement sur le microscope, est dans une position telle que toutes les parties de l'échantillon ne le "voient" pas sous la même incidence. Le détecteur peut "voir" dans les trous ou derrière les arêtes, mais dans ce cas l'intensité reçue au détecteur est plus faible ; les régions cachées au détecteur paraissent donc plus sombres.
3. l'effet de pointe : l'émission secondaire est plus intense sur les pointes ou sur les arêtes fines.

Le microscope électronique à balayage du laboratoire PHASE est un appareil de marque JSM 35 CF. Il est caractérisé par une résolution de 5 nm (distance de travail 15 mm) et une profondeur de champ de l'ordre de 30 μm (x 1000).

Avantages et inconvénients de la technique MEB

La taille des échantillons à analyser représente un des grands avantages du MEB, qui peut aller de quelques micromètres cubes à quelques centimètres cubes. Le MEB a la particularité d'offrir une grande profondeur de champ allant jusqu'à plusieurs centaines de microns.

Par contre, les systèmes standard souffrent d'un certain nombre d'inconvénients connus, tels que :

- La mise sous vide.
- Les difficultés de calibration.
- L'échantillon doit être conducteur ou rendu conducteur par dépôt d'une couche mince d'or de 10 à 30 nm d'épaisseur (en général) afin d'éviter l'accumulation des charges électriques qui risque de créer des champs parasites et de perturber l'image.
- Il faut s'assurer que l'échantillon soit de nature à supporter le bombardement électronique souvent intense dans le vide. La majeure partie de l'énergie primaire du

faisceau est dissipée sous forme de chaleur dans l'échantillon, ce qui peut entraîner une dégradation ou une fusion locale. Ce sera le risque avec les polymères (la résine photosensible par exemple) ou les échantillons biologiques.

Remarque :

Avec les MEB récents du type "environnementaux", grâce à des détecteurs performants, on peut observer des échantillons hydratés ou contenant des substances volatiles sans préparation préalable. D'ailleurs, les ions positifs produits par les collisions entre les électrons et les gaz présents dans la chambre d'observation sont attirés vers la surface de l'échantillon de manière à annuler en grande partie des effets de chargement. Si de nouvelles formes de contraste intéressantes ont été constatées dans ces conditions, la qualité des images reste néanmoins réduite par rapport à un MEB à haut vide. La résolution est moins bonne par rapport à celle d'un MEB normal, mais cela est compensé par l'observation d'un objet réel.

[1] G. P. Young, « Population-based screening for colorectal cancer: Australian research and implementation », *J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 24 Suppl 3, p. S33‑42, oct. 2009.

[2] S. J. Winawer, « Screening of colorectal cancer », *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, vol. 14, n° 4, p. 699‑722, oct. 2005.

[3] A. Belot, P. Grosclaude, N. Bossard, E. Jougla, E. Benhamou, P. Delafosse, A.-V. Guizard, F. Molinié, A. Danzon, S. Bara, A.-M. Bouvier, B. Trétarre, F. Binder-Foucard, M. Colonna, L. Daubisse, G. Hédelin, G. Launoy, N. Le Stang, M. Maynadié, A. Monnereau, X. Troussard, J. Faivre, A. Collignon, I. Janoray, P. Arveux, A. Buemi, N. Raverdy, C. Schvartz, M. Bovet, L. Chérié-Challine, J. Estève, L. Remontet, et M. Velten, « Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005 », *Rev Epidemiol Sante Publique*, vol. 56, n° 3, p. 159‑175, juin 2008.

[4] B. Denis, I. Gendre, F. Aman, F. Ribstein, P. Maurin, et P. Perrin, « Colorectal cancer screening with the addition of flexible sigmoidoscopy to guaiac-based faecal occult blood testing: A French population-based controlled study (Wintzenheim trial) », *European Journal of Cancer*, vol. 45, n° 18, p. 3282‑3290, 2009.

[5] L. Alnaim, « Therapeutic drug monitoring of cancer chemotherapy », *J Oncol Pharm Pract*, vol. 13, n° 4, p. 207‑221, déc. 2007.

[6] I. E. Tothill, « Biosensors for cancer markers diagnosis », *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, n° 1, p. 55‑62, févr. 2009.

[7] K. Nakano, T. Nakao, K. H. Schram, W. M. Hammargren, T. D. McClure, M. Katz, et E. Petersen, « Urinary excretion of modified nucleosides as biological marker of RNA turnover in patients with cancer and AIDS », *Clin. Chim. Acta*, vol. 218, n° 2, p. 169‑183, sept. 1993.

[8] J.-Q. Zhang, Y.-S. Wang, Y. He, T. Jiang, H.-M. Yang, X. Tan, R.-H. Kang, Y.-K. Yuan, et L.-F. Shi, « Determination of urinary adenosine using resonance light scattering of gold nanoparticles modified structure-switching aptamer », *Analytical Biochemistry*, vol. 397, n° 2, p. 212‑217, févr. 2010.

[9] J.-Q. Zhang, Y.-S. Wang, J.-H. Xue, Y. He, H.-X. Yang, J. Liang, L.-F. Shi, et X.-L. Xiao, « A gold nanoparticles-modified aptamer beacon for urinary adenosine detection based on structure-switching/fluorescence-“turning on” mechanism », *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 70, p. 362‑368, nov. 2012.

[10] T. Vo-Dinh, « Biosensors and Biochips », in *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*, M. Ferrari, R. Bashir, et S. Wereley, Éd. Springer US, 2007, p. 1‑20.

[11] R. T. Fortner, A. H. Eliassen, D. Spiegelman, W. C. Willett, R. L. Barbieri, et S. E. Hankinson, « Premenopausal endogenous steroid hormones and breast cancer risk: results from the Nurses’ Health Study II », *Breast Cancer Research*, vol. 15, n° 2, p. R19, mars 2013.

[12] M. Pruvot, T. L. Forde, J. Steele, S. J. Kutz, J. D. Buck, F. van der Meer, et K. Orsel, « The modification and evaluation of an ELISA test for the surveillance of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in wild ruminants », *BMC Veterinary Research*, vol. 9, n° 1, p. 5, janv. 2013.

[13] R. Agius, T. Nadulski, H.-G. Kahl, et B. Dufaux, « Comparison of LUCIO®-direct ELISA with CEDIA immunoassay for ‘zero tolerance’ drug screening in urine as required by the German re-licensing guidelines », *Drug Testing and Analysis*,, 2013.

[14] D. Diamond, Éd., *Principles of Chemical and Biological Sensors*, 1re éd. Wiley-Interscience, 1998.

[15] J. Polster, G. Prestel, M. Wollenweber, G. Kraus, et G. Gauglitz, « Simultaneous determination of penicillin and ampicillin by spectral fibre-optical enzyme optodes and multivariate data analysis based on transient signals obtained by flow injection analysis », *Talanta*, vol. 42, n° 12, p. 2065‑2072, déc. 1995.

[16] Z. Li, X. Wang, G. Wen, S. Shuang, C. Dong, M. C. Paau, et M. M. F. Choi, « Application of hydrophobic palladium nanoparticles for the development of electrochemical glucose biosensor », *Biosens Bioelectron*, vol. 26, n° 11, p. 4619‑4623, juill. 2011.

[17] F. R. R. Teles et L. P. Fonseca, « Trends in DNA biosensors », *Talanta*, vol. 77, n° 2, p. 606‑623, déc. 2008.

[18] L. Gorton, *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*. Elsevier, 2005.

[19] C.-H. Yeh, Y.-H. Chang, H.-P. Lin, T.-C. Chang, et Y.-C. Lin, « A newly developed optical biochip for bacteria detection based on DNA hybridization », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 161, n° 1, p. 1168‑1175, janv. 2012.

[20] S. Liu, J. Liu, X. Han, Y. Cui, et W. Wang, « Electrochemical DNA biosensor fabrication with hollow gold nanospheres modified electrode and its enhancement in DNA immobilization and hybridization », *Biosens Bioelectron*, vol. 25, n° 7, p. 1640‑1645, mars 2010.

[21] P. Banerjee et A. K. Bhunia, « Cell-based biosensor for rapid screening of pathogens and toxins », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, n° 1, p. 99‑106, sept. 2010.

[22] H. Yoon, J.-H. Kim, N. Lee, B.-G. Kim, et J. Jang, « A Novel Sensor Platform Based on Aptamer-Conjugated Polypyrrole Nanotubes for Label-Free Electrochemical Protein Detection », *ChemBioChem*, vol. 9, n° 4, p. 634 ‑ 641, 2008.

[23] O. S. Kwon, S. J. Park, et J. Jang, « A high-performance VEGF aptamer functionalized polypyrrole nanotube biosensor », *Biomaterials*, vol. 31, n° 17, p. 4740‑4747, juin 2010.

[24] F. Chauveau, C. Pestourie, et B. Tavitian, « [Aptamers: selection and scope of applications] », *Pathol. Biol.*, vol. 54, n° 4, p. 251‑258, mai 2006.

[25] F. Horemans, J. Alenus, E. Bongaers, A. Weustenraed, R. Thoelen, J. Duchateau, L. Lutsen, D. Vanderzande, P. Wagner, et T. J. Cleij, « MIP-based sensor platforms for the detection of histamine in the nano- and micromolar range in aqueous media », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 148, n° 2, p. 392‑398, juill. 2010.

[26] E. Prats-Alfonso, X. Sisquella, N. Zine, G. Gabriel, A. Guimerà, F. J. del Campo, R. Villa, A. H. Eisenberg, M. Mrksich, A. Errachid, J. Aguiló, et F. Albericio, « Cancer Prognostics by Direct Detection of p53-Antibodies on Gold Surfaces by Impedance Measurements », *Small*, vol. 8, n° 13, p. 2106–2115, 2012.

[27] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, et G. S. Wilson, « Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, n° 1‑2, p. 121‑131, janv. 2001.

[28] D. Kriz et K. Mosbach, « Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer », *Analytica Chimica Acta*, vol. 300, n° 1‑3, p. 71‑75, janv. 1995.

[29] M. Pesavento, G. D'Agostino, R. Biesuz, et G. Alberti, « Molecularly Imprinted Polymer-Based Sensors for Amperometric Determination of Nonelectroactive Substances », *Electroanalysis*, vol. 21, n° 3‑5, p. 604–611, 2009.

[30] J. de R. M. Neto, W. de J. R. Santos, P. R. Lima, S. M. C. N. Tanaka, A. A. Tanaka, et L. T. Kubota, « A hemin-based molecularly imprinted polymer (MIP) grafted onto a glassy carbon electrode as a selective sensor for 4-aminophenol amperometric », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 152, n° 2, p. 220‑225, mars 2011.

[31] M. C. Blanco-Lopez, M. J. Lobo-Castanon, A. J. Miranda-Ordieres, et P. Tunon-Blanco, « Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers », *TrAC. Trends in analytical chemistry*, vol. 23, n° 1, p. 36‑48.

[32] L. Y. Heng et E. A. Hall, « Producing "self-plasticizing" ion-selective membranes », *Anal. Chem.*, vol. 72, n° 1, p. 42‑51, janv. 2000.

[33] T. Kitade, K. Kitamura, T. Konishi, S. Takegami, T. Okuno, M. Ishikawa, M. Wakabayashi, K. Nishikawa, et Y. Muramatsu, « Potentiometric immunosensor using artificial antibody based on molecularly imprinted polymers », *Anal. Chem.*, vol. 76, n° 22, p. 6802‑6807, nov. 2004.

[34] Y. Liu, L. Zhu, Z. Luo, et H. Tang, « Fabrication of molecular imprinted polymer sensor for chlortetracycline based on controlled electrochemical reduction of graphene oxide », *Sensors and Actuators B: Chemical*.

[35] S. Sadeghi, F. Fathi, et J. Abbasifar, « Potentiometric sensing of levamisole hydrochloride based on molecularly imprinted polymer », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 122, n° 1, p. 158‑164, mars 2007.

[36] R. Liang, R. Zhang, et W. Qin, « Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 141, n° 2, p. 544‑550, sept. 2009.

[37] K. K. Reddy et K. V. Gobi, « Artificial molecular recognition material based biosensor for creatinine by electrochemical impedance analysis », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 183, p. 356‑363, juill. 2013.

[38] M. C. Blanco-López, M. J. Lobo-Castañón, A. J. Miranda-Ordieres, et P. Tuñón-Blanco, « Voltammetric sensor for vanillylmandelic acid based on molecularly imprinted polymer-modified electrodes », *Biosens Bioelectron*, vol. 18, n° 4, p. 353‑362, avr. 2003.

[39] A. C. Roy, V. S. Nisha, C. Dhand, M. A. Ali, et B. D. Malhotra, « Molecularly imprinted polyaniline-polyvinyl sulphonic acid composite based sensor for para-nitrophenol detection », *Analytica Chimica Acta*, vol. 777, p. 63‑71, mai 2013.

[40] M.-H. Lee, J. L. Thomas, Y.-L. Chen, C.-F. Lin, H.-H. Tsai, Y.-Z. Juang, B.-D. Liu, et H.-Y. Lin, « Optical sensing of urinary melatonin with molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol) coated zinc oxide nanorod arrays », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 47, p. 56‑61, sept. 2013.

[41] C. Sulitzky, B. Rückert, A. J. Hall, F. Lanza, K. Unger, et B. Sellergren, « Grafting of Molecularly Imprinted Polymer Films on Silica Supports Containing Surface-Bound Free Radical Initiators », *Macromolecules*, vol. 35, n° 1, p. 79‑91, janv. 2002.

[42] T. Jing, H. Du, Q. Dai, H. Xia, J. Niu, Q. Hao, S. Mei, et Y. Zhou, « Magnetic molecularly imprinted nanoparticles for recognition of lysozyme », *Biosens Bioelectron*, vol. 26, n° 2, p. 301‑306, oct. 2010.

[43] P. Leonard, S. Hearty, J. Brennan, L. Dunne, J. Quinn, T. Chakraborty, et R. O'Kennedy, « Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water », *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, n° 1, p. 3‑13, janv. 2003.

[44] K. Taniwaki, A. Hyakutake, T. Aoki, M. Yoshikawa, M. D. Guiver, et G. P. Robertson, « Evaluation of the recognition ability of molecularly imprinted materials by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy », *Analytica Chimica Acta*, vol. 489, n° 2, p. 191‑198, août 2003.

[45] S. Li, Y. Ge, et A. P. F. Turner, « A Catalytic and Positively Thermosensitive Molecularly Imprinted Polymer », *Advanced Functional Materials*, vol. 21, n° 6, p. 1194–1200, 2011.

[46] H. Bao, T. Wei, H. Meng, et B. Liu, « Surface Plasmon Resonance Sensor for Supersensitive Detection of Clenbuterol Using Molecularly Imprinted Film », *Chemistry Letters*, vol. 41, n° 3, p. 237‑239, 2012.

[47] N. Cennamo, M. Pesavento, G. D'Agostino, R. Galatus, L. Bibbò, et L. Zeni, « Detection of trinitrotoluene based on SPR in molecularly imprinted polymer on plastic optical fiber », p. 879412‑879412, mai 2013.

[48] H. Tarbague, « Étude et mise au point d'une plateforme de biodétection de micro-organismes couplant immunocapteur à ondes de love et dispositifs PDMS microfluidique », these de doctorat, Université Bordeaux I, France, 2011.

[49] G. Sauerbrey, « Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung », vol. 155, n° 2, p. 206‑222, 1959.

[50] K. Haupt, K. Noworyta, et W. Kutner, « Imprinted polymer-based enantioselective acoustic sensor using a quartz crystal microbalance », *Anal. Commun.*, vol. 36, n° 11‑12, p. 391‑393, janv. 1999.

[51] F. Liu, X. Liu, S.-C. Ng, et H. S.-O. Chan, « Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of l-tryptophan », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 113, n° 1, p. 234‑240, janv. 2006.

[52] M. R. Guerra, I. Chianella, E. V. Piletska, K. Karim, A. P. F. Turner, et S. A. Piletsky, « Development of a piezoelectric sensor for the detection of methamphetamine », *Analyst*, vol. 134, n° 8, p. 1565‑1570, juill. 2009.

[53] S. E. Diltemiz, D. Hür, R. Keçili, A. Ersöz, et R. Say, « New synthesis method for 4-MAPBA monomer and using for the recognition of IgM and mannose with MIP-based QCM sensors », *Analyst*, vol. 138, n° 5, p. 1558‑1563, févr. 2013.

[54] F. L. Dickert et S. Thierer, « Molecularly imprinted polymers for optochemical sensors », *Advanced Materials*, vol. 8, n° 12, p. 987–990, 1996.

[55] C. Liang, H. Peng, X. Bao, L. Nie, et S. Yao, « Study of a molecular imprinting polymer coated BAW bio-mimic sensor and its application to the determination of caffeine in human serum and urine », *Analyst*, vol. 124, n° 12, p. 1781‑1785, janv. 1999.

[56] C. Liang, H. Peng, A. Zhou, L. Nie, et S. Yao, « Molecular imprinting polymer coated BAW bio-mimic sensor for direct determination of epinephrine », *Analytica Chimica Acta*, vol. 415, n° 1‑2, p. 135‑141, juin 2000.

[57] H. Peng, C. Liang, D. He, L. Nie, et S. Yao, « Bulk acoustic wave sensor using molecularly imprinted polymers as recognition elements for the determination of pyrimethamine », *Talanta*, vol. 52, n° 3, p. 441‑448, juin 2000.

[58] J. Slobodnik, A.J. et A. J. Budreau, « Acoustic surface wave loss mechanisms on Bi12GeO20 at microwave frequencies », *Journal of Applied Physics*, vol. 43, n° 8, p. 3278‑3283, 1972.

[59] R. Dessy et H. Wohltjen, « An instrument simulator for use in computer interfacing laboratories », *J. Chem. Educ.*, vol. 56, n° 3, p. 153, mars 1979.

[60] C. Caliendo, P. Verardi, E. Verona, A. D'Amico, C. D. Natale, G. Saggio, M. Serafini, R. Paolesse, et S. E. Huq, « Advances in SAW-based gas sensors », *Smart Mater. Struct.*, vol. 6, n° 6, p. 689, déc. 1997.

[61] C. Mah et K. B. Thurbide, « Acoustic methods of detection in gas chromatography », *Journal of Separation Science*, vol. 29, n° 12, p. 1922–1930, 2006.

[62] J. E. Roederer et G. J. Bastiaans, « Microgravimetric immunoassay with piezoelectric crystals », *Anal. Chem.*, vol. 55, n° 14, p. 2333‑2336, déc. 1983.

[63] N. Moll, « Étude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries », These de doctorat, Université Bordeaux I, Bordeaux, 2007.

[64] P. Turkewitsch, R. Massé, et W. S. Powell, « Molecular Imprinting », in *Advanced Concepts in Fluorescence Sensing*, C. D. Geddes et J. R. Lakowicz, Éd. Boston, MA: Springer US, 2005, p. 157‑209.

[65] B. Sellergren, *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry*. Elsevier, 2000.

[66] F. H. Dickey, « The Preparation of Specific Adsorbents », *PNAS*, vol. 35, n° 5, p. 227‑229, janv. 1949.

[67] G. Wulff, A. Sarhan, et K. Zabrocki, « Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates », *Tetrahedron Letters*, vol. 14, n° 44, p. 4329‑4332, 1973.

[68] D. R. Kryscio et N. A. Peppas, « Surface imprinted thin polymer film systems with selective recognition for bovine serum albumin », *Analytica Chimica Acta*, vol. 718, p. 109‑115, 2012.

[69] G. Vasapollo, R. D. Sole, L. Mergola, M. R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, et G. Mele, « Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, n° 12, p. 5908‑5945, sept. 2011.

[70] B. Sellergren et K. J. Shea, « Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers », *Journal of Chromatography A*, vol. 635, n° 1, p. 31‑49, avr. 1993.

[71] G. Wulff, « Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates - A way towards artificial antibodies », *Angewandte Chemie - International Edition in English*, vol. 34, n° 17, p. 1812‑1832, 1995.

[72] E. L. Holthoff et F. V. Bright, « Molecularly imprinted xerogels as platforms for sensing », *Acc. Chem. Res.*, vol. 40, n° 9, p. 756‑767, sept. 2007.

[73] R. Arshady et K. Mosbach, « Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization », *Die Makromolekulare Chemie*, vol. 182, n° 2, p. 687–692, 1981.

[74] N. Pérez, M. J. Whitcombe, et E. N. Vulfson, « Surface Imprinting of Cholesterol on Submicrometer Core−Shell Emulsion Particles », *Macromolecules*, vol. 34, n° 4, p. 830‑836, févr. 2001.

[75] Y. Uluda, S. A. Piletsky, A. P. F. Turner, et M. A. Cooper, « Piezoelectric sensors based on molecular imprinted polymers for detection of low molecular mass analytes », *FEBS Journal*, vol. 274, n° 21, p. 5471‑5480, 2007.

[76] M. Jakusch, M. Janotta, B. Mizaikoff, K. Mosbach, et K. Haupt, « Molecularly Imprinted Polymers and Infrared Evanescent Wave Spectroscopy. A Chemical Sensors Approach », *Anal. Chem.*, vol. 71, n° 20, p. 4786‑4791, oct. 1999.

[77] A. Kugimiya et T. Takeuchi, « Molecularly Imprinted Polymer-Coated Quartz Crystal Microbalance for Detection of Biological Hormone », *Electroanalysis*, vol. 11, n° 15, p. 1158–1160, nov. 1999.

[78] C. J. Percival, S. Stanley, T. M. Galle, A. Braithwaite, M. I. Newton, G. McHale, et W. Hayes, « Molecular-imprinted, polymer-coated quartz crystal microbalances for the detection of terpenes », *Anal. Chem.*, vol. 73, n° 17, p. 4225‑4228, sept. 2001.

[79] F. L. Dickert, P. Lieberzeit, S. G. Miarecka, K. J. Mann, O. Hayden, et C. Palfinger, « Synthetic receptors for chemical sensors - Subnano- and micrometre patterning by imprinting techniques », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, n° 6, p. 1040‑1044, 2004.

[80] T.-Y. Lin, C.-H. Hu, et T.-C. Chou, « Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, n° 1, p. 75‑81, juill. 2004.

[81] B. S. Ebarvia et F. Sevilla, « Piezoelectric quartz sensor for caffeine based on molecularly imprinted polymethacrylic acid », *Sensors and actuators. B, Chemical*, vol. 107, n° 2, p. 782‑790.

[82] T. Piacham, Å. Josell, H. Arwin, V. Prachayasittikul, et L. Ye, « Molecularly imprinted polymer thin films on quartz crystal microbalance using a surface bound photo-radical initiator », *Analytica Chimica Acta*, vol. 536, n° 1‑2, p. 191‑196, avr. 2005.

[83] A.-H. Wu et M.-J. Syu, « Synthesis of bilirubin imprinted polymer thin film for the continuous detection of bilirubin in an MIP/QCM/FIA system », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, n° 12, p. 2345‑2353, juin 2006.

[84] N. Tsuru, M. Kikuchi, H. Kawaguchi, et S. Shiratori, « A quartz crystal microbalance sensor coated with MIP for “bisphenol A” and its properties », *Thin Solid Films*, vol. 499, n° 1‑2, p. 380‑385, 2006.

[85] H. Liao, Z. Zhang, L. Nie, et S. Yao, « Electrosynthesis of imprinted polyacrylamide membranes for the stereospecific L-histidine sensor and its characterization by AC impedance spectroscopy and piezoelectric quartz crystal technique », *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 59, n° 1, p. 75‑87, avr. 2004.

[86] L. Feng, Y. Liu, Y. Tan, et J. Hu, « Biosensor for the determination of sorbitol based on molecularly imprinted electrosynthesized polymers », *Biosens Bioelectron*, vol. 19, n° 11, p. 1513‑1519, juin 2004.

[87] M. Ávila, M. Zougagh, Á. Ríos, et A. Escarpa, « Molecularly imprinted polymers for selective piezoelectric sensing of small molecules », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 27, n° 1, p. 54‑65, janv. 2008.

[88] M. Lasáková et P. Jandera, « Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction », *J Sep Sci*, vol. 32, n° 5‑6, p. 799‑812, mars 2009.

[89] B. Sellergren, « Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. », *Journal of chromatography. A*, vol. 906, n° 1‑2, p. 227‑52, 2001.

[90] M. Kempe et K. Mosbach, « Separation of amino acids, peptides and proteins on molecularly imprinted stationary phases », *Journal of Chromatography A*, vol. 691, n° 1‑2, p. 317‑323, févr. 1995.

[91] B. Sellergren, B. Ekberg, et K. Mosbach, « Molecular imprinting of amino acid derivatives in macroporous polymers : Demonstration of substrate- and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino acid derivatives », *Journal of Chromatography A*, vol. 347, p. 1‑10, 1985.

[92] M. Monier et A. M. A. El-Sokkary, « Preparation of molecularly imprinted cross-linked chitosan/glutaraldehyde resin for enantioselective separation of l-glutamic acid », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 47, n° 2, p. 207‑213, août 2010.

[93] J. Haginaka, H. Sanbe, et H. Takehira, « Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-ibuprofen: Retention properties in aqueous mobile phases », *Journal of Chromatography A*, vol. 857, n° 1‑2, p. 117‑125, oct. 1999.

[94] M. Kempe et K. Mosbach, « Direct resolution of naproxen on a non-covalently molecularly imprinted chiral stationary phase », *Journal of Chromatography A*, vol. 664, n° 2, p. 276‑279, avr. 1994.

[95] R. J. Ansell, « Molecularly imprinted polymers for the enantioseparation of chiral drugs », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, n° 12, p. 1809‑1835, déc. 2005.

[96] F. G. Tamayo, E. Turiel, et A. Martín-Esteban, « Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends », *Journal of Chromatography A*, vol. 1152, n° 1‑2, p. 32‑40, juin 2007.

[97] E. Caro, R. M. Marcé, F. Borrull, P. A. G. Cormack, et D. C. Sherrington, « Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 25, n° 2, p. 143‑154, févr. 2006.

[98] D. Spivak, M. A. Gilmore, et K. J. Shea, « Evaluation of Binding and Origins of Specificity of 9-Ethyladenine Imprinted Polymers », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, n° 19, p. 4388‑4393, mai 1997.

[99] S. Scorrano, L. Longo, et G. Vasapollo, « Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of 1-methyladenosine from human urine », *Anal. Chim. Acta*, vol. 659, n° 1‑2, p. 167‑171, févr. 2010.

[100] R. Del Sole, A. Scardino, M. R. Lazzoi, et G. Vasapollo, « Molecularly imprinted polymer for solid phase extraction of nicotinamide in pork liver samples », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 120, n° 3, p. 1634–1641, 2011.

[101] M. Javanbakht, M. H. Namjumanesh, et B. Akbari-Adergani, « Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of bromhexine in human serum and urine with high performance liquid chromatography », *Talanta*, vol. 80, n° 1, p. 133‑138.

[102] P. Qi, J. Wang, J. Jin, F. Su, et J. Hen, « 2,4-Dimethylphenol imprinted polymers as a solid-phase extraction sorbent for class-selective extraction of phenolic compounds from environmental water », *Talanta*, vol. 81, n° 4‑5, p. 1630‑1635.

[103] F. G. Tamayo, J. L. Casillas, et A. Martin-Esteban, « Highly selective fenuron-imprinted polymer with a homogeneous binding site distribution prepared by precipitation polymerisation and its application to the clean-up of fenuron in plant samples », *Analytica Chimica Acta*, vol. 482, n° 2, p. 165‑173, avr. 2003.

[104] E. Caro, R. M. Marcé, P. A. G. Cormack, D. C. Sherrington, et F. Borrull, « Molecularly imprinted solid-phase extraction of naphthalene sulfonates from water », *Journal of Chromatography A*, vol. 1047, n° 2, p. 175‑180, août 2004.

[105] A. Molinelli, R. Weiss, et B. Mizaikoff, « Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine », *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 50, n° 7, p. 1804‑1808.

[106] K. Farrington, E. Magner, et F. Regan, « Predicting the performance of molecularly imprinted polymers : Selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction », *Analytica chimica acta*, vol. 566, n° 1, p. 60‑68.

[107] B. Sellergren, « Direct Drug Determination by Selective Sample Enrichment on an Imprinted Polymer », *Anal. Chem.*, vol. 66, n° 9, p. 1578‑1582, mai 1994.

[108] W. Li et S. Li, « Molecular Imprinting: A Versatile Tool for Separation, Sensors and Catalysis », in *Oligomers - Polymer Composites - Molecular Imprinting*, Springer Berlin Heidelberg, 2007, p. 191‑210.

[109] G. Wulff, « Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers », *Chem. Rev.*, vol. 102, n° 1, p. 1‑27, janv. 2002.

[110] K. M. Shokat, C. J. Leumann, R. Sugasawara, et P. G. Schultz, « A new strategy for the generation of catalytic antibodies », *Nature*, vol. 338, n° 6212, p. 269‑271, mars 1989.

[111] O. Ramström et K. Mosbach, « Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials », *Curr Opin Chem Biol*, vol. 3, n° 6, p. 759‑764, déc. 1999.

[112] A. Leonhardt et K. Mosbach, « Enzyme-mimicking polymers exhibiting specific substrate binding and catalytic functions », *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*, vol. 6, n° 2‑3, p. 285‑290, oct. 1987.

[113] M. Javanbakht, S. E. Fard, A. Mohammadi, M. Abdouss, M. R. Ganjali, P. Norouzi, et L. Safaraliee, « Molecularly imprinted polymer based potentiometric sensor for the determination of hydroxyzine in tablets and biological fluids », *Anal. Chim. Acta*, vol. 612, n° 1, p. 65‑74, mars 2008.

[114] S. A. Piletsky, N. W. Turner, et P. Laitenberger, « Molecularly imprinted polymers in clinical diagnostics—Future potential and existing problems », *Medical Engineering & Physics*, vol. 28, n° 10, p. 971‑977, déc. 2006.

[115] S. Lépinay, K. Kham, M.-C. Millot, et B. Carbonnier, « In-situ polymerized molecularly imprinted polymeric thin films used as sensing layers in surface plasmon resonance sensors: Mini-review focused on 2010–2011 », *Chem. Pap.*, vol. 66, n° 5, p. 340‑351, mai 2012.

[116] O. Y. F. Henry, S. A. Piletsky, et D. C. Cullen, « Fabrication of molecularly imprinted polymer microarray on a chip by mid-infrared laser pulse initiated polymerisation », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, n° 12, p. 1769‑1775, juill. 2008.

[117] E. Yildirim, E. Turan, et T. Caykara, « Construction of myoglobin imprinted polymer films by grafting from silicon surface », *J. Mater. Chem.*, vol. 22, n° 2, p. 636‑642, déc. 2011.

[118] R. Pernites, R. Ponnapati, M. J. Felipe, et R. Advincula, « Electropolymerization molecularly imprinted polymer (E-MIP) SPR sensing of drug molecules: Pre-polymerization complexed terthiophene and carbazole electroactive monomers », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, n° 5, p. 2766‑2771, janv. 2011.

[119] C.-H. Weng, W.-M. Yeh, K.-C. Ho, et G.-B. Lee, « A microfluidic system utilizing molecularly imprinted polymer films for amperometric detection of morphine », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 121, n° 2, p. 576‑582, févr. 2007.

[120] M.-J. Syu, T.-C. Chiu, C.-Y. Lai, et Y.-S. Chang, « Amperometric detection of bilirubin from a micro-sensing electrode with a synthetic bilirubin imprinted

poly(MAA-co-EGDMA) film », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, n° 4, p. 550‑557, oct. 2006.

[121] K. Prasad, K. P. Prathish, J. M. Gladis, G. R. K. Naidu, et T. P. Rao, « Molecularly imprinted polymer (biomimetic) based potentiometric sensor for atrazine », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 123, n° 1, p. 65‑70, avr. 2007.

[122] T. A. Sergeyeva, S. A. Piletsky, A. A. Brovko, E. A. Slinchenko, L. M. Sergeeva, et A. V. El'skaya, « Selective recognition of atrazine by molecularly imprinted polymer membranes. Development of conductometric sensor for herbicides detection », *Analytica Chimica Acta*, vol. 392, n° 2‑3, p. 105‑111, juin 1999.

[123] S. A. Piletsky, E. V. Piletskaya, K. Yano, A. Kugimiya, A. V. Elgersma, R. Levi, U. Kahlow, T. Takeuchi, I. Karube, T. I. Panasyuk, et A. V. El'skaya, « A biomimetic receptor system for sialic acid based on molecular imprinting », *Analytical Letters*, vol. 29, n° 2, p. 157‑170, 1996.

[124] E. P. Lai, A. Fafara, V. A. VanderNoot, M. Kono, et B. Polsky, « Surface plasmon resonance sensors using molecularly imprinted polymers for sorbent assay of theophylline, caffeine, and xanthine », *Canadian Journal of Chemistry*, vol. 76, n° 3, p. 265‑273, mars 1998.

[125] B. K. Lavine, D. J. Westover, N. Kaval, N. Mirjankar, L. Oxenford, et G. K. Mwangi, « Swellable molecularly imprinted polyN-(N-propyl)acrylamide particles for detection of emerging organic contaminants using surface plasmon resonance spectroscopy », *Talanta*, vol. 72, n° 3, p. 1042‑1048, 2007.

[126] Z. Yang et C. Zhang, « Designing of MIP-based QCM sensor for the determination of Cu(II) ions in solution », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 142, n° 1, p. 210‑215, oct. 2009.

[127] W. Wen, H. Shitang, L. Shunzhou, L. Minghua, et P. Yong, « Enhanced sensitivity of SAW gas sensor coated molecularly imprinted polymer incorporating high frequency stability oscillator », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 125, n° 2, p. 422‑427, août 2007.

[128] B. Jakoby, G. M. Ismail, M. P. Byfield, et M. J. Vellekoop, « Novel molecularly imprinted thin film applied to a Love wave gas sensor », *Sensors and Actuators, A: Physical*, vol. 76, n° 1‑3, p. 93‑97, 1999.

[129] R. H. Schmidt, K. Mosbach, et K. Haupt, « A Simple Method for Spin-Coating Molecularly Imprinted Polymer Films of Controlled Thickness and Porosity », *Advanced Materials*, vol. 16, n° 8, p. 719–722, 2004.

[130] G. Paumier, « Technologies PNIPAM pour les laboratoires sur puce », thèse de doctorat, Université Toulouse, France, 2008.

[131] Y. Fuchs, O. Soppera, et K. Haupt, « Photopolymerization and photostructuring of molecularly imprinted polymers for sensor applications—A review », *Analytica Chimica Acta*, vol. 717, p. 7‑20, mars 2012.

[132] O. Soppera, S. Jradi, et D. J. Lougnot, « Photopolymerization with Microscale Resolution : Influence of the Physico-Chemical and Photonic Parameters », *Journal of polymer science. Part A. Polymer chemistry*, vol. 46, n° 11, p. 3783‑3794.

[133] S. Stanley, C. J. Percival, T. Morel, A. Braithwaite, M. I. Newton, G. McHale, et W. Hayes, « Enantioselective detection of l-serine », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 89, n° 1‑2, p. 103‑106, mars 2003.

[134] M. Kobaisi, « Rapid on-site monitoring of pesticide residues with MIP sensors », Thèse de doctorat, Université Melbourne, Australie, 2007.

[135] F. Razan, « Etude de microcapteurs à ondes acoustiques dédiés à la détection fine de produits chimiques à l'échelle laboratoire et industrielle. Application à la

détection de monomères résiduels et à la mesure de cinétique en réacteurs. », Université Bordeaux I, France, 2005.

[136] D. E. Bornside, C. W. Macosko, et L. E. Scriven, « MODELING OF SPIN COATING. », *Journal of imaging technology*, vol. 13, n° 4, p. 122‑130, 1987.

[137] J. J. BelBruno, A. Richter, et U. J. Gibson, « Amazing pores: Processing, morphology and functional states of molecularly imprinted polymers as sensor materials », *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, vol. 483, p. 179‑190, 2008.

[138] B. A. Auld, *Acoustic fields and waves in solids*. R.E. Krieger, 1990.

[139] M. H. Mohamed et L. D. Wilson, « Porous Copolymer Resins: Tuning Pore Structure and Surface Area with Non Reactive Porogens », *Nanomaterials*, vol. 2, n° 4, p. 163‑186, juin 2012.

[140] F. S. Macintyre et D. C. Sherrington, « Control of porous morphology in suspension polymerized poly(divinylbenzene) resins using oligomeric porogens », *Macromolecules*, vol. 37, n° 20, p. 7628‑7636.

[141] M. Hamid, R. Naheed, M. Fuzail, et E. Rehman, « The effect of different diluents on the formation of N-vinylcarbazole-divinylbenzene copolymer beads », *European Polymer Journal*, vol. 35, n° 10, p. 1799‑1811, oct. 1999.

[142] Drake R., Dunn R., Sherrington D.C., et Thomson S.J., « Optimisation of Polystyrene Resin-supported Pt Catalysts in Room Temperature, Solvent-less, Oct-l-ene Hydrosilylation using Methyldichlorosilane », *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, vol. 5, n° 3, p. 201‑209, mai .

[143] J-S. Park, C. Han, J.-Y. Lee, S.-D. Kim, J.-S. Kim, et J.-H. Wee, « Synthesis of extraction resin containing 2-ethylhexyl phosphonic acid mono-2-ethylhexyl ester and its performance for separation of rare earths (Gd, Tb) », *Separation and Purification Technology*, vol. 43, n° 2, p. 111‑116, mai 2005.

[144] H.-P. Hentze et M. Antonietti, « Porous polymers and resins for biotechnological and biomedical applications », *Reviews in Molecular Biotechnology*, vol. 90, n° 1, p. 27‑53, mars 2002.

[145] P. D. Verweij et D. C. Sherrington, « High-surface-area resins derived from 2,3-epoxypropyl methacrylate cross-linked with trimethylolpropane trimethacrylate », *J. Mater. Chem.*, vol. 1, n° 3, p. 371‑374, janv. 1991.

[146] J. Courtois, M. Szumski, F. Georgsson, et K. Irgum, « Assessing the Macroporous Structure of Monolithic Columns by Transmission Electron Microscopy », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 1, p. 335‑344, janv. 2007.

[147] M. M. Conn, G. Deslongchamps, J. de Mendoza, et J. Rebek, « Convergent functional groups. 13. High-affinity complexation of adenosine derivatives within induced binding pockets », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 115, n° 9, p. 3548‑3557, mai 1993.

[148] S. C. Zimmerman et Z. Zeng, « Improved binding of adenine by a synthetic receptor », *Journal of Organic Chemistry*, vol. 55, n° 16, p. 4789‑4791, 1990.

[149] J. C. Adrian et C. S. Wilcox, « Orderly functional group dyads. Recognition of biotin and adenine derivatives by a new synthetic host », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 111, n° 20, p. 8055‑8057, 1989.

[150] L. Blanc, « Développement et modélisation de plateformes à ondes acoustiques de surface guidées : caractérisation des propriétés mécaniques de films minces mésoporeux. », thèse de doctorat, Université Bordeaux I, France, 2011.

[151] G. Tortissier, « Étude et développement d'une plateforme de détection chimique à ondes acoustiques de surface pour environnement sévère haute température », thèse de doctorat, Université Bordeaux I, France, 2009.

[152] Y. Tominaga, T. Kubo, K. Yasuda, K. Kato, et K. Hosoya, « Development of molecularly imprinted porous polymers for selective adsorption of gaseous compounds », *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 156, p. 161‑165, juill. 2012.

[153] P. Hong, W. Li, et J. Li, « Applications of Aptasensors in Clinical Diagnostics », *Sensors*, vol. 12, n° 12, p. 1181‑1193, janv. 2012.

[154] K. Min, H. Jo, K. Song, M. Cho, Y.-S. Chun, S. Jon, W. J. Kim, et C. Ban, « Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (−) prostate cancers », *Biomaterials*, vol. 32, n° 8, p. 2124‑2132, mars 2011.

[155] Y-E. Choi, J-W .Kwak, et J. W. Park, « Nanotechnology for Early Cancer Detection », *Sensors*, vol. 10, n° 1, p. 428‑455, janv. 2010.

[156] M. Solomon et G. G. M. D'Souza, « Recent progress in the therapeutic applications of nanotechnology », *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 23, n° 2, p. 215‑220, avr. 2011.

[157] S. Mousa, « Biosensors: the new wave in cancer diagnosis », *Nanotechnology, Science and Applications*, p. 1, déc. 2010.