Réseaux de biocapteurs de type MEMS en diamant pour la reconnaissance d'odeurs

Raafa Manai

▶ **To cite this version:**

Raafa Manai. Réseaux de biocapteurs de type MEMS en diamant pour la reconnaissance d'odeurs. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066359 . tel-01127385

HAL Id: tel-01127385

https://theses.hal.science/tel-01127385

Submitted on 7 Mar 2015

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Physique chimie des matériaux

Présentée par

Mlle Raafa MANAI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Domaine : Sciences Physiques - Chimie

Réseaux de biocapteurs de type MEMS en diamant pour la reconnaissance d'odeurs

Présentée et soutenue publiquement le 9 Décembre 2014 devant le jury composé de :

PERROT, Hubert	Directeur de recherche, UPMC	Président du jury
TEMPLE-BOYER, Pierre	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur
VIRICELLE, Jean-Paul	Directeur de recherche	Rapporteur
SIMON, Nathalie	Professeur, UVSQ	Examinateur
MAILLEY, Pascal	Directeur de recherche, CEA-DSM	Examinateur
BERGONZO, Philippe	Directeur de recherche, CEA-LIST	Directeur de thèse
SCORSONE, Emmanuel	Ingénieur de recherche, CEA-LIST	Encadrant

Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives
CEA TECH Saclay – Laboratoire d'Intégration des Systèmes et des Technologies
Laboratoire Capteurs Diamant

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Glossaire

1-AMA	1-aminoanthracène
4-NT	4-Nitrotoluène
6his	Six histidines
ACA	Acide aminocaproïque
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFM	Atomic force microscope
BAW	Bulk Acoustique Wave, Onde Acoustique de Surface
BDD	Diamant dopé au bore
CNT	Nanotubes de carbone
COOH	Terminaison de surface issue du greffage de l'acide aminocaproïque
CREL	Centre de Recherche, d'Expertise de la Logistique, du Ministère de l'Intérieur
CV	Voltammètrie cyclique
CVD	Chemical Vapor Deposition
DI	Eau déionisée
DMMP	Dimethyl Methylphosphonate
DNT	Dinitrotoluène
EADS	European Aeronautic Defence and Space company
EDC	1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimidehydrochloride
EGDN	Nitroglycol
EIS	Electrical Impedance Spectroscopy Spectroscopie d'impédance électrochimique
EPFL	Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne
ESIEE	École Supérieure d'Ingénieurs en Électronique et Électrotechnique
ESYCOM	Electronics, Communication Systems and Microsystems
FBAR	Film Bulk Acoustic Resonator
FEG	Field Emission Gun

FTIR	Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier
GFP	Green Fluorescent Protein
GOBP	General Odorant Binding Protein
HA	Acide hexanoïque
H-diamant	Diamant hydrogéné
HF	Acide fluorhydrique
HMDS	Hexamethyldisilazane
HPHT	Nanodiamant Haute Pression et Haute Température
IBMP	Isobutyl-3-méthoxypyrazine
IDT	Interdigited Tease Peignes interdigités
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
INRA	Institut national de la recherche agronomique
K	Kelvin
K_D	Constante de dissociation
kDa	kDalton
KIT	Karlsruhe Institute of Technology
LBP	Ligand Binding Proteins
LIDEEC	Lot d'instruction et de détection d'explosifs des équipes cynophiles
LOD	Limit Of Detection limite de détection
MDMA	3,4-methylenedioxy-N-methyl amphetamine (Ecstasy)
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEMS	Micro-Electromechanical Systems
Méthode 1	Greffage NTA-Ni-6hisLBP
Méthode 2	Greffage aca-EDC/NHS-LBP
MHDA	Mercaptohexadecanoique
MPCVD	Macrowave Plasma Chemical Vapor Deposition
MUP	Major Urinary Protein
ND	Nanodiamant
NHS	Sulfo-N-hydroxy-succinimide
Ni	Nickel II
NOeMI	Neurobiologie de l'olfaction et modélisation en imagerie

NPN	N-phényl-naphthylamine
NTA	Nα,Nα-Bis- carboxymethyl -L-lysine hydraté
OBP	Odorant Binding Protein Molécules odorantes
OR	Olfactory Receptor Récepteurs olfactifs
Ox-diamant	Diamant oxydé
PBP	Pheromon Binding Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline solution tampon phosphate saline
PDB	Protein Data Bank
PDDAC	Poly diallyldimethylammonium chloride
PETN	Tétranitrate de Pentaérythritol
PID	Photo Ionization Detector
PVD	Physical Vapor Deposition, dépôt physique par phase vapeur
Q	Facteur de qualité
QCM	Quartz Crystal Microbalance
RIE	Reactive Ion Etching Gravure ionique réactive
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMS	Rugosité moyenne
RSD	Relative Standard Deviation
Rt	Résistante de transfert
S/N	Signal sur bruit
SAM	Self-Assembled Monolayer monocouches auto-assemblées
SAMLAB	Sensors, Actuators and Microsystems Laboratory
SAW	Surface Acoustic Wave
SNNS	Stuttgart Neural Network Simulator
SPR	Résonance plasmon de surface
$T_{90\%}$	Temps de réponse à 90%
THC	Cannabis (constituant principal)
TMB	Triméthyle de bore
TNT	Trinitrotoluène
XPS	X-ray Photoelectron Spectroscopy
ZnO	Oxyde de Zinc

Table de matières

Remerciements ..... **vii**

Glossaire ..... **xi**

Introduction générale **1**

1. Les MEMS en diamant pour la transduction olfactive biomimétique **5**
1.1 Introduction **7**
1.2 Les différents types de capteurs biochimiques **7**
1.2.1. Définition d'un biocapteur 7
1.2.2 Les transducteurs optiques 8
1.2.3 Les transducteurs électrochimiques 10
1.2.4 Les transducteurs à ondes acoustiques 11
1.2.5 Les MEMS 12
1.3. Le diamant de synthèse **22**
1.3.1 Les procédés de fabrication du diamant 22
1.3.2 Les propriétés du diamant 23
1.3.3 Utilisation du diamant pour la transduction biochimique 29
1.4 Les MEMS en diamant **30**
1.4.1 Etat de l'art sur les microleviers en diamant 30
1.4.2 Etat de l'art sur les SAW en diamant 33
1.5 Les récepteurs Ligand biding proteins **35**
1.5.1 Principales caractéristiques du système olfactif 35
1.5.2 Les OBP 37
1.5.3 Les MUP 39
1.5.4 Les récepteurs olfactifs (OR) 41
1.5.5 Etat de l'art des biocapteurs constitués de LBP 42
1.6 Conclusion **50**
Bibliographie du chapitre 1 ..... **51**

2. Caractéristiques physico-chimiques des transducteurs MEMS en diamant et descriptions des dispositifs employés 61
2.1 Introduction 63
2.2 Fabrication des capteurs 63
2.2.2 Les microleviers 70
2.2.3 Les SAW 80
2.3 Choix des greffages pour notre étude 83
2.3.1 Méthode 1 de greffage 84
2.3.2. Méthode 2 de greffage 85
2.3.3 Choix des récepteurs pour notre étude 89
2.3.4 Caractérisation des greffages : Protocoles d'expérimentations 99
2.4 Caractérisations des dispositifs utilisés en milieu liquide et gazeux 104
2.4.1 Dispositifs de caractérisation des propriétés de résonance des poutres en diamant en milieu liquide 104
2.4.2 Dispositifs de caractérisation des biocapteurs SAW et microleviers en diamant en milieu gaz 107
2.5 Conclusion 117
Bibliographie du chapitre 2 118

3. Caractérisations des greffages chimiques et détections de molécules organiques en milieu liquide 123
3.1 Introduction 125
3.2 Caractérisations des greffages chimiques 125
3.2.1 Caractérisation par imagerie MEB 125
3.2.2 Caractérisation par imagerie AFM 128
3.2.3 Caractérisations par spectroscopie de fluorescence 129
3.2.4 Caractérisation chimique par spectroscopie XPS 132
3.2.5 Caractérisations électrochimiques par EIS 134
3.2.6 Suivi des greffages et immobilisations par vibrométrie laser 147
3.3 Détections de composés chimiques en milieu liquide 154
3.3.1 Détection de l'IBMP, du 2,4-DNT et du 4-NT 154
3.3.2 Détection de composés organiques grâce aux microleviers fonctionnalisés avec des OR 166
3.4 Conclusion 169
Bibliographie du chapitre 3 171

4. Détection de composés volatils en milieu gazeux 173
4.1 Introduction 175
4.2 Evaluation dans des conditions contrôlées de laboratoire 175
4.2.1 Mise en évidence des greffages sur transducteurs SAW 176
4.2.2 Performances des capteurs SAW 181
4.3 Campagne de mesures sur composés réels : explosifs et drogues 209
4.3.1. Méthode d'entrainement de vapeur par aspiration 209
4.3.2 Utilisation du dispositif Sniffer développé au cours de l'étude 214
4.4 Conclusion 219
Bibliographie du chapitre 4 220

Conclusion générale 221

Annexes 225
Annexe A 225
Annexe B 227

Table des figures 233

Liste des tableaux 241

Liste des équations 243

Communications personnelles 245

Introduction générale

Au cours des quinze dernières années, la lutte contre le terrorisme et le trafic de drogues est devenue un enjeu sociétal majeur. L'identification rapide et efficace des colis piégés est, par exemple, indispensable dans les lieux publics très fréquentés et à risques, tels que les aéroports et les gares. Avec son odorat exceptionnel, le chien reste jusqu'à présent le moyen le plus fiable pour la détection d'explosifs, de drogues et de toutes sortes de matériaux dangereux pour la sécurité environnante. Cependant, l'utilisation des sensibilités olfactives du chien représente de sérieux inconvénients (fatigue, coût de dressage, existence de leurre, etc.). Le développement de systèmes de mesures capables de détecter les composés illicites, offrant des alternatives sérieuses, est devenu essentiel.

Mon travail de recherche, objet de cette thèse, porte principalement sur l'étude de deux types de transducteurs MEMS en diamant combinés à des biorécepteurs olfactifs spécifiquement impliqués dans la perception et la reconnaissance des odeurs. Il entre dans le cadre du projet européen SNIFFER (FP7-SEC) où le CEA-LIST collabore avec plusieurs équipes internationales pour la réalisation de systèmes de capteurs particulièrement innovants, proposant d'utiliser une approche biomimétique par la fabrication de biocapteurs à base de récepteurs olfactifs pour la détection de drogues et d'explosifs aux frontières aéroportuaires.

Les MEMS de type microleviers et les SAW ont été choisis dans cette étude pour leurs nombreux avantages dont leur grande sensibilité à détecter tous types de molécules. Les propriétés physiques et chimiques exceptionnelles du diamant déposé sur leur surface permettent d'envisager des détecteurs à la fois miniaturisés, robustes et sensibles.

Dans cette recherche, différentes familles de parties fonctionnelles du système olfactif ont été utilisées comme parties sensibles des capteurs, et notamment : des Ligand Binding Proteins (LBP) et plus particulièrement trois types spécifiques de protéines se liant aux molécules odorantes : les protéines de liaison aux molécules odorantes (OBP pour Odorant Binding Protein) et les Major Urinary Protein (MUP), et des récepteurs olfactifs (OR) (les OBP et des MUP spécifiques ont été fournis par des partenaires du projet SNIFFER, notamment les universités de Manchester et de

Padova, les OR par un partenaire de l'INRA de Jouy-en-Josas). L'immobilisation de ces récepteurs olfactifs OBP, MUP et OR sur la surface des transducteurs MEMS a constitué le fil directeur de mes travaux dans la conception d'un système de nez électronique biomimétique.

Dans la nature, les OBP sont localisées dans le mucus nasal chez les mammifères et au niveau des antennes chez les insectes par exemple. Les MUP sont une sous-famille de protéines OBP impliquées dans la capture des molécules de phéromones sexuelles que l'on trouve en abondance dans l'urine et autres sécrétions animales. Les OR sont localisés sur la membrane des cils des neurones sensoriels olfactifs qui projettent leurs axones vers le bulbe du système olfactif, premier relais de la perception olfactive dans le cerveau.

Par opposition aux OBP et aux MUP, les OR sont extrêmement sélectifs, mais néanmoins peu stables aux conditions extérieures de par leur structure complexe, ce qui peut rendre leur utilisation plus délicate sur des systèmes électroniques de détection d'odeurs. Peu de travaux ont été effectués avec les LBP pour l'élaboration de biocapteurs, la plupart sont réalisés en milieu liquide et très rarement en milieu gazeux. Cette thèse aborde la détection d'odeurs grâce aux LBP dans ces deux milieux. La chimie unique du diamant permet ainsi d'immobiliser ces biorécepteurs à sa surface des capteurs de façon covalente et robuste.

L'objectif principal de mes travaux a donc consisté à démontrer l'intérêt de tels transducteurs SAW et microleviers en diamant fonctionnalisés avec des LBP pour des applications de détection de vapeurs d'explosifs et de drogues.

Cette thèse s'articule autour de quatre chapitres.

Le premier chapitre décrit le contexte et l'objectif de l'étude. Les principaux types de biocapteurs existants ainsi que leurs mécanismes de transduction sont présentés. Cette partie se focalise, par la suite, sur les MEMS de type microleviers et SAW développés pour ces travaux, et principalement utilisés pour justifier l'utilisation de ces transducteurs pour la détection de composés odorants. Les procédés de fabrication du diamant, ses excellentes propriétés physico-chimiques ainsi que son utilisation dans la transduction chimique sont ensuite détaillés. Le diamant se révèle être un excellent matériau innovant pour divers autres domaines d'application incluant l'électronique, l'optique, l'électrochimie, etc. Certaines de ses propriétés sont, donc, mises à profit. L'état de l'art des quelques biocapteurs olfactifs existants, comprenant les protéines LBP après explication du fonctionnement du système olfactif ainsi que le mécanisme d'action des protéines OBP, MUP et OR, est dressé en fin de ce chapitre, permettant ainsi de proposer des voies de fabrication de biocapteurs biomimétiques.

Le second chapitre présente dans un premier temps les conditions de fabrication des microleviers et des SAW et les conditions spécifiques de synthèse du diamant pour fabriquer ces transducteurs. Dans un deuxième temps, la réalisation et l'optimisation du dépôt des LBP sur ces transducteurs sont présentées. Les différentes voies de greffage utilisées dans ces travaux sont détaillées à cet effet. Le greffage de l'acide aminocaproïque sur surface en diamant hydrogéné suivi d'un couplage classique EDC/NHS est la méthode 1 de fonctionnalisation mise en œuvre dans cette étude. Une seconde approche d'immobilisation a été investiguée afin de contrôler l'orientation des protéines LBP immobilisées en surface. La seconde technique d'immobilisation requiert le greffage du complexe NTA-Ni et d'un LBP avec une étiquette (tag) 6 histidines. Le chapitre 2 explicite, dans un dernier temps, les outils utilisés pour caractériser les greffages et les performances des capteurs ainsi développées. Les dispositifs utilisés pour caractériser les propriétés de résonance reliées à une détection en milieux liquides (mesures optiques de vibrométrie laser) et gazeux sont aussi détaillés. Un prototype de détection, élaboré par différents partenaires du projet Sniffer (Airbus, l'université de Manchester et l'ESIEE), a été utilisé dans le cadre de mes travaux, à l'occasion de tests de détection proches du terrain avec un large panel d'explosifs et de drogues. La conception et la fabrication d'une cellule pouvant contenir plusieurs transducteurs de type microleviers pour une détection en gaz ont été réalisées au cours de cette étude et sont présentées dans ce chapitre 2.

Le chapitre 3 permet de valider les 2 méthodes de greffage employées par diverses techniques de caractérisation incluant la spectroscopie XPS, la spectroscopie de fluorescence, l'imagerie MEB, l'AFM ainsi que la spectroscopie électrochimique (EIS). L'évolution du déplacement en fréquence de résonance de microleviers a été utilisée pour suivre les résultats de détection lors de l'exposition à différents composés organiques (le 2,4-Dinitrotoluène (2,4-DNT), le 4-Nitrotoluène (4-NT) et le 2-isobutyl-3-méthoxypyrazine (IBMP), obtenus avec des microleviers en diamants fonctionnalisés de protéines LBP en mesure liquide. Les performances de ces capteurs en termes de sensibilité, de limite de détection ou encore du temps de réponse sont étudiées en fonction des méthodes de greffages utilisées ainsi que des différentes protéines (OBP ou MUP) immobilisées sur les transducteurs.

Dans le chapitre 4, les caractéristiques des transducteurs SAW fonctionnalisés par des LBP pour la détection de composés volatils en milieu gazeux ont été exploitées. Des mesures de détection en milieu gazeux avec des microleviers n'ont pu être réalisées que tardivement, par l'intégration de la cellule développée au cours de ces travaux, au dispositif Sniffer élaboré. Ces mesures ne seront donc pas davantage mentionnées dans cette thèse. L'objectif primordial du chapitre 4 est, donc, de caractériser les propriétés de détection des transducteurs SAW pour chaque LBP immobilisé, en termes de sensibilité, de cinétique et de reproductibilité, et ce, à l'aide de tests d'expositions à différents composés volatils. Les mêmes approches de greffage,

décrites dans le chapitre 3, pour immobiliser des LBP à la surface des microleviers (méthode 1 et 2), ont été utilisées dans ce chapitre sur les SAW. Ceci a permis, d'une part, d'évaluer la densité des récepteurs greffés sur la surface en diamant par une approche gravimétrique et d'autre part, de caractériser les capteurs, ainsi réalisés, exposés à des vapeurs d'IBMP, de 2,4-DNT et 4-NT dans des conditions contrôlées de laboratoire grâce à l'utilisation des tubes à perméation par exemple. La dernière partie de ce chapitre traite de la détection des composés explosifs de fabrication artisanale et de drogues, provenant de saisie judicaire, avec les capteurs SAW fonctionnalisés par des LBP dans des conditions de terrain et semi-réelles avec la méthode d'entrainement de vapeur par aspiration, et l'utilisation du dispositif Sniffer développé au cours de cette étude. Plusieurs campagnes de mesures ont été menées dans le laboratoire du CREL (Centre de Recherche, d'Expertise de la Logistique, du Ministère de l'Intérieur). Les performances des capteurs sont ainsi comparées pour chaque exposition de composé illicite.

Ces travaux sur l'immobilisation des LBP de type OBP, OR et MUP sur transducteurs en diamant en vue de leur utilisation pour la conception d'un système biomimétique de nez électronique sont à l'état de l'art, et s'ajoutent donc à la littérature scientifique dans ce domaine.

Chapitre 1

Les MEMS en diamant pour des applications de transduction olfactive biomimétique

Sommaire

1.1 Introduction 7

1.2 Les différents types de capteurs biochimiques 7
1.2.1. Définition d'un biocapteur 7
1.2.2 Les transducteurs optiques 8
1.2.3 Les transducteurs électrochimiques 10
1.2.4 Les transducteurs à ondes acoustiques 11
1.2.5 Les MEMS 12
1.2.5.a Les SAW 13
1.2.5.b Les microleviers 15
1.2.5.b.i Description analytique du comportement des microleviers 15
1.2.5.b.ii Exemples de microleviers utilisés pour la détection biochimique 19

1.3. Le diamant de synthèse 22
1.3.1 Les procédés de fabrication du diamant 22
1.3.2 Les propriétés du diamant 23
1.3.2.a Propriétés électriques du diamant 23
1.3.2.b Propriétés thermiques 23
1.3.2.c Propriétés optiques 23
1.3.2.d Propriétés électrochimiques 24
1.3.2.e Propriétés mécaniques 24
1.3.2.f Propriétés chimiques 25
1.3.2.g Les voies de greffages sur diamant 25
1.3.3 Utilisation du diamant pour la transduction biochimique 29

1.4 Les MEMS en diamant 30
1.4.1 Etat de l'art sur les microleviers en diamant 30
1.4.2 Etat de l'art sur les SAW en diamant 33
1.5 Les récepteurs Ligand biding proteins 35
1.5.1 Principales caractéristiques du système olfactif 35
1.5.2 Les OBP 37
1.5.2.a Localisation 37
1.5.2.b Structure 37
1.5.2.c Caractérisation 38
1.5.2.d Propriétés vis-à-vis des odorants 38
1.5.3 Les MUP 39
1.5.3.a Localisation 39
1.5.3.b Historique 40
1.5.3.c Structure 40
1.5.3.d Fonction principale et propriétés vis-à-vis des phéromones 40
1.5.4 Les récepteurs olfactifs (OR) 41
1.5.4.a Historique et structure 41
1.5.4.b Localisation 42
1.5.4.c Propriétés 42
1.5.5 Etat de l'art des biocapteurs constitués de LBP 42
1.5.5.a Les biocapteurs existants constitués d' OBP 44
1.5.5.b Les biocapteurs constitués de MUP 47
1.5.5.c Les biocapteurs constitués d'OR 47

1.6 Conclusion 50

Bibliographie du chapitre 1 51

1.1 Introduction

Ce chapitre décrit dans un premier temps les principaux types de biocapteurs existants ainsi que leurs mécanismes de transduction. Notre travail porte principalement sur l'étude de transducteurs MEMS (Micro-Electromechanical Systems) en diamant combinés à des biorécepteurs spécifiquement impliqués dans la reconnaissance des odeurs. Ce chapitre se focalisera, par la suite, sur les MEMS fabriqués à partir d'un matériau innovant, le diamant de synthèse. Les excellentes propriétés physico-chimiques du diamant sont explicitées afin de justifier l'utilisation de ces transducteurs en diamant pour la détection de composés odorants. La fin de ce chapitre sera consacrée à la présentation des différents types de biorécepteurs de type Ligand Binding Proteins (LBP). Les LBP utilisées dans cette étude sont des protéines ayant la capacité de se lier avec des molécules odorantes. Notre étude s'orientera vers la détection d'odeurs grâce aux LBP tant en milieu liquide qu'en milieu gaz. A l'heure actuelle, peu de travaux sont publiés dans la littérature scientifique sur l'élaboration de tels biocapteurs à LBP dans ces milieux. En fin de chapitre, un état de l'art de quelques biocapteurs olfactifs existants s'appuyant sur ce type de protéines sera, néanmoins, dressé.

1.2 Les différents types de capteurs biochimiques

Dans cette partie, les principaux types de capteurs biochimiques sont décrits de manière non exhaustive. Ces différents biocapteurs seront classés en fonction du type de transduction en nous appuyant plus spécifiquement sur la famille des MEMS qui seront utilisés dans la suite de ces travaux.

1.2.1. Définition d'un biocapteur

Un biocapteur est un outil analytique composé d'un élément biologique, appelé biorécepteur, lié à un transducteur. Le biorécepteur est généralement immobilisé sur la surface du transducteur et possède une grande affinité avec les molécules cibles. Parfois ces récepteurs peuvent être très sélectifs (anticorps [1], aptamères [2], etc.). Dans notre étude, les biorécepteurs sont des protéines de type LBP. Les protéines LBP sont diverses (globuline [3], enzyme [4], etc.) et peuvent être impliquées dans la réalisation de plusieurs types de biocapteurs [5, 6, 7, 8]. L'information biochimique qui en résulte est alors convertie par le transducteur en un signal analytiquement utile et exploitable pour permettre une détection de molécule cible [9]. Les performances d'un biocapteur sont évaluées à partir de plusieurs paramètres et notamment sa sensibilité, sa limite de détection, sa spécificité, son temps de réponse, etc.

La Figure 1.1 présente de façon schématique le principe de fonctionnement d'un biocapteur.

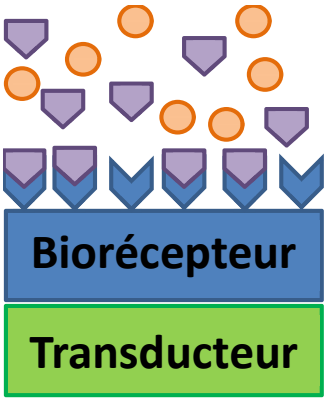


Figure 1.1 - Principe de fonctionnement d'un biocapteur

Il existe différents types de transducteurs qui se différencient par le procédé physique qu'ils exploitent pour convertir la détection d'une molécule cible en une réponse mesurable. Ces principes physiques peuvent être de nature optique [10, 11, 12] (par exemple le changement d'indice de réfraction), électrochimique (réactions chimiques avec des espèces électro-actives) [13, 14, 15], électrique (par exemple l'utilisation des transistors à effet de champs) [16, 17, 18], gravimétrique (variation de masse) [19, 20, 21], ou mécanique (variation des propriétés mécaniques en surface) [22, 23, 24]. Les principales familles de modes de transduction sont détaillées dans les sections suivantes.

1.2.2 Les transducteurs optiques

Une large variété de méthodes optiques a été utilisée pour être associée aux systèmes de détection des biocapteurs. En effet, les transducteurs optiques sont parmi les plus utilisés dans le domaine de la biologie. Les principales méthodes de ces capteurs optiques sont : la mesure de l'absorbance [25], de la chimi-luminescence [26, 27], de la fluorescence [28], de la résonance plasmon de surface (SPR) [29] ou encore de l'onde évanescente [30].

Ces capteurs optiques présentent de nombreux avantages : une utilisation simple et très précise avec une limite de détection très basse et la possibilité de répondre simultanément à plusieurs réactants [31]. Une production en masse et à grande échelle de ces transducteurs peut être facilement envisageable. Cependant, ils présentent quelques inconvénients et fréquemment de longs temps de réponse et l'impossibilité de les utiliser en temps réel. De plus, ces capteurs sont difficilement miniaturisables.

Pour les biocapteurs mesurant l'absorbance, l'interaction entre le ligand et l'analyte se traduit par l'apparition ou la disparition d'une couleur dans le milieu réactionnel [32].

Pour les biocapteurs mesurant la fluorescence, l'interaction ligand-analyte se traduit par une émission ou une extinction de fluorescence [33]. La révélation peut, par exemple, être liée à l'utilisation d'un marquage par une sonde fluorescente. Un des marquages les plus fréquents, employé en ingénierie biologique, est l'utilisation de la Green Fluorescent Protein (GFP), protéine naturellement fluorescente [34]. La Figure 1.2 représente la structure de la GFP [35].

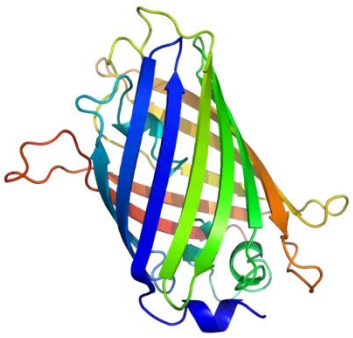


Figure 1.2 - Structure de la GFP [35]

Les mesures liées à l'interaction d'un récepteur biologique avec un ligand en temps réels (études cinétiques, etc.) sont le plus souvent étudiées par SPR. La mesure du phénomène SPR (Figure 1.3) peut se faire de deux manières.

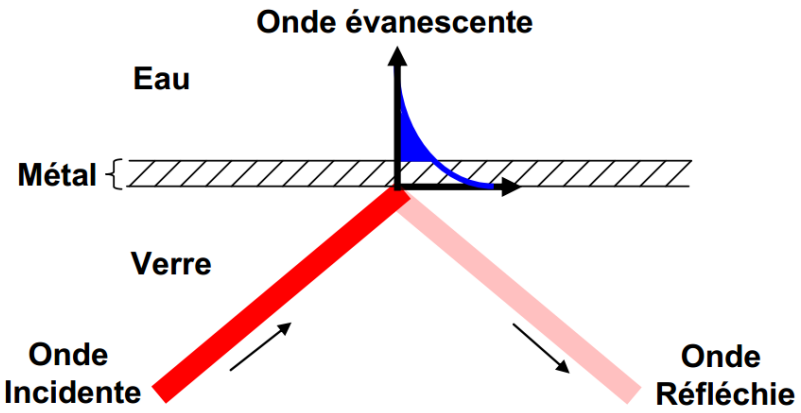


Figure 1.3 - Représentation schématique du phénomène de résonance de plasmon sous l'effet d'un rayon lumineux incident [36]

Elle peut se faire soit par la mesure de la variation de l'angle de résonance. En effet, les photons de l'onde évanescente entrent en résonance avec les nuages électroniques d'une fine couche de métal déposée à l'interface appelée aussi plasmon ce qui va induire une chute de l'intensité du faisceau réfléchi selon un certain angle (angle de résonance). Cet angle varie proportionnellement à la quantité d'espèces à détecter se fixant sur les ligands spécifiques à l'interface. Elle peut se faire, d'autre part, par la mesure de la modulation de la longueur d'onde et/ou de l'angle réfléchi. En effet, un faisceau parallèle polychromatique arrive à l'interface, ce qui va exciter la surface plasmonique. Cette excitation, du fait du transfert de l'énergie optique et de sa dissipation sur la couche plasmonique qui l'accompagnent, provoque une modification de la longueur d'onde de l'angle réfléchi. La fixation de l'espèce à détecter sur les ligands va induire une variation de la longueur d'onde proportionnelle à la quantité fixée. Cette variation est due à la modification de l'indice de réfraction induite par la fixation de l'analyte. Par exemple, H.S. Jang et al. ont mis au point un biocapteur SPR (une fibre optique) permettant la détection de l'antigène prostatique spécifique en tant que biomarqueur du cancer de la prostate [37].

1.2.3 Les transducteurs électrochimiques

Les capteurs électrochimiques sont très répandus dans le domaine de la détection biochimique. La détection électrochimique a pour principe l'oxydation ou la réduction de molécules électroactives cibles se traduisant par un échange d'électrons à la surface de l'électrode [38]. Il en résulte un signal électrique utile et exploitable. Il existe trois types principaux de transducteurs électrochimiques : les capteurs ampérométriques [39, 40, 41], les capteurs potentiométriques [42, 43, 44] et les capteurs impédancemétriques [45]. En potentiométrie, un équilibre thermodynamique est établi entre l'électrode solide et la solution, ce qui permet de mesurer le « potentiel de repos » d'une électrode indicatrice sensible à un composé ou ion de la solution étudiée par rapport à une électrode de référence. En ampérométrie, l'évolution du courant induit par l'oxydation et/ou la réduction d'espèces électro-actives à un potentiel donné est mesurée. Enfin, en impédancemétrie, on s'intéresse à l'évolution de la constante de transfert de charge de l'électrode de mesure qui évolue en fonction des espèces qui viennent se fixer sur l'électrode.

Les biocapteurs électrochimiques ont pour principaux avantages leur simplicité, leur coût de revient relativement faible et leur rapidité de réponse. En revanche, ils peuvent manquer de sélectivité et de sensibilité. On peut souligner le fait que les composants à détecter doivent être électroactifs ou être impliqués dans une réaction d'oxydo-réduction. Ces types de capteurs électrochimiques sont souvent utilisés dans le domaine médical [46,47], de l'environnement et de la sécurité comme par exemple pour la détection de polluants à l'état de trace [48, 15] ou la détection d'explosifs [49].

1.2.4 Les transducteurs à ondes acoustiques

Les capteurs à ondes acoustiques font intervenir le plus souvent une perturbation de la propagation d'une onde acoustique qui se traduit par un déplacement de la fréquence de résonance du dispositif. Cette perturbation vient le plus souvent de l'interaction de molécules avec une couche sensible déposée sur la surface du matériau. Ces capteurs communément appelés capteurs « gravimétriques », mesurent généralement une variation massique à la surface du transducteur bien que d'autres phénomènes physico-chimiques peuvent contribuer aussi à la réponse. Ce type de transduction peut en principe s'appliquer à tout type de molécules contrairement à d'autres transducteurs qui sont limités par certaines spécificités (propriétés optiques, électrochimiques, etc.).

Il existe plusieurs types de capteurs gravimétriques. Les capteurs BAW (Bulk Acoustic Wave) reposent sur la propagation d'une onde acoustique longitudinale ou de cisaillement dans un substrat piézoélectrique soumis à un champ électrique [21]. Ces capteurs sont compatibles avec une détection en phase liquide et gazeuse [50]. Un matériau piézoélectrique possède la propriété de se polariser électriquement sous l'action d'une force mécanique (effet direct) et, réciproquement, de se déformer lorsqu'on leur applique un champ électrique (effet inverse).

Les microbalances à quartz (communément appelées QCM pour Quartz Crystal Microbalance) sont un exemple de capteurs BAW les plus couramment utilisés. Un QCM est un cristal de quartz piézoélectrique taillé en coupe AT et d'épaisseur de quelques centaines de µm [51]. Comme illustré sur la
Figure 1.4 ci-dessous, le QCM est mis en résonnance à l'aide de 2 électrodes, placées de chaque côté du cristal, qui viennent exciter un matériau piézoélectrique. La
Figure 1.4 représente de façon schématique un QCM.

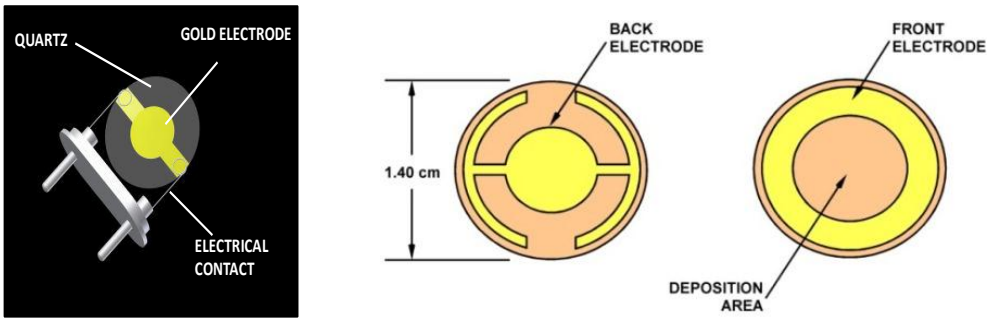


Figure 1.4 - Schéma d'un QCM [52,53]

La fréquence de résonance du quartz, pouvant aller jusqu'à quelques MHz [54], sera modifiée par le masse d'une espèce chimique se déposant sur la surface des électrodes.

Le décalage relatif de la résonance en fréquence dépend de la masse de ce dépôt suivant l'équation de Sauerbrey [55]. Il permet de mesurer des masses de l'ordre de quelques nanogrammes, sa sensibilité massique se situant, en effet, autour de quelques $Hz.ng^{-1}$. La sensibilité de ces capteurs est limitée par les forts amortissements en milieu liquide [21]. Les QCM sont très utilisés dans des disciplines diverses telles que l'électrochimie [56], la physico-chimie ou la biologie notamment pour caractériser l'adsorption de protéines [57] et également la détection de gaz toxiques par exemple [58, 59, 60].

1.2.5 Les MEMS

Le premier type de MEMS (Micro-ElectroMechanical Systems) qu'il est intéressant de mentionner ici est les « FBAR » (Film Bulk Acoustic Resonator). Ceux-ci appartiennent aussi à la famille des BAW. Un FBAR est un transducteur ayant une structure similaire à celle d'un QCM mais cette fois-ci avec des dimensions micrométriques, c'est-à-dire qu'il est également composé d'un matériel piézoélectrique enfermé par 2 électrodes et isolé de manière acoustique. Contrairement aux QCM, les transducteurs FBAR offrent une meilleure sensibilité en milieu liquide due à un meilleur facteur de qualité. En effet, les QCM subissent trop d'amortissements en liquide, ce qui diminue leur facteur de qualité. L'onde acoustique générée par les FBAR peut atteindre une fréquence plus élevée, allant jusqu'au GHz [61]. Les FBAR sont également plus compactes que les QCM, en épaisseur et en volume, et permettent une intégration dans des dispositifs issus de la microélectronique.

Si les FBAR peuvent être classés dans la catégorie des MEMS, il en existe bien d'autres. Ici, nous nous attarderons uniquement sur les SAW et les microleviers qui seront utilisés pour nos travaux. En effet, certains microleviers peuvent également être utilisés pour réaliser des capteurs gravimétriques. Dans cette étude, on considère que les SAW (Surface Acoustic Wave) peuvent être classés dans la catégorie des MEMS. Les MEMS (en incluant donc les SAW) sont présentés dans les sections suivantes.

1.2.5.a Les SAW

Le principe des SAW est le suivant : une onde acoustique est générée par deux électrodes déposées en configuration de peignes interdigités (IDT) à la surface du matériau piézoélectrique de manière à créer une contrainte mécanique en surface par l'exploitation du phénomène de la piézoélectricité [62]. Le système est alors mis en résonance. Lorsqu'un composé est piégé sur sa surface, sa présence va perturber la propagation de l'onde en surface, et modifier la fréquence de résonance du dispositif, qui est mesurée en continu entre deux électrodes. Cette fréquence dépend directement de la vitesse de propagation des ondes acoustiques dans le matériau et du pas des peignes IDT.

Les transducteurs SAW dits « lignes à retard » [63] (Figure 1.5) sont les transducteurs les plus utilisés. Des peignes interdigités (IDT) vont générer une onde acoustique qui va se propager à la surface du transducteur. La différence de polarisation entre deux peignes successifs génère des contraintes à la surface du matériau par effet piézoélectrique. Le phénomène inverse se produit au niveau des électrodes de sortie qui collectent ainsi l'onde propagée. La zone comprise entre les électrodes d'entrée et de sortie constitue la partie sensible du transducteur. L'ajout de masse engendre une modification locale des propriétés mécaniques de la surface qui modifient la vélocité acoustique de l'onde, ce qui augmente le temps que met l'onde pour parcourir le transducteur. Ce système fonctionne généralement dans un circuit résonant en boucle fermée qui permet d'avoir une mesure en continu.

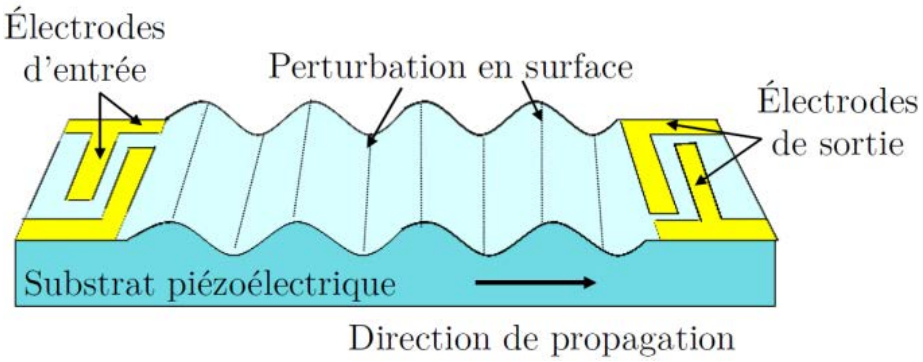


Figure 1.5 - Principe de fonctionnement d'un transducteur SAW à lignes de retard [63]

Les transducteurs SAW de type résonateurs possèdent une conformation de peignes IDT différente de celles des transducteurs SAW à lignes de retard. Ils ont des réflecteurs placés à côté des IDT d'entrée et de sorties. L'onde est alors générée par les IDT centraux et réfléchie par les réflecteurs latéraux et résonne dans une cavité, réduisant donc les pertes du dispositif. Ce type de SAW sera utilisé tout au long de notre étude.

Le piégeage des espèces cibles sur cette surface modifie les propriétés de propagation de l'onde acoustique qui sont sensibles à des changements de masse en surface ou de propriétés mécaniques de couches à la surface. En effet, l'onde de surface d'un transducteur SAW peut être perturbée par trois phénomènes distincts : la perturbation massique, viscoélastique et acousto-électrique.

L'équation 1.1 décrit la totalité des phénomènes mis en jeu dans la perturbation de l'onde acoustique de surface : [64]

$$\Delta f = C_{viscoel}\Delta E f_0^2 - \frac{K^2}{2}\Delta\left(\frac{1}{1+\left(\frac{v_0 C_q}{\sigma_s}\right)^2}\right) f_0 - \frac{C_m f_0^2}{S}\Delta m \qquad (1.1)$$

Détaillons chaque partie de cette équation.

Les perturbations de l'onde dues à une variation de masse sont décrites grâce à cette équation 1.2:

$$\Delta f = -\frac{C_m f_0^2}{S}\Delta m \qquad (1.2)$$

Où Δf est la différence en fréquence en Hz,
f_0 est la fréquence de résonance en Hz,
Cm est le facteur de sensibilité massique
ρ_s est la densité massique de la surface

Les perturbations de l'onde dues à un effet acousto-électrique sont décrites par cette équation 1.3:

$$\Delta f = -\frac{K^2}{2}\Delta\left(\frac{1}{1+\left(\frac{v_0 C_q}{\sigma_s}\right)^2}\right) f_0 \qquad (1.3)$$

Où σ_s est la conductivité de surface
C_q est la somme des permittivités diélectriques de l'air et du substrat
v_0 est la vélocité acoustique
K est le coefficient de couplage électromécanique

Les perturbations de l'onde due à un effet viscoélastique sont décrites par cette équation 1.4 :

$$\Delta f = \frac{2\pi h C_3}{v_0^2}\Delta(E\frac{4v-5}{5v^2+v-4})f_0^2 \quad (1.4)$$

Les transducteurs SAW sont classés selon la direction de propagation de l'onde: dans le plan de surface du matériau piézoélectrique (onde de Rayleigh) ou dans le plan orthogonal à la surface (onde de cisaillement, onde de plaque ou onde de Love). Dans le cas des transducteurs à onde de Love, l'onde est contenue dans le plan de la surface, ce qui sera particulièrement intéressant en milieu liquide. Les Rayleigh-SAW sont très sensibles en milieu faiblement amorti mais inadaptés en milieu liquide du fait du fort amortissement de l'onde de Rayleigh contenue dans le plan orthogonal à la surface du SAW. Ce type de Rayleigh-SAW sera, donc, davantage utilisé pour la détection en phase gaz.

Les domaines d'applications sont alors très variés, et les composés cibles sont par exemple des vapeurs organiques [65], des gaz inorganiques [66], des composés biologiques [67] et des vapeurs d'explosifs [68], et ils peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes [69]. Les SAW présentent de nombreux avantages tels que le fait d'être miniaturisables, ce qui en fait des capteurs intégrables pouvant être produits en masse. Ils offrent des seuils de sensibilité extrêmement bas pour un grand nombre de composés chimiques jusqu'au pictogramme.

1.2.5.b Les microleviers

Les premiers MEMS ont émergé dans les années 60 [70] et sont aujourd'hui considérés comme une technologie fiable présentant de nombreux avantages. En effet, cette technologie est potentiellement peu coûteuse, portable, sensible pour la détection et peut être fabriquée en masse. La recherche sur la réalisation des transducteurs de type microleviers a largement augmenté durant ces 10 dernières années grâce aux techniques de micro-fabrication en salle blanche, ce qui a favorisé l'utilisation des microleviers, et en particulier pour diverses applications de transduction biochimique [71]. La forme la plus simple d'un microlevier est une structure en forme de poutre suspendue en un seul point d'ancrage sur le substrat.

1.2.5.b.i Description analytique du comportement des microleviers

En général, les microleviers se déforment sous la contrainte d'un composé à sa surface. Cette déflection peut alors être traduite en signal électrique par le biais d'une couche piézorésistive intégrée au microlevier ou par interrogation optique.

Les microleviers ou poutres résonantes peuvent être utilisés selon deux régimes de fonctionnement différents : en régime statique [72] ou en régime dynamique [73]. En régime statique, la déformation de la poutre induite par un différentiel de contraintes surfaciques entre ses deux faces est mesurée. Une des deux faces de la poutre peut être passivée tandis que l'autre est fonctionnalisée pour augmenter le différentiel et ainsi gagner en sensibilité étant donné que les espèces ne vont s'adsorber que sur la face fonctionnalisée de la poutre. La déflection de la poutre en fonction d'un différentiel de contraintes peut être modélisé par la formule de Stoney (équation 1.5) [74].

$$\Delta z = \frac{3(1-\mu)L^2}{Ee^2}\Delta\sigma \tag{1.5}$$

Où E est le module d'Young
μ le coefficient de poisson
Δz la déflection de la poutre
Δσ le différentiel de contraintes surfaciques entre les deux faces de la poutre
L la longueur de la poutre
e l'épaisseur de la poutre.

En régime dynamique, les poutres sont mises en vibration à la fréquence d'un de leurs modes de résonance. Dans de nombreux cas, le premier ordre de flexion est exploité car il s'agit du mode de vibration le plus facile à observer en terme d'amplitude de mouvement. L'équation 1.6 met en évidence les quatre paramètres qui sont exploités dans le cas de détection à base de poutres résonantes [71].

$$f = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k^*}{m^*}\left(1-\frac{1}{2Q^2}\right)} \tag{1.6}$$

Où f est la fréquence de résonance de la poutre
m^* est la masse effective de la poutre oscillante
k^* son élasticité
Q le facteur de qualité traduisant les pertes mécaniques du microlevier.

La sensibilité de l'oscillateur mécanique par rapport à chacun de ces paramètres peut être évaluée en calculant la dérivée logarithmique partielle de la formule (1.6) par rapport à chaque paramètre influant.

Ceci nous conduit à l'équation 1.7 dans laquelle le premier, le deuxième et le troisième terme représentent la sensibilité de la structure mécanique par rapport à son élasticité, à sa masse effective et à son facteur de qualité, respectivement.

$$\Delta f_0 = \left(\frac{1}{2}\frac{f_0}{k^*}\right)\Delta k^* + \left(-\frac{1}{2}\frac{f_0}{m^*}\right)\Delta m^* + \left(\frac{f_0}{Q(2Q^2-1)}\right)\Delta Q \qquad (1.7)$$

Grâce aux équations précédentes, on peut souligner le fait que plus le module d'Young est élevé et plus la fréquence de résonance du microlevier le sera aussi. Etant donné que le module d'Young du diamant est environ 7,5 fois supérieur à celui du silicium, cette relation implique, qu'à géométrie équivalente, un microlevier rectangulaire en diamant aura une fréquence de résonance presque 2 fois plus élevée que celle d'un microlevier en silicium. Considérons alors 2 microleviers, l'un en silicium et l'autre en diamant, résonant respectivement à 10 kHz et 20 kHz, et tous les deux sujets à une masse effective d'environ 10 ng sans affecter la constante d'élasticité de ces deux transducteurs. Dans ce cas l'équation nous montre que le déplacement en fréquence de résonance sera d'environ 400 Hz pour le microlevier en diamant alors que la variation de fréquence de résonance de microlevier en silicium ce ne sera que de 290 Hz. On peut donc ainsi affirmer que la sensibilité gravimétrique en milieu faiblement amorti sera plus importante pour un transducteur en diamant.

Notre étude se focalise sur la détection de composés organiques sur des microleviers en diamant en milieu liquide. Dans un milieu liquide, les déformations mécaniques du microlevier impliquent une dissipation de l'énergie mécanique en énergie thermique. Cette dissipation énergétique peut être quantifiée en utilisant le facteur de qualité selon les équations 1.8, 1.9, 1.10 :

$$Q = \frac{\chi^2\sqrt{\rho E}}{12\pi\sqrt{3}}\frac{wt^2}{\mu l R\left(1+\frac{R}{\delta}\right)} \qquad (1.8)$$

$$R = \sqrt{\frac{wl}{\pi}} \qquad (1.9)$$

$$\delta = \sqrt{\frac{\mu}{\pi\rho f_0}} \qquad (1.10)$$

où χ est la constante relative au premier mode de vibration
w la largeur
l la longueur
t l'épaisseur
E le module de Young
μ la viscosité du milieu
et ρ la densité du milieu

Ces équations permettent de déduire qu'à même géométrie et dans un même milieu, le facteur de qualité d'un microlevier en diamant serait typiquement trois fois plus important qu'un micro levier en silicium. Mais en milieu liquide, il faut prendre en compte dans l'équation la perte énergétique mécanique due à la dissipation.

L'équation (1.6) devient alors l'équation 1.11 :

$$f_{0,Q} = \frac{1}{2^{\frac{3}{2}}\pi}\sqrt{\frac{k}{m_0}}\frac{\sqrt{2Q-1}}{Q} \tag{1.11}$$

La variation de la rigidité peut être décrite par l'équation 1.12:

$$(EI)^b = (EI)^0\left(1 + 3\frac{b_{top} + b_{bottom}}{Et}\right) \tag{1.12}$$

La relation entre le coefficient d'élasticité du microlevier rectangulaire et EI est établie par l'équation 1.13 :

$$k = \frac{3EI}{l^3} \tag{1.13}$$

Les équations 1.11, 1.12, 1.13 supposent une faible sensibilité des microleviers aux variations de stress de surface de l'ordre de quelques centaines de µHz pour des variations de stress de surface d'environ quelques centaines de $mN.m^{-1}$ pour le cas des microleviers en silicium [75]. En se reportant à ces dernières équations, la sensibilité devrait être encore plus faible pour le cas d'un microlevier en diamant étant donné qu'elle est ici inversement proportionnelle au module d'Young, qui est élevé dans le cas du diamant. En milieu liquide donc, l'avantage du fort facteur de qualité de structures en diamant serait moindre du fait de leur plus faible sensibilité.

Etonnement, dans des conditions expérimentales, les variations de la fréquence de résonance induites par l'immobilisation d'espèces chimiques ou biologiques sur la surface du microlevier sont plutôt reportées dans l'intervalle de quelques centaines de Hz pour typiquement quelques centaines de $mN.m^{-1}$ en termes de variation de stress de surface, ce qui va, donc, à l'encontre des résultats attendus expérimentalement [103]. Il y a donc une certaine incohérence entre les prédictions théoriques et les observations expérimentales. On ne peut donc affirmer le réel avantage d'utiliser les microleviers en diamant dans le régime résonnant pour leurs exceptionnelles propriétés mécaniques dans un milieu liquide qui restent à démontrer et à justifier.

1.2.5.b.ii Exemples de microleviers utilisés pour la détection biochimique

Quelques exemples d'utilisation de microleviers pour des applications de détection biochimique sont détaillés dans cette section. Les microleviers, utilisés en biochimie, l'ont été pour détecter des maladies telles que le cancer [76], des virus [77,78], des séquences d'ADN [79, 80], des bactéries [81], des vapeurs de solvants [82] et des gaz toxiques [83].

Par exemple, des microleviers en silicium recouverts de polymère pyralène couplés à de la spectroscopie d'impédance électrochimique ont été développés par Zia et al. pour détecter des phthalates (esters) en milieu aqueux et notamment dans des jus de fruits [84]. Les phthalates contenus dans certains emballages plastiques sont toxiques pour l'homme et néfastes pour la santé, à concentrations élevées. L'analyse des spectres d'impédance, la détermination de la conductance du milieu et l'évaluation des modifications des propriétés diélectriques ont permis une détection de phthalates en temps réel. Dans cette étude, l'originalité a été de combiner des mesures de microleviers avec des expériences de caractérisations électrochimiques. La Figure 1.6 ci-dessous illustre le transducteur utilisé.

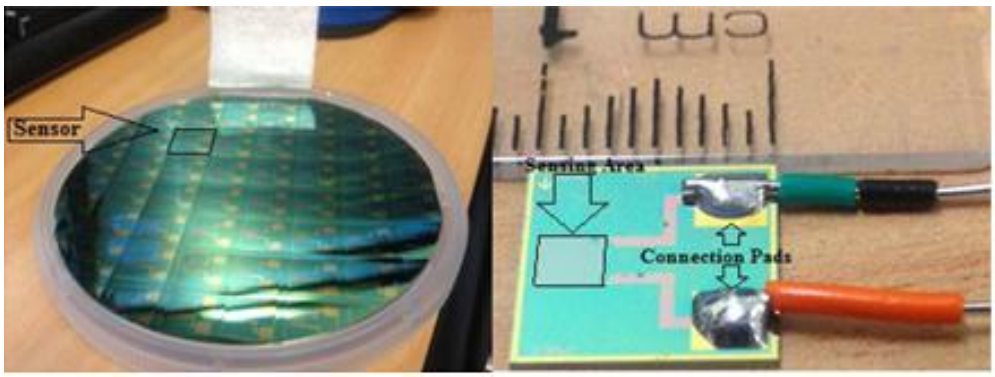


Figure 1.6 - Photographie du transducteur MEMS exploité par Zia et al. [84]

Par ailleurs, Timurdogan et al. ont développé des leviers en nickel fonctionnalisé avec des anticorps pour permettre une détection rapide de l'Hépatite A et C [85]. Les poutres utilisés par Timurdagan sont présentés sont la Figure 1.7 ci-dessous.

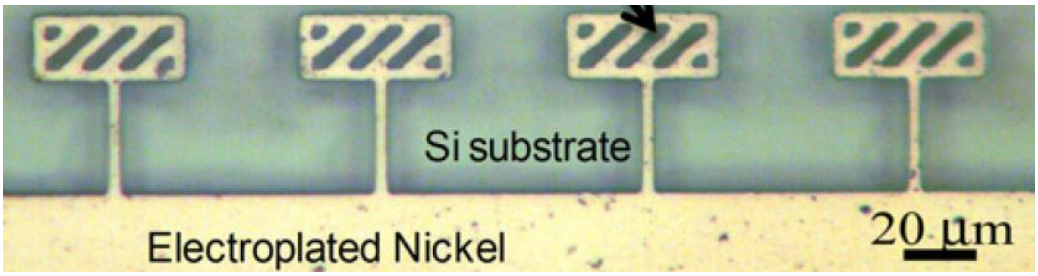


Figure 1.7 - Microleviers utilisés dans l'étude de Timurdagan et al. [85]

Huang et al. ont aussi développé des poutres permettant d'étudier les différences viscométriques d'un milieu en cours du temps pour une détection du glucose en continu [86]. Le transducteur, ainsi conçu, possède deux diaphragmes vibrant actionnés par un aimant situé à l'intérieur d'une chambre au centre du microlevier comme on peut le voir sur la Figure 1.8 ci-dessous. L'un est fonctionnalisé avec de l'acide borique sensible au glucose et l'autre est fonctionnalisé avec une solution de référence n'ayant aucune affinité avec le glucose. Ainsi les concentrations de glucose ont pu être déterminées en étudiant les caractéristiques de vibration des diaphragmes.

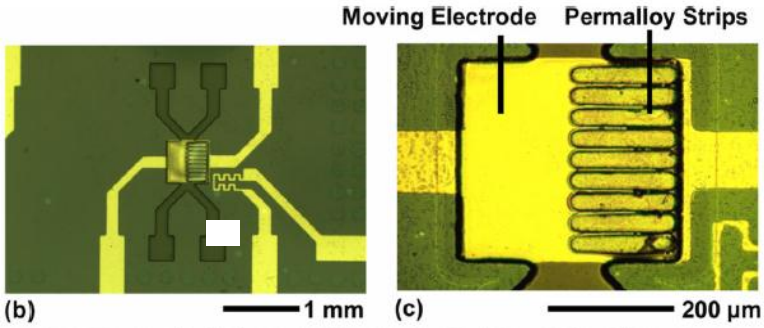


Figure 1.8 - Microleviers exploités par Huang et al. [86]

Les microleviers les plus étudiés dans la littérature scientifique sont généralement fabriqués à partir de silicium et ont des longueurs comprises entre quelques centaines de micromètres et quelques millimètres et des épaisseurs qui excèdent rarement 30 µm.

Dans de nombreux cas, une fine couche d'or est déposée sur la face sensible de la poutre pour permettre l'accroche de molécules. Par exemple, Zhang et al. [87] ont développé un réseau de microleviers recouverts d'une couche d'or (Figure 1.9) basé sur le couplage biotine/neutravidine pour la détection de biomolécules (anticorps) biotinylées. L'étude a permis de montrer la déflection du microlevier lors de l'accroche des molécules sur la surface fonctionnalisée. Ce même réseau a été utilisé pour détecter différents composés simultanément. En effet, ainsi Zhang et al., ont pu fonctionnaliser chaque microlevier du réseau de transducteurs par une espèce chimique spécifique ayant des affinités possibles pour une espèce biologique particulière. Ce réseau de microleviers est commercialisé par la compagnie Concentris [88].

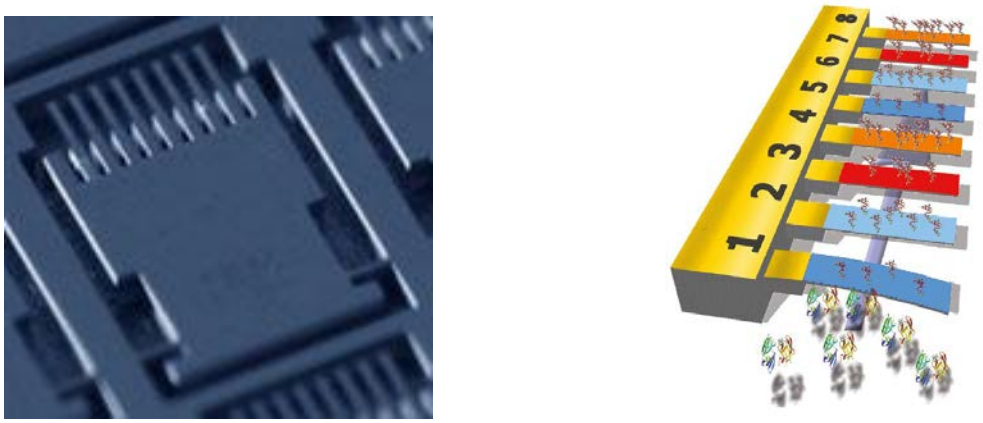


Figure 1.9 - Réseau de microleviers utilisé par Zhang et al. (à gauche) et schéma (à droite) [87]

Dans cette partie, nous avons vu qu'un grand nombre de transducteurs, basés sur des techniques optiques, électrochimiques et mécaniques sont utilisables pour la transduction biochimique. Leurs potentiels d'intégration et de miniaturisation sont garantis par la compatibilité de leurs procédés de fabrication avec les techniques de la micro-électronique. Ces technologies permettent souvent de faire de la détection directe et en temps réel. Il existe ainsi des transducteurs très performants qui répondent à des besoins bien spécifiques. Sur le marché actuel, il n'existe pas de capteurs répondant au besoin de détecter tous les types de molécules odorantes provenant de composés explosifs. Les capteurs actuels répondent à des critères trop spécifiques, sont limités par certains marqueurs spécifiques employés et ne peuvent donc pas intervenir dans la détection d'un large panel de composés explosifs.

Dans cette étude, nous visons le développement de ces mêmes types de structures à microleviers en tirant avantage des propriétés physico-chimiques exceptionnelles du diamant.

1.3. Le diamant de synthèse

Le diamant se révèle être un excellent matériau pour la fabrication de transducteurs. Les domaines d'application incluent l'électrochimie [89], la détection de rayonnements de hautes énergies [90], l'optique [91], l'électronique [92] ainsi que la transduction chimique [93].

Dans cette partie, seront décrits les procédés de fabrication du diamant, ses propriétés physico-chimiques exceptionnelles et ses avantages pour la fabrication de transducteurs et de biocapteurs.

1.3.1 Les procédés de fabrication du diamant

Depuis la fin des années 80, le développement des procédés de synthèse du diamant a permis la mise au point de réacteurs permettant l'obtention d'un matériau diamant de très bonne qualité. Ceci a contribué à l'utilisation de ce matériau pour de nombreuses applications technologiques.

En opposition aux techniques HPHT qui ne permettent que de fabriquer des petits diamants [94], les procédés CVD (chemical vapor deposition) [95] permettent la préparation de substrats de diamant, qui permettent d'envisager leur mise en œuvre pour la fabrication de films de diamant polycristallin. Ces procédés de synthèse sont basés sur la réaction sur une surface maintenue à haute température (600-900°C) de radicaux carbonés, générés dans un mélange gazeux composé d'hydrogène (85 à 99.8 %) et de méthane (15 à 0.2 %). L'hydrogène ionisé grave de manière sélective la phase graphite (sp2) permettant ainsi de favoriser la croissance de la phase diamant (sp3). Il existe plusieurs catégories de croissance de type CVD, celles a hautes (>300 hPa) , moyennes (1-300 hPa) ou basses pressions (<1 hPa). Les techniques CVD à hautes pressions permettent une homogénéité spatiale de l'ordre du mm avec une grande vitesse de croissance (proches de 100 µm/heure), celles à moyennes pressions permettent une homogénéité spatiale de l'ordre du cm avec une vitesse de croissance de l'ordre du 5 µm/heure en moyenne. Celles-ci regroupent les procédés HFCVD, RFCVD, MPCVD et DCCVD. Notre étude utilise principalement des procédés MPCVD (Macrowave Plasma Chemical Vapor Deposition), car cette méthode permet d'avoir un bon compromis entre la pureté des films de diamant, leur vitesse de croissance et leur homogénéité spatiale. Ce procédé sera décrit plus en détail dans la section 2.2.1.

Le diamant de synthèse se retrouve sous plusieurs formes (nanocristalline, monocristalline, polycristalline (Figure 1.10), avec des procèdes de synthèse et des propriétés différentes.

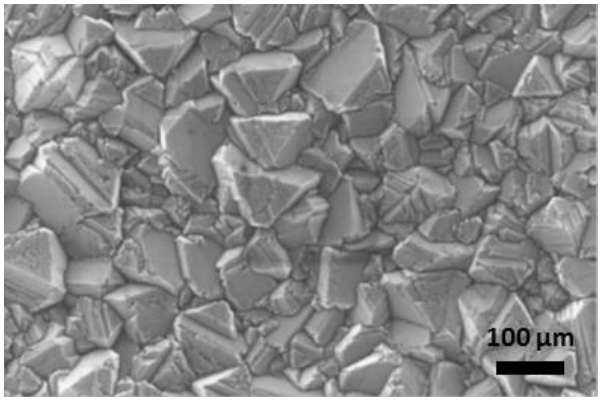


Figure 1.10 - Images MEB de films de diamant polycristallin.

En fin de croissance, la surface du diamant synthétisé par CVD micro-ondes en présence d'un plasma riche en hydrogène est terminée par des liaisons hydrogènes, qui confèrent au matériau des propriétés très hydrophobes.

1.3.2 Les propriétés du diamant

1.3.2.a Propriétés électriques du diamant

Le diamant est un matériau semi-conducteur à grand gap, donc isolant à température ambiante. Lorsqu'il est terminé hydrogène, des travaux ont démontré un caractère conducteur de surface, de type dopage de type P, permettant la fabrication de composants électroniques tels que des diodes [96]. Aussi, lorsqu'une phase vapeur riche en bore est utilisée lors de la croissance, le matériau peut être rendu conducteur en volume. On peut alors l'utiliser comme électrode pour applications électrochimiques [15].

1.3.2.b Propriétés thermiques

Le diamant est un excellent conducteur thermique avec une conductivité thermique de 4 fois supérieure à celle du cuivre. Il permet de dissiper la chaleur générée localement dans des composants électroniques, ce qui peut être très utile dans le domaine de l'électronique où les composants peuvent subir de fortes élévations de température [97].

1.3.2.c Propriétés optiques

Le diamant monocristallin est un matériau transparent sur une grande partie du spectre, du domaine infrarouge au domaine des rayons X. Son indice de réfraction varie de 2,4 à 2,7 du domaine des infrarouges au domaine des ultraviolets.

Il a un très fort pouvoir réflecteur. Il peut être utilisé dans la conception de lentilles notamment pour la fabrication de fenêtres laser CO_2 [98].

1.3.2.d Propriétés électrochimiques

Le diamant dopé au bore (BDD) possède d'intéressantes propriétés électroniques qui en font un matériau de choix en électrochimie. En effet, après dopage au bore (dopage de type p), le matériau présente une forte réactivité électrochimique avec une large fenêtre de potentiel en milieux aqueux en comparaison à d'autres matériaux tels que l'or, le platine ou le graphite, pouvant atteindre 3,5 V en solution aqueuse. Le diamant possède aussi une très faible capacité de double couche, qui est de l'ordre de 2 à 3 µF.cm^{-2}, lui permettant d'avoir un faible courant capacitif. Cette propriété permet la mesure de courants d'oxydation ou de réduction avec un meilleur rapport courant capacitif sur courant faradiques, ce qui améliore la sensibilité du matériau lors de mesures qualitatives ou quantitatives. Du fait de sa forte densité atomique, le diamant ne s'encrasse qu'en surface par l'adsorption d'espèces organiques, ce qui réduit le phénomène de fouling [121].

Ce phénomène de fouling peut être caractérisé par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS pour electrical impedance spectroscopy) au potentiel de repos pour mesurer cette adsorption d'espèces organiques sur le diamant. On peut ainsi l'utiliser pour caractériser un greffage chimique ou par exemple un dépôt de couches organiques comme on le verra dans le chapitre 2.

1.3.2.e Propriétés mécaniques

Le diamant possède des propriétés mécaniques exceptionnelles dont les principales sont résumées et comparées à d'autres matériaux dans le Tableau 1.1 ci-dessous [99].

Tableau 1.1 - Comparaison de propriétés mécaniques du diamant avec celles du silicium [99]

Propriétés mécaniques	Si	GaAs	SiC	Diamant
Masse volumique (kg.m^{-3})	2329	5317	3216	3520
Dureté mécanique (GPa)	8,5	7	24,8	100
Module d'Young (GPa)	130-180	85	700	1050-1200
Coefficient de Poisson	0,22-0,24	0,31-0,32		0,1-0,21
Coefficient de dilatation thermique (m.°C^{-1})	2,6.10-6	5,9.10-6	4,7.10-6	1,1.10-6

Le diamant possède le module d'Young et la dureté mécanique les plus élevés de tous les matériaux, ce qui le rend très résistant à la fracture et lui permet d'avoir des fréquences de résonance et des facteurs de qualité importants. Il faut tout de même souligner le fait que les propriétés mécaniques du diamant dépendent des conditions de synthèse employées (mélange gazeux utilisé, température de synthèse, densité de plasma, etc.) et peuvent donc être modifiées selon l'utilisation finale prévue. A titre d'exemple, on sait que le module d'Young diminue en augmentant la proportion de méthane dans le mélange gazeux lors de la synthèse du diamant [100]. Les propriétés élastiques peuvent aussi être modifiées tel que le coefficient de Poisson [101].

1.3.2.f Propriétés chimiques

Le diamant possède une structure cristalline très dense et un état d'hybridation sp3 du carbone. Le diamant présente un intérêt important pour les applications biochimiques. C'est un matériau inerte chimiquement, résistant aux acides et à la corrosion [102]. Cependant, différents procédés de fonctionnalisation sont possibles sur la surface du diamant. Différents états du diamant peuvent être explorés (hydrogéné, oxydé) pour permettre diverses stratégies de greffage. Le but de toutes ces approches est d'immobiliser chimiquement des molécules d'intérêt directement sur la surface du diamant. Par conséquent, de nombreuses voies pour la fonctionnalisation chimique des surfaces en diamant sont envisageables. Elles sont décrites plus en détail dans la section suivante.

1.3.2.g Les voies de greffages sur diamant

La Figure 1.11 ci-dessous résume les différentes stratégies de fonctionnalisation de surfaces de diamant développées dans la littérature.

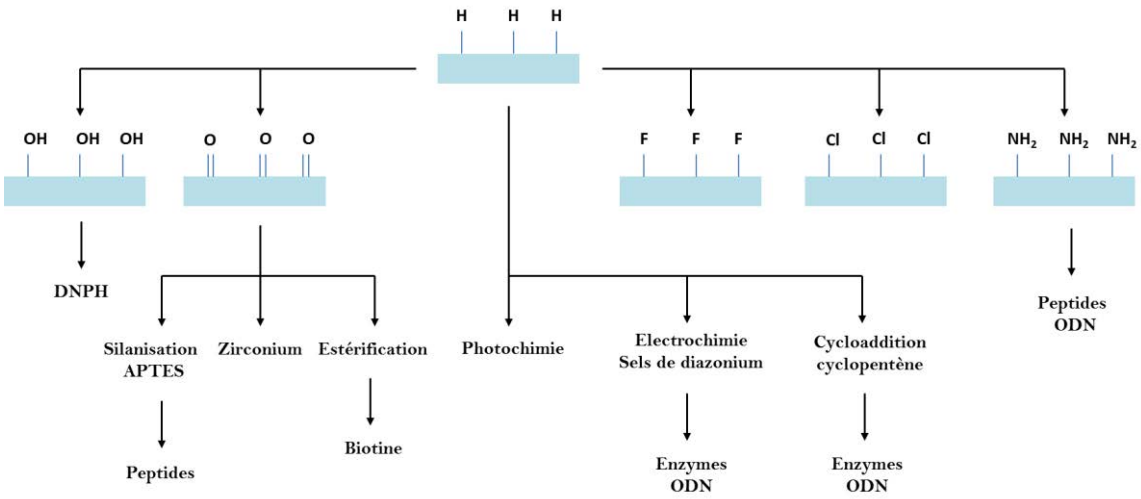


Figure 1.11 - Illustration des différentes stratégies de fonctionnalisation de surfaces en diamant [103]

Les nombreuses voies de fonctionnalisation incluent des réactions d'estérification [104], de silanisation ou des réactions basées sur la chimie du phosphate de zirconium [105] sur surface de diamant préalablement hydrogénée. Il est aussi possible de modifier la surface du diamant en l'exposant à un plasma.

Le greffage par photochimie consiste généralement à déposer un réactif à la surface, et la réaction est assistée par rayonnement UV [106]. Il est possible par cette approche de greffer par exemple des alcènes tels l'acide undecylenique, sur une surface diamant hydrogénée grâce aux UV [107].

Il existe plusieurs méthodes pour obtenir des fonctions oxydées (groupements hydroxyles, carbonyles) en surface du diamant, mise à part l'oxydation naturelle du diamant qui peut intervenir avec le temps [108] : les méthodes électrochimiques telles que l'anodisation, un plasma d'oxygène réalisé sous quelques mBar de pression avec une puissance de quelques centaines de Watt pendant quelques heures ; ou encore grâce à l'utilisation d'une lampe UV sous air ou sous oxygène.

Les fonctionnalisations par voies chimiques permettent d'utiliser certaines réactions issues de la chimie organique. Par exemple, une surface chlorée soumise à des rayonnements UV sous flux d'ammoniac gazeux a permis d'obtenir une surface aminée [109]. L'estérification est une technique faisant réagir un alcool et un acide carboxylique pour former un ester, qui a été utilisée pour greffer une biotine [110] ou encore un benzophénone terminé acide [111].

D'autres méthodes de fonctionnalisation sont basées sur la réduction électrochimique de sels de diazonium sur surface en diamant hydrogéné [112] ou oxydé. Ces méthodes, permettent d'avoir des liaisons C-C très robustes avec la surface du diamant [113]. Ces méthodes sont généralement basées sur la réduction électrochimique de sel de nitrophényl sur une surface de diamant hydrogénée ou oxydée, puis sur la réduction électrochimique des terminaisons nitro en amine primaire qui permet l'immobilisation aisée de biomolécules. Par exemple, cette approche a été décrite, dans la littérature, pour greffer des séquences d'ADN [114] ou des enzymes [115]. Cependant, ce procédé engendrait la formation d'une multicouche par polymérisation en cas d'exposition trop longue, qui peut être gênante dans certaines applications de détection ou quand le transducteur est très sensible à la masse.

Récemment, il a été montré que des molécules possédant des amines primaires pouvaient être immobilisées directement, en une étape, sur des surfaces hydrogénées de diamant [116]. Les réactions sur surface diamant hydrogéné constituent un gain de temps substantiel puisqu'il s'agit de l'état de surface en fin de croissance du diamant de synthèse.

Il a été montré que la liaison entre la surface du diamant et les molécules immobilisées était très forte. Cette réaction est directe, covalente, rapide et contrôlée grâce au temps de greffage. Elle a été utilisée dans le cas de fonctionnalisation du diamant par de la biotine aminée et du ferrocène. L'immobilisation covalente des amines aliphatiques sur diamant hydrogéné a été détaillée dans le brevet de Mailley et al. [117]. Le mécanisme de greffage a été explicité comme une réaction de type substitution nucléophile impliquant une formation de carbanions à la surface du diamant en présence d'ions hydroxydes OH- en solution. En effet, les carbones de la surface du diamant jouent le rôle de carbanions et l'amine celui du nucléofuge. Ainsi la réaction de l'amine protonée avec le carbanion engendra un relargage d'ammoniac et un greffage carbone-carbone (C-C) covalent du composé aliphatique sur la surface du diamant. Un grand nombre de différents composés organiques avec une terminaison amine peut ainsi être utilisé pour réaliser ce greffage. Cette technique de fonctionnalisation a été mise œuvre par Bongrain et al. sur des poutres en diamant, avec l'utilisation de l'acide aminocaproïque représenté sur la Figure 1.12 ci-dessous.

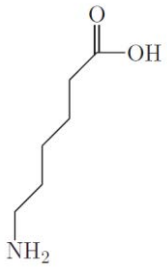


Figure 1.12 – Molécule d'acide aminocaproïque

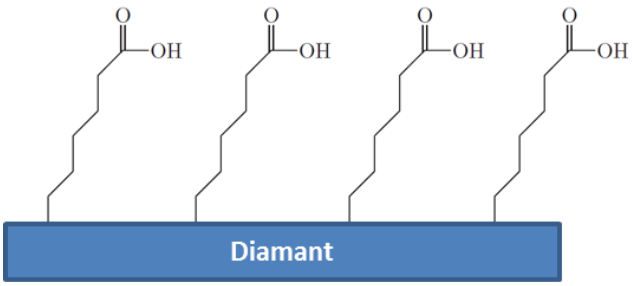


Figure 1.13 – Greffage d'acides aminocaproïque sur diamant hydrogéné

Bongrain et al. ont déjà démontré l'efficacité de ce greffage grâce à la mise en évidence de la protonation et de la déprotonation du groupement carboxylique [93].

Des analyses X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) ont permis par ailleurs de valider ce greffage. Bongrain et al. ont réussi à suivre l'évolution de la fréquence de résonance de 3 poutres de dimensions identiques au cours de l'étape de fonctionnalisation du diamant hydrogénée pour trois concentrations d'acide aminocaproïque différentes (10 µM, 100 µM et 800 µM), comme on peut le voir sur la Figure 1.14 ci-dessous. Il a été prouvé que la cinétique d'augmentation des fréquences de résonance était liée à la concentration d'acide aminocaproïque. En effet, l'évolution la plus rapide est observée pour une concentration de 800 µM et décroit visiblement lorsque la concentration d'acide amino-caproïque est diminuée.

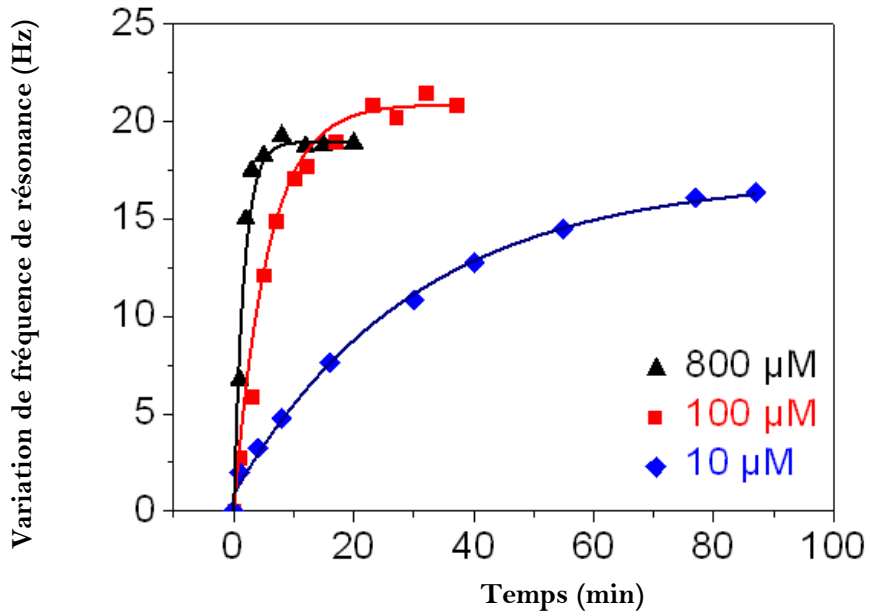


Figure 1.14 - Variation de fréquence de résonance de 3 poutres de dimensions identiques au cours de l'étape de fonctionnalisation pour trois concentrations d'acide amino-caproïque différentes (10 µM, 100 µM et 800 µM) [93]

Dans cette étude, ce procédé de greffage sera utilisé pour fonctionnaliser les surfaces de nos structures SAW et microleviers en diamant car cette procédure de greffage est simple et efficace et permettra par la suite d'immobiliser aisément nos biorécepteurs LBP. En effet, étant sensible à la masse des composants, il est important que la couche sensible des capteurs soit la plus fine possible, et que le greffage associé soit le plus proche de la monocouche comme c'est le cas ici [93]. De plus, il est important d'avoir les greffages les plus stables possibles afin que les capteurs puissent durer dans le temps, ce qui a été prouvé dans la littérature pour cette fonctionnalisation d'amines primaires.

1.3.3 Utilisation du diamant pour la transduction biochimique

Nous avons montré dans les sections précédentes que le diamant possède de nombreuses propriétés électriques, thermiques, optiques et d'excellentes propriétés mécaniques et chimiques. Grâce aux propriétés de greffage démontrées plus haut, il apparaît dorénavant comme une plateforme innovante pour la fabrication de biocapteurs.

Ainsi, afin de permettre de bénéficier de ses propriétés électrochimiques, le diamant dopé au bore (BDD) pour la réalisation d'électrodes a permis d'effectuer des capteurs de composés biochimiques tels que le glucose [118], les lectines [119], l'ADN [120] de même que certains composés explosifs [49].

Par exemple, Weng et al. ont réussi à détecter l'hybridation de l'ADN complémentaire sur une électrode en diamant préalablement fonctionnalisé par de l'ADN à simple brin complémentaire à de faibles concentrations (10^{-19} g.mL^{-1}) en utilisant une approche impédancemétrique [120]. Une réponse beaucoup plus faible a été observée en ajoutant l'ADN non complémentaire, même à d'importantes concentrations.

Un autre exemple de cas d'utilisation d'électrodes BDD pour la détection d'éléments biologiques en milieu liquide est l'étude de Kiran et al., qui permet une quantification de l'acide urique contenu dans l'urine en utilisant la voltamétrie cyclique (CV) [121]. La détection peut être réalisée quasiment en continu étant donné que l'électrode peut être activée dans l'urine et permettre à nouveau de quantifier l'acide urique. Le temps nécessaire à l'activation d'une électrode est de 300 ms et le temps d'acquisition d'un spectre CV est de moins de 200 ms.

Grâce à ses propriétés électriques, le diamant a été utilisé pour l'élaboration de capteurs de type solide state [122]; de capteurs catalytiques grâce à ses propriétés thermiques; de capteurs photoniques grâce à ses propriétés optiques [123], et de capteurs MEMS de types microleviers [124] grâce à ses propriétés mécaniques. Grâce aux abondantes méthodes qui permettent diverses stratégies de fonctionnalisation de la surface du diamant, ce substrat a donc été, à de nombreuses reprises, utilisé pour le développement de capteurs chimiques et biochimiques en phase liquide et plus récemment utilisé aussi en phase gaz tels que pour les transducteurs gravimétriques SAW [125].

Le développement des MEMS en diamant est une thématique de recherche qui a été explorée par plusieurs chercheurs au laboratoire LCD : Bongrain, A. ; Chevalier E.; Scorsone E. et Tard B. Avant mes travaux, des études prospectives ont donc été réalisées sur la réalisation de ces transducteurs et leur fonctionnalisation pour la détection de quelques composés chimiques. Ils seront ici utilisés pour la détection de composés biochimiques en utilisant des voies de fonctionnalisation différentes basées notamment sur l'immobilisation des LBP (Ligand Binding Protéines).

1.4 Les MEMS en diamant

1.4.1 Etat de l'art sur les microleviers en diamant

La Figure 1.15 ci-dessous compare le facteur de qualité de microleviers en diamant et en silicium. Pour des géométries équivalentes, on observe que le microlevier diamant a un facteur de qualité plus important que celui en silicium, comme évoqué précédemment.

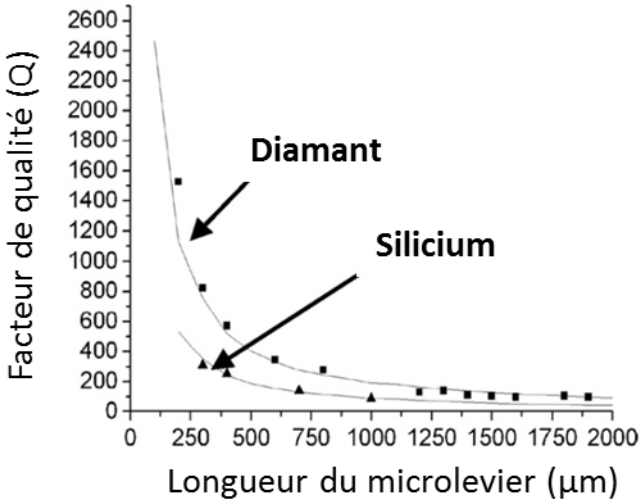


Figure 1.15 - Comparaison du facteur de qualité (Q) entre un microlevier en diamant et en silicium d'épaisseur 4,6 µm [126, 127, 128]

Cette propriété, combinée à la dureté mécanique du diamant, a par exemple permis d'utiliser le diamant pour le revêtement de pointes AFM [129] ou de dispositifs de MEMS RF pour la fabrication d'interrupteurs [130] ou pour des applications de capteurs de pression (membrane).

Concernant la fabrication de biocapteurs, Ahmad et al. ont effectué un dépôt de nanodiamant sur des réseaux de poutres en silicium et ont montré une bonne sensibilité au dinitrotoluène (DNT) (un analogue de structure du trinitrotoluène (TNT)) d'environ 0,77 Hz/ppb [131]. Ahmad et al ont ainsi comparé dans leur étude les caractéristiques physiques, mécaniques et la sensibilité de détection de poutres en silicium avec et sans nanodiamants déposés. Ils ont noté que la constante d'élasticité est multipliée par 7 environ et une meilleure sensibilité avec la présence de nanodiamants sur la poutre.

Les poutres en diamant polycristallin développées par Bongrain et al. ont exploité différentes voies de greffage pour immobiliser différents composés chimiques et biorécepteurs [93, 103, 124]. Le diamant a été dopé pour permettre l'électro-greffage de composés à la surface pour la détection de l'ADN. Ils ont pu démontrer que des séquences d'ADN pouvaient être détectées de manière spécifique, en temps réel, en utilisant des microleviers en diamant opérant en régime dynamique. L'immobilisation de ces derniers se traduit par une variation de fréquence de résonance de la poutre. Une comparaison de l'évolution de la réponse d'un microlevier à la séquence d'ADN non complémentaire et à la séquence d'ADN complémentaire a été effectuée pour approuver les résultats de détection d'ADN. Un exemple de détection de séquences d'ADN, en utilisant un microlevier en diamant, est présenté sur la Figure 1.16 ci-dessous. Une importante variation de fréquence de résonance est ainsi observée lors de l'accroche d'une séquence d'ADN complémentaire sur la surface du microlevier contrairement à l'ajout d'une séquence d'ADN non complémentaire, où aucune modification n'est observée [103].

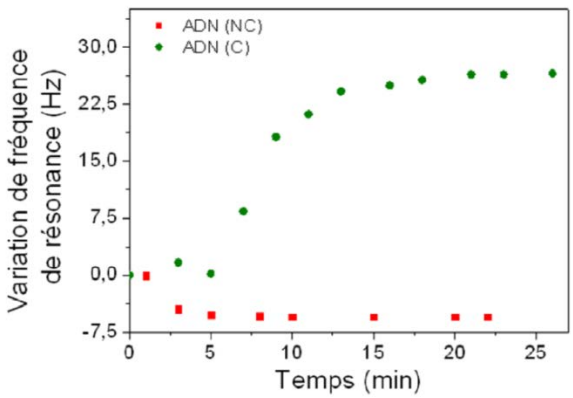


Figure 1.16 - Comparaison de l'évolution de la réponse d'un microlevier à la séquence d'ADN non complémentaire (rouge) et à la séquence d'ADN complémentaire (vert) [103]

La dénaturation de brins d'ADN a aussi été détectée grâce à cette même technique. La Figure 1.17 présente la comparaison de variation de réponses d'un microlevier après dénaturation des brins d'ADN.

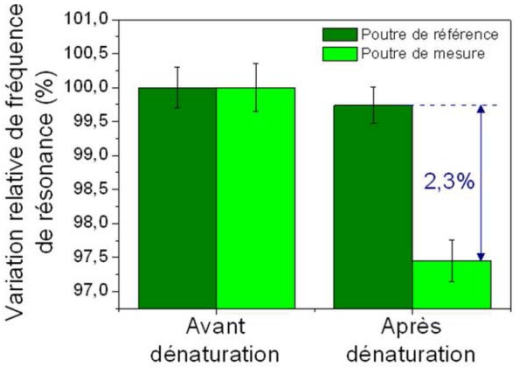


Figure 1.17 - Comparaison de la variation relative de fréquence de résonance entre la poutre de mesure avec de l'ADN immobilisée et la poutre de référence nue avant et après dénaturation de brins d'ADN [103]

Ce dispositif a aussi été capable de mesurer la protonation et la déprotonation d'un acide carboxylique greffé sur sa surface [93] ce qui montre sa remarquable sensibilité. En effet, en fonctionnalisant leurs microleviers en diamant avec des fonctions acide carboxylique, Bongrain et al. ont pu corréler la variation de fréquence de résonance de ces poutres, en effectuant des cycles de pH, avec la protonation/déprotonation de ces terminaisons [93] (Figure 1.18).

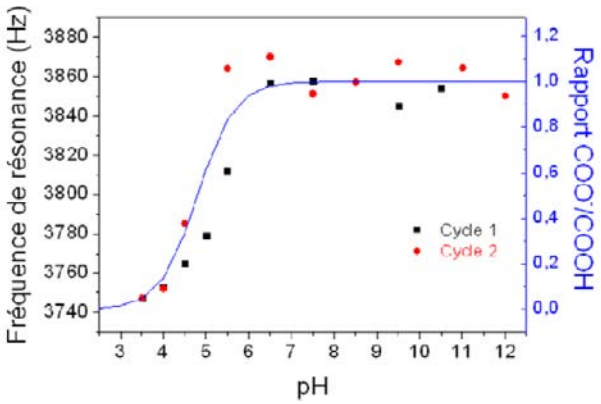


Figure 1.18 - Réponse en fréquence de résonance en fonction du pH de deux poutres fonctionnalisées par l'immobilisation de l'acide amino-caproïque à 800 µM au cours de deux cycles de pH [93].

Dans ce cas précis, Bongrain et al. ont donc réussi à montrer que l'on n'est pas sensible à la masse dans un milieu liquide mais plutôt sensible à d'autres phénomènes qui entrent en jeu tels que les contraintes de surfaces. Les microleviers permettent donc d'obtenir des informations supplémentaires telles que la nature des interactions entre la molécule cible et la surface du microlevier.

1.4.2 Etat de l'art sur les SAW en diamant

Dans la littérature, le diamant est peu souvent exploité comme substrat pour l'élaboration de transducteurs à ondes acoustiques. Lorsque c'est le cas, c'est exclusivement pour ses propriétés de vélocité acoustiques dans le but de réaliser des résonateurs à très hautes fréquences. Pour cela, d'autres matériaux, tels que des couches de ZnO ou d'AlN, sont généralement déposés sur une couche très plane de diamant.

L'utilisation du diamant comme couche mince sensible reste une approche originale développée au LCD et présente de nombreux avantages tels que la maitrise de l'élaboration de couches minces, la surface en carbone permettant de nombreuses voies de greffage, la stabilité de la surface et l'importante surface développée grâce aux dépôts de nanoparticules de diamant sur la surface.

Ici, une fine couche de nanodiamants est déposée sur le dessous du matériau piézo-électrique par couplage électrostatique. Les travaux préliminaires effectués au LCD par Chevalier et al. ont prouvé qu'une simple modification chimique, en oxydant la surface du diamant par exemple, peut affecter très significativement la réponse du SAW à un stimulus chimique [132]. La Figure 1.19 ci-dessous compare la réponse de SAW recouverts d'une couche en diamant oxydé ou en diamant hydrogéné, à des expositions de vapeurs d'éthanol, d'amine, de DNT et de diméthyl-méthylphosphonate (DMMP). Cette figure montre ainsi les variations de sensibilités à ces composés en fonction de l'état de surface du diamant.

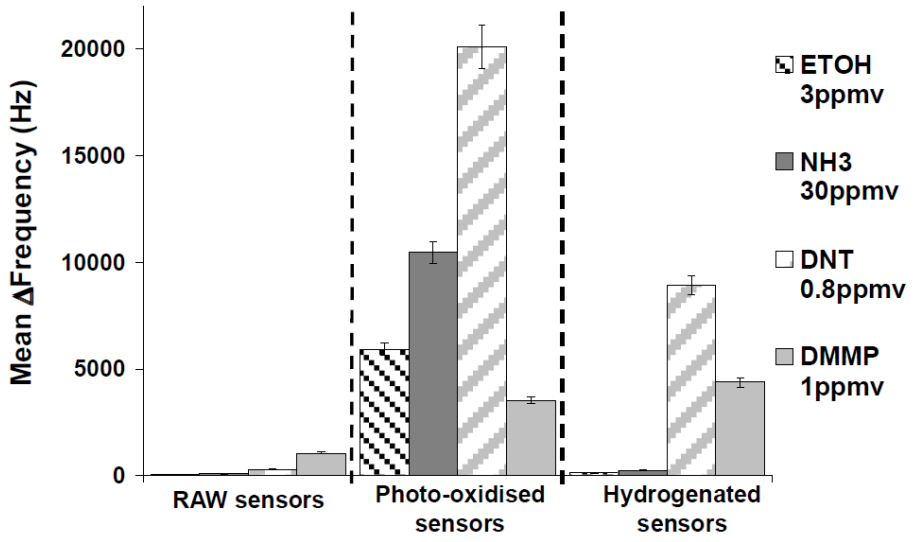


Figure 1.19 - Réponses de SAW en diamant, oxydé et hydrogéné à des expositions respectives d'éthanol, NH3, DNT et DMMP [132].

Suite à ces travaux, Chevalier et al., ont développé une couche sensible à base d'une porphyrine pour la détection de vapeurs nitro-aromatique tels que le 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT). Ces SAW en diamant fonctionnalisés ont permis une détection très sensible reproductible et réversible du DNT (de l'ordre du ppb). La couche de diamant a permis de multiplier par 10 la réponse des capteurs, par rapport à un capteur SAW sur lequel la porphyrine était directement déposée sur la surface du SAW. Par la suite, Tard et al., ont réalisé des capteurs SAW en diamant fonctionnalisés avec d'autres groupements chimiques et ont exploré leurs performances pour la détection de gaz toxiques tels que le DMMP, le DNT, le TNT et des gaz de guerre tels que le gaz moutarde et le gaz sarin. Pour tous les capteurs SAW en diamant développés par Tard et al., les réponses de détection furent relativement rapides, réversibles et reproductibles [125]. Ci-dessous la Figure 1.20 montre la réponse des SAW en diamant avec des terminaisons φ–$(CF3)_2$-OH pour permettre la détection de 7,4 ppm de DMMP [125]. Ici, cette fonction a été choisie pour la grande affinité des groupements φ–$(CF3)_2$-OH avec les organophosphorés.

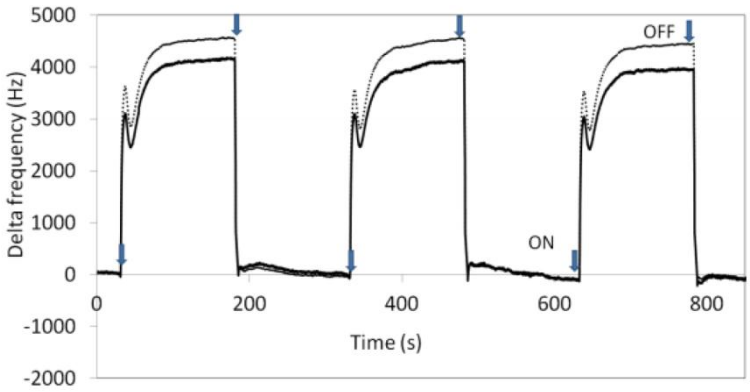


Figure 1.20 - Réponse de deux capteurs SAW en diamant fonctionnalisés par des terminaisons φ-$(CF3)_2$-OH à trois expositions successives de 7,4 ppm de DMMP (débit 200 mL/min) [125]

B. Tard a étudié lors de ces travaux l'influence de certaines terminaisons de surfaces relativement simples sur la réponse des SAW à différentes vapeurs afin de mieux comprendre les mécanismes de détection. En résumé, on peut souligner que la réponse à l'adsorption d'un composé à la surface du SAW peut être corrélée à une perturbation gravimétrique ou à une perturbation viscoélastique (due à un changement du module d'Young de la couche). La perturbation acousto-électrique, due à la modification de la conductivité de surface, reste un phénomène négligeable sur la réponse dans ce cas précis.

Dans cette section, les deux types de transducteurs MEMS en diamant, les microleviers et les SAW ont été présentés plus en détail pour justifier leur utilisation dans notre étude et montrer leur potentiel pour la détection de composés biochimiques.

Nous avons vu par ailleurs que la chimie du carbone permettait de nombreuses fonctionnalisations de la surface du diamant. Dans le cadre d'un projet européen FP7 SNIFFER, nous collaborons avec plusieurs équipes pour la réalisation de biocapteurs à base de récepteurs olfactifs de type OBP et MUP pour la détection de drogues et d'explosifs aux frontières aéroportuaires. Très peu de travaux existent sur ce domaine d'application, c'est pourquoi nous allons nous focaliser sur l'immobilisation de biorécepteurs LBP sur transducteurs en diamant de type SAW et microleviers pour la détection de drogues et d'explosifs. En effet, il a été montré dans la littérature que ces types de LBP sont des protéines très prometteuses pour la détection de petites molécules organiques [133].

1.5 Les récepteurs Ligand Biding Proteins (LBP)

Comme nous l'avons vu dans la section 1.2, un capteur biochimique est généralement composé d'un transducteur et d'une couche sensible qui permettent la détection de composés spécifiques grâce à l'immobilisation de biorécepteurs. Les biorécepteurs utilisés ici sont des protéines de types LBP et plus particulièrement trois types spécifiques de protéines se liant aux molécules odorantes : les protéines de liaison aux molécules odorantes (OBP pour Odorant Binding Protein), les Major Urinary Protein (MUP) et les récepteurs olfactifs (OR).

Les odorants sont de petites molécules organiques qui peuvent émaner de composés tels que les explosifs. Par conséquent, il y a un intérêt croissant pour l'émergence de technologies permettant l'évaluation rapide et non invasive des composés odorants volatils. Essayons tout d'abord de comprendre le fonctionnement du système olfactif ainsi que le mécanisme d'action des protéines OBP, MUP et OR afin de saisir comment fonctionne un biocapteur olfactif biomimétique.

1.5.1 Principales caractéristiques du système olfactif

On peut considérer que le système olfactif consiste en un vaste ensemble de détecteurs. Chacun d'entre eux est chargé de signaler la présence d'une forme moléculaire particulière, qui peut être présente sur plusieurs molécules odorantes différentes. Il existe deux voies d'olfaction. Par voie externe, en inspirant par le nez, on appelle cela l'olfaction directe. Mais aussi par voie rétronasale, les molécules odorantes se trouvant dans la bouche remontent lors de l'expiration au sommet de la fosse nasale et viennent balayer la zone sensible.

Chez les vertébrés, la muqueuse olfactive est le siège de la perception des molécules odorantes. Elle est localisée dans la cavité nasale. Les molécules odorantes, présentes dans l'air, sont captées par les protéines de transport, les OBP, puis conduites à travers le mucus vers le récepteur olfactif transmembranaire, les OR.

Le récepteur OR active alors une protéine G intracellulaire qui libère sa sous-unité activée. Celle-ci va initier la production de messagers chimiques, notamment l'adénosine monophosphate cyclique à partir de l'adénosine triphosphate, via l'activation de l'adénylate cyclase. La cascade d'événements se poursuit par la modification de l'état de polarisation de la membrane, effectuée par échange d'ions Cl^-, Na^+ et Ca^{2+} [134]. La Figure 1.21 ci-dessous résume le processus de perception des odorants par le mucus olfactif [135].

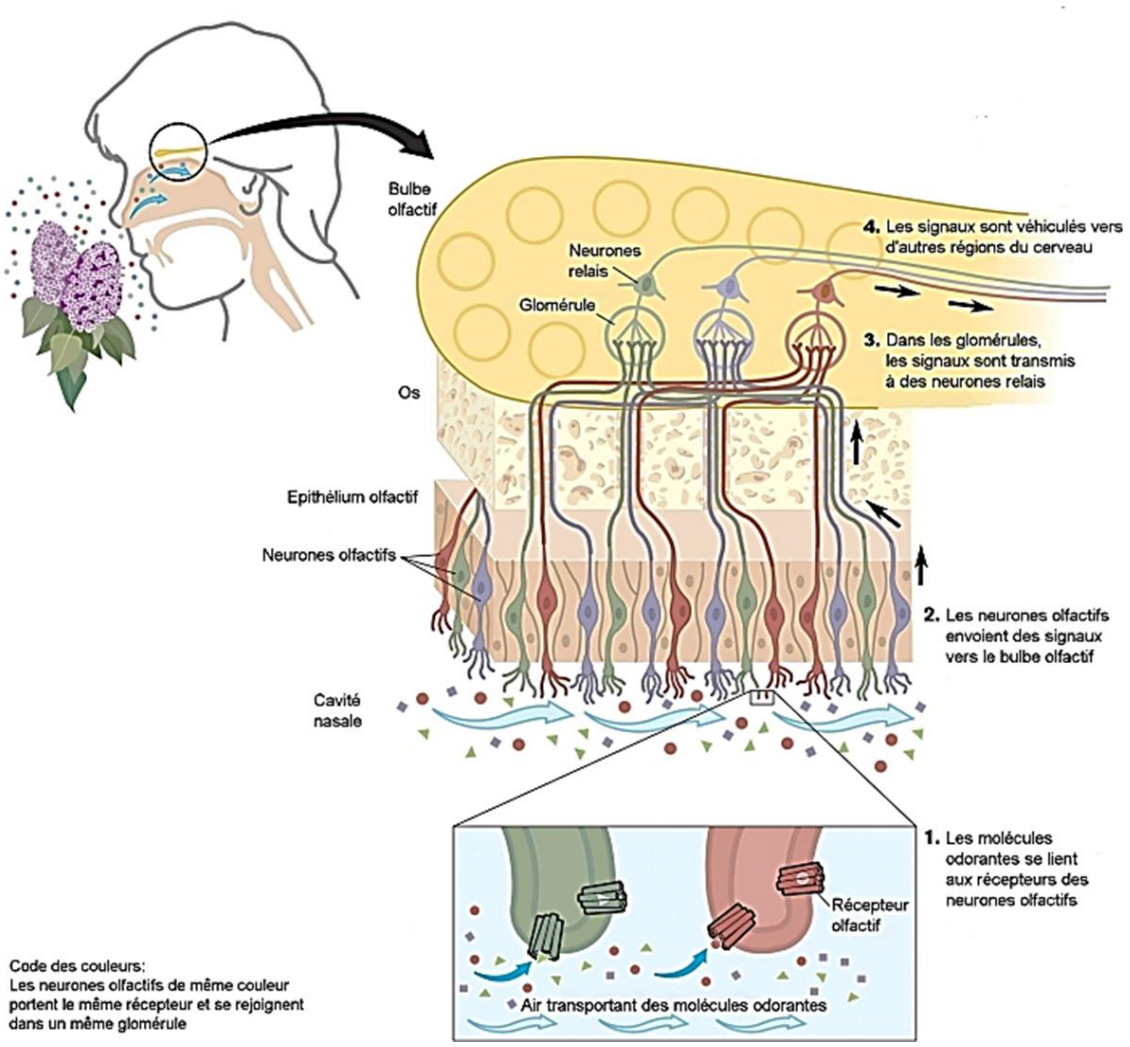


Figure 1.21 - Mécanisme d'action simplifié du système olfactif [135]

1.5.2 Les OBP

1.5.2.a Localisation

Les OBP semblent être des protéines de transport de molécules odorantes. Elles sont localisées dans le mucus nasal des vertébrés (~10 mM) [136,137] et dans la lymphe sensillaire pour les insectes (~10 mM) [138]. Les OBP font parties de la classe des lipocalines [139]. Elles ont été découvertes entre 1981 et 1982 par l'équipe de Pelosi [140]. Les OBP d'insectes (13-16 kDa [141]) ont été découverts récemment en 2007 et ont des morphologies assez différentes des OBP de mammifères par exemple. Ils se trouvent plutôt au niveau des antennes des insectes [142]. De nos jours, diverses OBP ont été identifiées chez de nombreux vertébrés comme la vache [143], le porc [144, 145], le lapin [146], la souris [147], le rat [148], le xénope (amphibien) [149], l'éléphant [150] et aussi l'être humain. [151]

1.5.2.b Structure

De manière classique, la structure tridimensionnelle des protéines est établie et vérifiée par des techniques comme la cristallographie aux rayons X, la microscopie électronique et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) [152]. Une fois établies, les structures des OBP sont stockées dans une banque de données sur les protéines du Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (PDB pour Protein Data Bank). Les OBP sont des petites protéines d'environ 150 acides aminés possédant une cavité hydrophobe composée de 8 feuillets β et d'un pont disulphure chez les mammifères [152]. Chez les insectes, on parle souvent de protéines de liaison aux phéromones (PBP pour pheromon binding protein) et leur cavité hydrophobe est composée de 6 hélices α et de 3 ponts sulfure-sulfure (S-S) [153]. La Figure 1.22 ci-dessous illustre différents OBP provenant de diverses espèces [154].

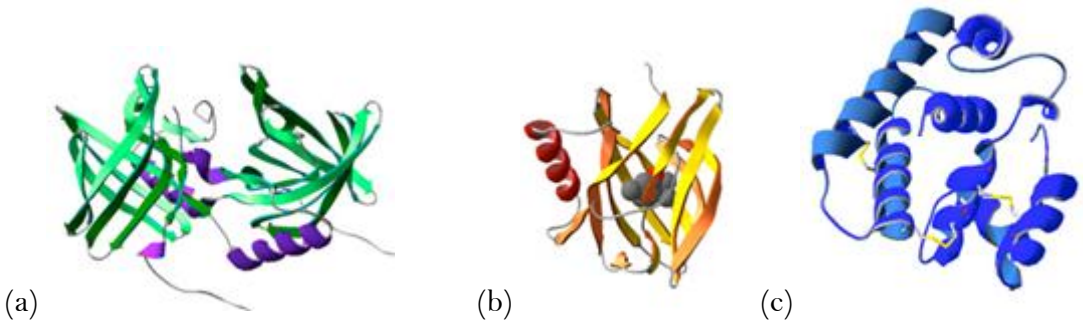


Figure 1.22 - Représentations des structures de l'OBP de vache (a), l'OBP de porc contenant un odorant (thymol) à l'intérieur de sa cavité (b) et l'OBP de l'insecte Bombyx mori (c) [155, 156, 157].

1.5.2.c Caractérisation

La première caractérisation des OBP date de 1989 [158]. Des expériences de compétition réalisées avec le 2-isobutyl-3-méthoxypyrazine IBMP [3H] (c'est-à-dire incubée avec un ligand radioactif marqué au tritium) ont permis de mettre en évidence une grande variété d'odorants capables de lier l'OBP [159]. En effet, l'OBP interagit avec des odorants de structures chimiques très différentes (terpènes, aldéhydes, esters, composés aromatiques) pour des affinités apparentes de liaison qui s'échelonnent de 0,2 à 100 mM [160]. L'IBMP est le principal ligand utilisé pour caractériser de nouveaux OBP. Cette molécule odorante est dépourvue de signification biologique chez l'animal, puisque sa perception ne déclenche pas de réponse comportementale spécifique. Elle a été choisie pour son seuil de détection particulièrement bas chez l'Homme et est considérée dans la littérature comme une référence de détection. C'est un odorant rappelant l'odeur du poivron.

1.5.2.d Propriétés vis-à-vis des odorants

Les OBP ont la propriété de se lier de façon réversible à des odorants variés par leur taille et leur classe chimique [161]. Principalement en charge du transport des molécules odorantes jusqu'aux récepteurs olfactifs, les interactions OBP-ligand peuvent varier et ne sont pas toutes exploitées ni connues à ce jour. En effet, le rôle des OBP n'est toujours pas complètement compris [144] et le mode de relargage de l'odorant reste obscur [162]. On ne sait pas encore si l'OBP relargue l'odorant quand elle se trouve à proximité de l'OR ou s'il se forme un complexe entre OBP/Odorant avec l'OR qui faciliterait la transmission de l'odorant [163]. Le mécanisme d'action simplifié d'un OBP transportant une molécule odorante vers le récepteur olfactif est représenté dans la Figure 1.23 [164].

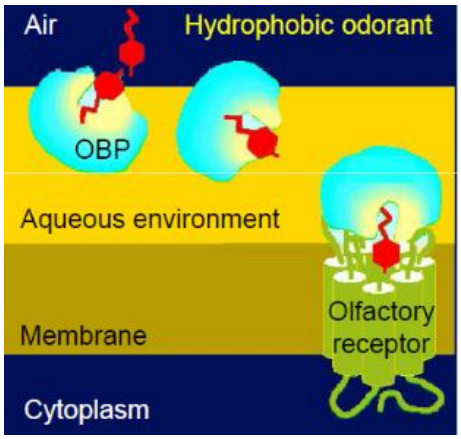


Figure 1.23 - Mécanisme d'action simplifié des OBP [164]

Plusieurs interactions sont donc possibles, conduisant soit à une activation du récepteur en présence d'odorant, soit à l'inactivation et à l'élimination de la molécule odorante par une enzyme de dégradation [165]. Dans ce modèle, l'OBP pourrait se lier plusieurs fois à une molécule odorante avant ou après l'interaction de celle-ci avec le récepteur et une molécule odorante pourrait interagir avec plusieurs récepteurs avant d'être inactivée. Ce schéma assigne donc aux OBP des propriétés multifonctionnelles: solubilisation, transport et protection vis-à-vis des enzymes de dégradation. Chez les insectes, les OBP seraient plus que de simples transporteurs. Elles participeraient activement au filtrage et à la reconnaissance des signaux olfactifs à la périphérie des neurones sensoriels. Chaque OBP aurait un répertoire de ligand établi avec une affinité déterminée pour une molécule odorante ou une série chimique spécifique [158]. Il faut cependant rappeler qu'aucune molécule odorante spécifique ne présente une spécificité extrême avec un OBP en particulier. Le rôle des OBP est de pouvoir se lier à différentes classes de molécules odorantes. D'où leur utilisation pour notre étude de transduction olfactive.

Il existe une cavité hydrophobe profondément enchâssée dans chaque OBP qui se referme lors de la fixation de ligand [166]. La cavité représente le site de liaison principal avec les molécules odorantes. La fixation de ligand provoque donc un léger changement conformationnel de l'OBP mais peu important chez la plupart des OBP [167, 168] sauf pour l'OBP de rat qui semble souligner une modification de conformation assez importante lors de l'interaction ligand-OBP [148]. Sur la base de structures cristallines obtenues entre l'OBP et des odorants de différentes familles chimiques, le type et la nature des interactions ont pu être décrits dans la littérature.

Le degré de similarité varie de 20 à 40 % entre deux différentes espèces [169], en effet les OBP provenant de deux vertébrés présentent peu d'homologies dans leurs séquences primaires. Cependant, certaines d'entre elles présentent plus d'homologie : l'OBP-II de souris et l'OBP-I de rat sont homologues à 80 % [170]. En effet, il est possible que deux OBP extraites du même animal présentent moins d'homologies entre elles qu'avec des OBP extraites d'autres espèces.

1.5.3 Les MUP

1.5.3.a Localisation

Les MUP sont une sous-famille de protéines OBP impliquées dans la capture des molécules de phéromones sexuelles que l'on trouve en abondance, en dehors du mucus nasal, dans l'urine et d'autres sécrétions de nombreux animaux [171]. Ce sont donc aussi des protéines de la classe des lipocalines qui sont secrétées par le foie et excrétées vers l'urine où leur concentration peut atteindre 10 mg/mL [172].

1.5.3.b Historique

Entre 1932 et 1933, un certain nombre de scientifiques, dont Thomas Addis, ont découvert indépendamment les uns des autres, que certains rongeurs avaient des protéines dans leurs urines [173, 174, 175]. Toutefois, il a fallu attendre les années 1960 pour que les principales protéines urinaires de souris et de rats soient décrites en détail [176, 177].

1.5.3.c Structure

Les MUP ont une structure caractéristique faite de huit feuillets β antiparallèles formant une sorte de tonneau ouvert, avec des hélices α aux deux extrémités [178]. Elles ont par conséquent, une forme caractéristique de gant, comprenant une poche qui peut fixer de petits composés chimiques organiques [179]. La Figure 1.24 ci-dessous illustre un MUP de souris [180].

Figure 1.24 - Représentation de la structure d'un MUP de souris contenant un odorant (N-phényl-naphthylamine (NPN)) à l'intérieur de sa cavité [180]

1.5.3.d Fonction principale et propriétés vis-à-vis des phéromones

Les animaux terrestres vivent dans un monde d'odeurs qui les renseignent sur leur environnement, leurs congénères et leur partenaire sexuel. Ces informations peuvent les avertir d'un danger immédiat ou les aider à choisir leur nourriture par exemple.

Les MUP sont capables de se lier spécifiquement à des ligands volatils, comme la 2,3-dihydroexo-brevicomine et le 2-set-butylthiazole [181], dont l'activité phéromone chez la souris femelle est bien connue. Ces molécules odorantes agissent comme des phéromones mâles « modificatrices de comportement » puisque leur perception peut déclencher chez la femelle une puberté précoce ou inhiber le développement d'œufs fécondés par un autre male [182].

Par instinct, l'animal plonge son museau dans l'urine déposée par ses congénères et le complexe MUP-phéromone arrive alors au contact du mucus nasal et des récepteurs olfactifs. Les protéines MUP jouent de multiples rôles dans la communication chimique entre animaux, servant de transporteurs et de stabilisateurs de phéromones chez les rongeurs et les porcs par exemple. On a démontré qu'elles provoquaient un comportement agressif chez les souris mâles et qu'une protéine spécifique retrouvée dans l'urine de souris mâle était sexuellement attirante pour les femelles. Elles peuvent également fonctionner comme des signaux entre des espèces différentes: des souris affichent une réaction de peur instinctive à la détection de MUP provenant de prédateurs comme les chats et les rats. On a également démontré que les MUP de souris servaient de stabilisateurs de phéromone, permettant une libération lente du produit qui prolonge la durée de vie des phéromones urinaires volatiles utilisées par les mâles pour marquer leurs territoires [183].

1.5.4 Les récepteurs olfactifs (OR)

1.5.4.a Historique et structure

On doit la première découverte des récepteurs olfactifs (OR) à Linda Buck et Richard Axel en 1991 [184].

La liste des OR, qu'ils soient complets ou partiellement identifiés, est large et il vaut mieux faire référence, à défaut de catalogue, à la base de données sur les OR (Olfactory Receptor DataBase) [185]. Cette base de données décrit à ce jour plus de 500 OR chez plus d'une vingtaine d'espèces allant de la drosophile à l'homme [186].

Les OR sont de petites tailles (environ 300 résidus d'acides aminés) [187], avec des boucles intra- et extracellulaires avec des segments terminaux très courts. La Figure 1.25 ci-dessous représente un OR de souris [188]. Les OR sont par opposition aux OBP et aux MUP extrêmement sélectifs, mais néanmoins peu stables aux conditions extérieures de par leur structure complexe, ce qui rend leur utilisation davantage délicate sur des systèmes électroniques de détection d'odeur.

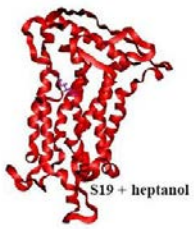


Figure 1.25 - Représentation de la structure d'un récepteur olfactif S19 de souris contenant un odorant (heptanol) aux sites de liaison

1.5.4.b Localisation

Les OR sont des récepteurs couplés aux protéines G ayant pour ligands des molécules odorantes. Les récepteurs olfactifs sont localisés sur la membrane des cils des neurones sensoriels olfactifs qui projettent leurs axones vers le bulbe olfactif, premier relais de la perception olfactive dans le cerveau [184].

1.5.4.c Propriétés

L'interaction d'un récepteur olfactif avec son ligand odorant provoque un changement de conformation du récepteur, qui induit son interaction avec la protéine G, et initie une cascade de signalisation intracellulaire. Un potentiel électrique est généré, qui se propage le long de l'axone et parvient jusqu'au cerveau où l'information relative à l'odorant détecté est décodée [189]. Un récepteur est très sélectif par rapport à une molécule odorante et évolue dans un environnement membranaire biologiquement plus complexe que celui des OBP et des MUP. Les OR sont capables de détecter les molécules odorantes dans l'air mais aussi lorsqu'elles sont diluées dans l'eau.

Pour résumer, les OBP, MUP et OR ont de grandes affinités avec les molécules odorantes. Quelques études tentent de réaliser des transducteurs à base de ces protéines pour diverses applications telles que l'agroalimentaire pour la détection de salmonellose dans la viande de bœuf [190] et la protection de l'environnement pour la détection de composés polluants. Dans la section suivante, les principaux types de transducteurs existants fonctionnant avec des OBP, des MUP et des OR, sont décrits, de manière non exhaustive.

1.5.5 Etat de l'art des biocapteurs constitués de LBP

L'étude des récepteurs olfactifs a donné une impulsion pour une nouvelle génération de biocapteurs, à base de protéines olfactives, plus spécifiques et plus sensibles que d'autres types de biocapteurs.

Les caractéristiques propres des récepteurs olfactifs permettent potentiellement d'envisager l'obtention de capteurs ayant une très grande spécificité vis-à-vis des odorants et une sensibilité extrême, puisque les seuils de détection physiologique des récepteurs sont très bas, jusqu'à 10^{-14} M [191]. Toutefois, la préparation des récepteurs, leur transfert et leur immobilisation sur des surfaces à l'échelle micro- ou nanométrique, constituent des défis pour aboutir à un tel biocapteur.

La possibilité d'immobiliser des OR, des OBP et des MUP sur un support solide, préalablement biofonctionnalisé, a été récemment explorée pour assembler les éléments sensibles d'un nez bioélectronique et créer un biocapteur olfactif [192, 193, 194, 195] : c'est-à-dire un dispositif associant un support sur lequel sont greffés des récepteurs olfactifs, des OBP ou des MUP permettant la reconnaissance de l'odorant recherché, et un transducteur permettant de transformer l'événement de reconnaissance en un signal physique mesurable.

Il peut donc envisager plusieurs techniques afin d'immobiliser les biorécepteurs LBP sur la surface de transducteurs. Immobiliser des LBP sur diamant n'a jamais été vu dans la littérature : les travaux de cette thèse ont été à l'origine d'une des premières démonstrations de l'approche. De nombreuses autres équipes ont principalement travaillé sur des surfaces en or pour l'immobilisation de LBP sur différents types de transducteurs : QCM [196], FBAR [197], etc. Un exemple type d'immobilisation de LBP sur surface en or est explicité dans cette section. Cependant, dans certains cas, différents matériaux ont été utilisés pour l'immobilisation d'OBP ou d'OR par exemple: film de ZnO [197], silicium [198], nanotubes de carbone (CNT) [199], etc., que nous détaillerons par la suite.

Les LBP ont souvent une séquence d'amine qui permet leur immobilisation par voie chimique sur les surfaces des transducteurs via ce groupement d'amine primaire. Dans la littérature, la méthode la plus couramment utilisée pour immobiliser les OBP sur une surface en or est la génération de monocouches auto-assemblées (SAM pour Self-Assembled Monolayer). Cette étape vise à fonctionnaliser la couche d'or du capteur à l'aide de thiols via la formation de SAM par incubation. Le groupement de tête (-SH) interagit de manière covalente avec l'or selon la réaction (1.14). Le groupement thiol -SH (nommé aussi mercaptan) est attaché à un atome de carbone.

$$R\text{-}SH + Au \rightarrow R\text{-}S\text{-}Au + H^+ + e^- \qquad (1.14)$$

Pour ce faire, l'immersion du transducteur pendant plusieurs heures dans une solution d'acide est nécessaire. Différents acides peuvent être utilisés tels que l'acide lipoïque ou encore l'acide 16-mercaptohexadecanoique (MHDA) pour la formation des SAM. Ces acides sont représentés ci-dessous sur la Figure 1.26.

Figure 1.26 - Représentation de l'acide lipoïque (à gauche) et de l'acide MHDA (à droite)

Le groupement fonctionnel de queue carboxyle (–COOH) constituera un site d'accueil privilégié, après activation, pour l'accroche covalente des biorécepteurs LBP comme représenté sur la Figure 1.27 suivante.

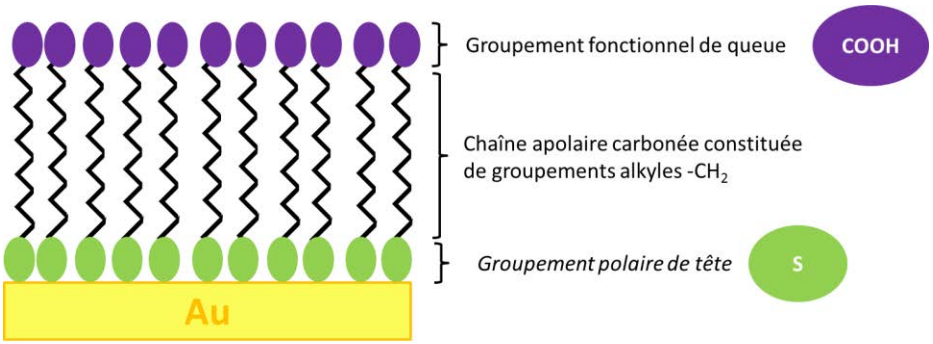


Figure 1.27 - Schéma explicatif de l'accroche des SAM sur une surface d'or.

L'activation consiste en une réaction chimique avec le couplage classique 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimidehydrochloride/sulfo-N-hydroxy-succinimide (EDC/NHS), qui va remplacer la partie hydroxyle –OH des groupements fonctionnels carboxyles –COOH par des groupements succinimides, nécessaires à la réaction d'accroche des biorécepteurs. L'accroche des LBP s'effectue via le groupement amine –NH2. Les étapes du couplage EDC/NHS sont détaillées dans la Figure 2.23 de la section 2.3.1. Cette technique d'immobilisation est aussi bien utilisée pour l'immobilisation de MUP, d'OBP que pour les récepteurs olfactifs. Ainsi les fractions de membranes d'OR peuvent être, eux aussi, ajoutés et immobilisés sur une surface de SAM sur un transducteur en or.

1.5.5.a Les biocapteurs existants constitués d'OBP

D'autres moyens subsistent pour déposer une importante quantité de LBP à la surface d'un matériau : l'adsorption physique ou physisorption qui met en jeu des liaisons faibles, du type forces de van der Waals. Ainsi l'équipe de Zhao et al. a déposé des gouttes de solution d'OBP à la surface ZnO d'un transducteur de type FBAR pour permettre une physisorption plus ou moins importante selon le temps d'adsorption plus ou moins long [197]. Cette technique est généralement plus utilisée pour les OR que pour les OBP car les récepteurs olfactifs sont connus pour être biologiquement plus complexes, plus difficiles à avoir en grande quantité et aussi plus laborieux à manipuler pour un greffage précis sur des surfaces complexes. Trop de pertes seraient engendrées.

C'est pourquoi cette technique simple de physisorption reste très employée pour l'immobilisation d'OR sur transducteurs car il suffit de déposer des fractions de membranes d'OR et de les laisser sécher à la surface. Cependant cette technique est en général réversible.

Les OBP peuvent être immobilisées sur la surface des transducteurs pour des applications multiples : contrôle alimentaire pour un contrôle de qualité (présence de substances toxiques ou nocifs pour l'homme [190]), suivi environnemental (contrôle qualité de l'eau et de l'air [200]), sécurité aux frontières (détection de substances toxiques, dangereuses, ou illégales tels les explosives [201]), et le diagnostic médical (détection précoce du cancer du sein [202], diabète [203], etc.).

Il existe plusieurs techniques pour détecter la liaison entre une molécule odorante et une protéine OBP immobilisée en surface du capteur. En effet, cette liaison ligand-OBP peut être mesurée par un transducteur grâce au changement des propriétés électriques ou thermiques de la protéine, de son indice de réfaction après liaison, à la masse rajoutée sur le capteur du ligand lié à l'OBP ou au déplacement d'une sonde fluorescente préalablement fixée sur le site de liaison de l'OBP.

On peut mesurer l'affinité d'un OBP envers un ligand par des mesures de compétitivité de liaison. Une sonde fluorescente, telle que le 1-aminoanthracène (1-AMA) par exemple, est utilisée pour de telles expériences. Dans un premier temps, on mesure l'affinité de l'OBP avec la sonde fluorescente 1-AMA. L'affinité décrit la force d'une interaction non-covalente entre la protéine OBP et le ligand qui se fixe sur un site à sa surface. Elle se mesure quantitativement par le biais de la constante d'équilibre association/dissociation (forme liée et non-liée au ligand). La sonde est excitée par fluorescence et son spectre d'émission est enregistré. Une sonde liée à l'OBP n'émettra pas le même signal qu'une sonde non liée à l'OBP. La quantité exacte de sonde fluorescente et d'OBP dans le milieu sont connues. Ainsi les interactions entre l'OBP et la sonde fluorescente 1-AMA peuvent être suivis en mesurant l'intensité de l'émission de fluorescence du milieu qui augmente durant l'ajout d'aliquotes de 1-AMA dans le milieu. Une fois la constante de dissociation ($K_{1\text{-AMA}}$) estimée, l'affinité du ligand est aussi mesurée par compétitivité de liaison : en mesurant l'intensité de l'émission de fluorescence du milieu qui diminue durant l'ajout d'aliquotes de ligand dans le milieu. Ainsi la constante de dissociation (K_D) du compétiteur (ligand) est calculée à partir de la valeur IC_{50} en utilisant l'équation 1.15 :

$$K_D = \frac{[IC_{50}]}{1 + \frac{[1-AMA]}{K_{1-AMA}}} \quad (1.15)$$

$[IC_{50}]$ étant la concentration inhibitrice médiane,
$[1\text{-AMA}]$ la concentration des 1-AMA libres, non liées,
$K_{1\text{-AMA}}$ la constante de dissociation de l'1-AMA avec l'OBP

Plusieurs études ont été menées en combinant les OBP avec différents transducteurs pour l'élaboration de capteurs olfactifs. En 2005, Hou et al. ont été capables de former des films de type Langmuir-Blodgett constitués de protéines OBP de rat sur des électrodes en or [204]. En exposant deux films, l'un avec des OBP et l'autre nu, à des vapeurs d'isoamyl d'acétate, ils ont remarqué une importante différence de résistance électrique entre ces deux films. Cette expérience ne s'est malheureusement pas attardée sur la sélectivité, la réversibilité ou la durée de vie des capteurs.

L'utilisation des QCM reste plus fréquente pour les applications de capteurs biomimétiques utilisant des OBP. En 2011, Sankaran et al. ont immobilisé des OBP appelées LUSH provenant de la drosophile sur des microbalances à quartz dans le but de détecter des composés alcools pour des applications agroalimentaires (contrôle de qualité) [205]. La présence de composés alcools dans une viande bovine traduit une contamination par la salmonelle. Dans leur cas d'étude, un changement de résonance de fréquence du cristal a été observé lors de l'exposition du capteur aux molécules cibles. Ce dispositif OBP-QCM créé a pu détecter 2 composés alcools : le 3-méthyl-1-butanol et le 1-hexanol à des concentrations de quelques ppm. La spécificité du capteur n'a pas été démontrée avec d'autres composés organiques de différentes natures ou tailles. Un seul type d'OBP a été utilisé dans ce cas. Dans une autre étude, plusieurs types d'OBP ont été testés avec divers composés odorants à concentrations différentes [206]. En effet, Persaud et al. ont, par exemple, réussi l'immobilisation d'un grand nombre d'OBP provenant de plusieurs espèces (porc, guêpe, etc.) sur des QCM couverts d'or [207]. Ils ont montré la réversibilité des réponses pour chaque OBP étudié ainsi que leur sélectivité envers les odorants. Ils ont remarqué que la sensibilité de leur QCM était plus importante lors de la détection du composé pyridine. La Figure 1.28, ci-dessous, illustre par exemple la détection de composés de la famille des pyrazines par des QCM avec des OBP de porc immobilisés à sa surface.

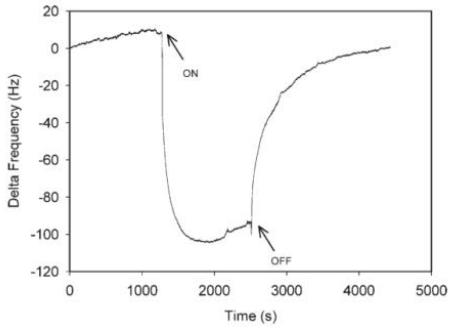


Figure 1.28 - Réponse d'un QCM couvert d'OBP de porc à une exposition de 2-isobutyl-3-méthoxypyrazine (350 ppm dans l'air) [207]

L'équipe de Di Pietrantonio et al. a été la première, en 2013, à combiner l'utilisation des OBP avec des réseaux de capteurs de type SAW [208]. Deux types d'OBP ont été utilisés dans cette expérience, un OBP de porc et un OBP de bovin, pour la détection de trois composés : le 1-octen-3-ol et le carvone. L'OBP de porc a été significativement plus sensible à la présence d'octenol ce qui s'est traduit par un signal de détection cinq fois plus important lors de l'exposition. Ils ont aussi essayé de comparer deux OBP de bovins, un mutant et non-mutant, pour vérifier si la sensibilité pourrait être augmentée en modifiant l'OBP de façon à le rendre plus spécifique ou plus sensible à un type de composés précis. Malheureusement, les deux OBP bovins ont donné des réponses quasiment similaires. Ce dispositif créé s'est avéré robuste avec une bonne reproductibilité et une sensibilité de l'ordre de quelques ppm.
On remarque tout de même que les QCM présentés dans cette section sont souvent limités par la sensibilité du dispositif créé.

1.5.5.b Les biocapteurs constitués de MUP

Peu d'études portent sur l'immobilisation de MUP sur des transducteurs. Les principaux travaux se portent en effet sur les OR et les OBP. Un rare exemple de l'utilisation des MUP, associé à un transducteur, est l'étude de Rodgers et al. en 2010 qui a développé une méthode d'immobilisation de MUP en monocouches auto-assemblés sur QCM [209]. Il a utilisé la même méthode que pour l'immobilisation de tout type de protéine taggué avec un groupement histidine. Ils ont démontré un signal conséquent en plongeant le MUP-QCM dans une solution contenant des ligands 2-isobutyl-3-méthoxypyrazine.

1.5.5.c Les biocapteurs constitués d'OR

Les capteurs à base de récepteurs olfactifs sont évidemment plus nombreux que ceux développés avec les MUP. De nombreux exemple peuvent être trouvés dans la littérature : capteurs BioFETs [210], SPR [163], capteurs piézoélectriques, QCM, etc.

Il s'agit ici d'utiliser les capacités naturelles de détection des odeurs par les récepteurs olfactifs, après avoir immobilisé ces derniers sur des surfaces spécifiquement fonctionnalisées et de mesurer une variation de signal au niveau du transducteur.

Des techniques d'accroche originales et peu explorées ont été envisagées par quelques équipes. Par exemple, l'équipe de Hou et al. a immobilisé des OR de rat sur des électrodes en or via le couplage biotine-streptavidine [204]. C'est-à-dire qu'ils ont biotinylés des OR pour les coupler à une surface recouverte de streptavidine comme l'illustre la Figure 1.29.

La streptavidine est connue pour sa très forte affinité avec la biotine. La constante de dissociation (Kd) du complexe biotine-streptavidine est de l'ordre d'environ 1×10^{-15} mol/L, se classant parmi les plus fortes interactions non-covalentes connues dans la nature. Ainsi les OR sont immobilisés fixement sur la surface du transducteur.

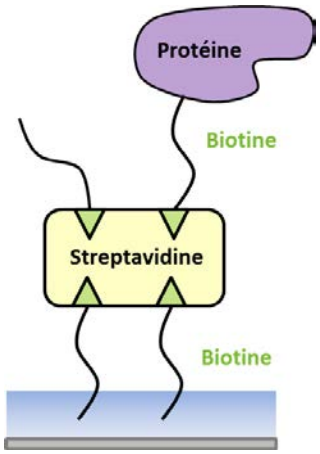


Figure 1.29 - Schéma illustrant le couplage biotine/streptavidine sur un transducteur

Cette technique peut être largement utilisée pour faciliter la manipulation des OR et leur immobilisation sur une surface contrôlée : la préparation de nanosomes isolés contenant des membranes d'OR. En Effet, Vidic et al. ont réussi à déposer le récepteur OR1740 sur une surface d'or fonctionnalisée par une monocouche autoassemblée de thiols modifiés (self-assembled monolayers (SAM)) en utilisant cette méthode. Les thiols sont des molécules amphiphiles composées d'une chaîne aliphatique et d'un groupement hydrophile portant le groupe thiol (-SH). Pour cela, les OR ont été exprimés dans une membrane plasma. Des nanosomes (d'environ 50 nm) ont été construits autour d'eux. Ces nanosomes sont obtenus mécaniquement en découpant des cellules de levures en vésicules dans lesquelles étaient exprimées les OR, la taille homogène est obtenue par sonification. Ensuite les nanosomes, contenant les membranes d'OR, ont été spécifiquement immobilisés sur les substrats. Une injection

de molécules odorantes provenant de l'hélional a provoqué la stimulation du récepteur sur le capteur qui a été traduit par une variation de signal. Or aucun changement de signal n'a été observé quand l'hélional est remplacé par un odorant non spécifique à l'OR1740 dans les mêmes conditions expérimentales, ce qui prouve bien la spécificité de ce capteur réalisé à base d'OR. Cette étude a aussi utilisé l'impédancemétrie pour évaluer toute modification électrique provoquée par le changement de conformation du récepteur induit par la liaison de son ligand odorant. La Figure 1.30 illustre l'adsorption et l'immobilisation spécifique du nanosome OR sur les SAM [211]. Cette technique d'immobilisation peut donc permettre une certaine orientation des OR à la surface du transducteur.

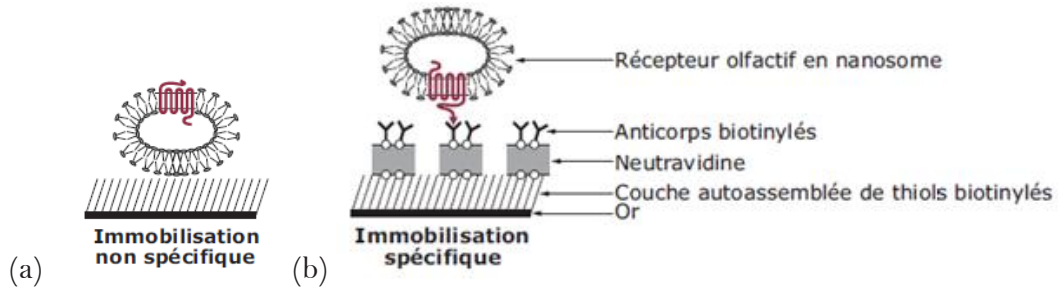


Figure 1.30 - Immobilisation de nanosomes contenant des membranes d'OR sur une surface en or fonctionnalisés par des couches auto-assemblées: adsorption non spécifique de l'OR (a) et encrage de l'OR via un anticorps biotinylé spécifique (b) [211]

D'autres cas de capteurs olfactifs utilisant les OR existent, tels que les OR de rat, exprimés dans des cellules embryonnaires rénales, intégrés dans un dispositif piézoélectrique pour une détection de plusieurs odorants (hexanal, heptanal, octanal, nonanal, décanal) [196]. La concentration des odorants a été variée pour comparaison avec d'autres OR et ce travail a conclu à une limite de détection (LOD) de l'ordre du micromolaire (mM) pour les principaux composés à détecter. L'octonal est le seul composé à avoir une LOD très faible de l'ordre du 10^{-8} mM.

Dans un autre cas d'exemple, des OR provenant de la grenouille taureau ont été déposés sur une électrode piézoélectrique pour permettre une détection de composés alcool et d'acide carboxylique [212]. Les résultats ont montré que la réponse des capteurs en présence de composés à détecter était rapide, sensible et réversible. En effet, la cinétique de désorption des odorants a aussi été jugée rapide. Une réponse du capteur ainsi formé a été signalée uniquement en présence de la forme active de l'OR.

Il existe, comme on a pu le souligner dans cette section, différentes techniques pour immobiliser OBP, OR ou MUP sur des surfaces de transducteurs. Il n'existe à ce jour aucun travail relatant l'immobilisation de LBP sur des transducteurs en diamant.

Nous avons vu dans cette section les différentes propriétés des OBP, des MUP et des OR et leur faculté à lier les molécules odorantes. Plusieurs transducteurs à base de ces protéines ont été réalisés pour mimer le système olfactif et obtenir un biocapteur olfactif.

Bien que diverses voies de transduction aient été empruntées pour l'élaboration de ces biocapteurs, c'est la première fois, à notre connaissance, que des capteurs de type MEMS en diamant sont utilisés en combinaison avec les OBP, MUP ou OR et plus particulièrement pour la détection de molécules odorantes explosives.

1.6 Conclusion

Nous avons évoqué, tout d'abord, dans ce premier chapitre, les différents types de transducteurs existants en nous attardant plus longuement sur les MEMS en diamant. Nous avons pu nous apercevoir que ces capteurs présentaient de nombreux avantages pour des applications de transduction biochimique et que grâce aux exceptionnelles propriétés physiques et chimiques du diamant, ils se présentaient comme des capteurs potentiellement innovants, plus robustes, plus sensibles et plus rapides que d'autres transducteurs. La chimie unique du diamant permet ainsi d'immobiliser des biorécepteurs à sa surface pour une détection de molécules odorantes. En dehors des travaux de notre équipe, l'immobilisation des LBP de type OBP, OR et MUP sur transducteurs en diamant n'a jamais été exploitée dans la littérature. De plus, nous avons vu dans ce premier chapitre, quelques études sur des LBP immobilisées sur transducteurs; mais peu d'entre elles traitaient de la détection de composés explosifs. Jusqu'à ces travaux, les formidables propriétés du diamant et la technologie des MEMS n'ont jamais étaient associées aux propriétés des protéines LBP pour la réalisation de transducteurs olfactifs pour détecter des composés illicites.

Le chapitre suivant décrit le développement et la caractérisation de ces capteurs MEMS en diamant fonctionnalisés par des LBP.

Bibliographie du chapitre 1

[1] Bizet, K., Gabrielli, C., Perrot, H., & Therasse, J. (1998). Validation of antibody-based recognition by piezoelectric transducers through electroacoustic admittance analysis. Biosensors and Bioelectronics, 13(3-4), 259–269.
[2] Pu, F., Huang, Z., Hu, D., Ren, J., Wang, S., & Qu, X. (2009). Sensitive, selective and label-free protein detection using a smart polymeric transducer and aptamer/ligand system. Chemical Communications (Cambridge, England), (47), 7357–9.
[3] Kronvall, G. (1967). Ligand-binding sites for streptolysin O and staphylococcal protein A on different parts of the same myeloma globulin. Acta pathologica et microbiologica Scandinavica. Vol. :69, 4, 619 - 21
[4] Singh, A., Patra, S., Lee, J.-A., Park, K. H., & Yang, H. (2011). An artificial enzyme-based assay: DNA detection using a peroxidase-like copper-creatinine complex. Biosensors & Bioelectronics, 26(12), 4798–803.
[5] Rao, G., Ph, D., Tolosa, L., & Ph, D. (2007). Comparing the Performance of the Optical Glucose Assay Based on Glucose Binding Protein with High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Electrochemical Detection: Efforts to Design a Low-Cost Point-of-Care Glucose Sensor, 1(6), 864–872.
[6] Dumbrepatil, A. B., Lee, S.-G., Chung, S. J., Lee, M. G., Park, B. C., Kim, T. J., & Woo, E.-J. (2010). Development of a nanoparticle-based FRET sensor for ultrasensitive detection of phytoestrogen compounds. The Analyst, 135(11), 2879–86.
[7] Nakamura, C., Inuyama, Y., Shirai, K., Sugimoto, N., & Miyake, J. (2001). Detection of porphyrin using a short peptide immobilized on a surface plasmon resonance sensor chip. Biosensors and Bioelectronics, 16(9-12), 1095–1100.
[8] Medintz, I. L. (2006). Recent progress in developing FRET-based intracellular sensors for the detection of small molecule nutrients and ligands. Trends in Biotechnology, 24(12), 539–42.
[9] Janata. J. (2009). Principles of Chemical Sensors. Springer, Verlag New York Inc, second edited.
[10] T. Srivastava, R. Das, and R. Jha, (2011). Highly accurate and sensitive surface plasmon resonance sensor based on channel photonic crystal waveguides, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 157, pp. 246–252.
[11] S. Srivastava, R. Verma, and B. Gupta, (2011), Surface plasmon resonance based fiber optic sensor for the detection of low water content in ethanol, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 153, pp. 194–198.
[12] J. Homola, S. Sinclair, and G. Gauglitz. (1999). Surface plasmon resonance sensors : review, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 54, pp. 3–15.
[13] A. Qureshi, W. Kang, J. Davidson, and Y. Gurbuz. (2009). Review on carbonderived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications, Diamond and Related Materials, vol. 18, pp. 1401–1420.
[14] J. Wang. (2002). Electrochemical detection for microscale analytical systems : a review, Talanta, vol. 56, pp. 223–31.
[15] R. Kiran, E. Scorsone, J. de Sanoit, J. Arnault, P. Mailley, and P. Bergonzo, (2012). Boron Doped Diamond Electrodes for Direct Measurement in Biological Fluids : An In Situ Regeneration Approach, Journal of the Electrochemical Society, vol. 160, pp. H67–H73.
[16] G. Lehoucq, P. Bondavalli, S. Xavier, P. Legagneux, P. Abbyad, C. Baroud, and D. Pribat. (2012). Highly sensitive pH measurements using a transistor composed of a large array of parallel silicon nanowires, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 171- 172, pp. 127–134.
[17] P. Bondavalli, L. Gorintin, P. Legagneux, and D. Pribat. (2009). Test and Modeling of the Electronic Behavior of Carbon Nanotubes High Performances Transistors obtained using Air-Brush Deposition Technique, Procedia Chemistry, vol. 1, pp. 1155–1158.
[18] P. Ménini, F. Parret, M. Guerrero, K. Soulantica, L. Erades, a. Maisonnat, and B. Chaudret. (2004). CO response of a nanostructured SnO2 gas sensor doped with palladium and platinum, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 103, pp. 111–114.

[19] X. Du, Z. Wang, J. Huang, S. Tao, X. Tang, and Y. Jiang. (2009). A new polysiloxane coating on QCM sensor for DMMP vapor detection, Journal of Materials Science, vol. 44, pp. 5872–5876.
[20] R. Ruby. (2007). Review and Comparison of Bulk Acoustic Wave FBAR, SMR Technology, in IEEE Ultrasonics Symposium, pp. 1029–1040.
[21] S. Fanget, S. Hentz, P. Puget, J. Arcamone, M. Matheron, E. Colinet, P. Andreucci, L. Duraffourg, E. Meyers, and M. Roukes. (2011). Gas sensors based on gravimetric detection - A Review, Sensors and Actuators B : Chemical.
[22] A. Korsunsky, S. Cherian, R. Raiteri, and R. Berger. (2007). On the micromechanics of micro-cantilever sensors : Property analysis and eigenstrain modeling, Sensors and Actuators A : Physical, vol. 139, pp. 70–77.
[23] H.-J. Butt. (1996). A Sensitive Method to Measure Changes in the Surface Stress of Solids, Journal of Colloid and Interface Science, vol. 180, pp. 251–260.
[24] B. Johnson and R. Mutharasan. (2012). Biosensing using dynamic-mode cantilever sensors : a review, Biosensors and Bioelectronics, vol. 32, pp. 1–18.
[25] P. Dasgupta, Z. Genfa, S. Poruthoor, S. Caldwell, and S. Dong. (2000). High-Sensitivity Gas Sensors Based on Gas-Permeable Liquid Core Waveguides and Long-Path Absorbance Detection," Analytical chemistry, vol. 70, no. 22, pp. 4661–4669.
[26] Y. Zhu, J. Shi, Z. Zhang, C. Zhang, and X. Zhang. (2002). Development of a gas sensor utilizing chemiluminescence on nanosized titanium dioxide.," Analytical chemistry, vol. 74, pp. 120–4.
[27] J. Demas, B. Deora, and W. Xut. (1995). Modeling of Luminescence Quenching-Based Sensors : Comparison of Multisite and Nonlinear Gas Solubility Models," Analytical chemistry, vol. 67, pp. 1377–1380.
[28] J. L. Gehrich, D. W. Lübbers, N. Opitz, D. R. Hansmann, W. W. Miller, J. K. Tusa, and M. Yafuso. (1986). Optical fluorescence and its application to an intravascular blood gas monitoring system.," IEEE transactions on bio-medical engineering, vol. 33, pp. 117–32.
[29] J. Homola, S. Sinclair, and G. Gauglitz. (1999). Surface plasmon resonance sensors : review," Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 54, pp. 3–15.
[30] R. Bharadwaj, V.V.R. Sai, K. Thakare, A. Dhawangale, T. Kundu, S. Titus, P.K. Verma, S. Mukherji. (2011). Evanescent wave absorbance based fiber optic biosensor for label-free detection of E. coli at 280 nm wavelength. Biosensors and Bioelectronics 26 3367-3370.
[31] A. Mukherjee, I. Dunayevskiy, M. Prasanna, R. Go, A. Tsekoun, X. Wang, J. Fan, and C. K. N. Patel, (2008).Sub-parts-per-billion level detection of dimethyl methyl phosphonate (DMMP).by quantum cascade laser Photoacoustic spectroscopy.," Applied optics, vol. 47, pp. 1543–8.
[32] J. Abdullah, M. Ahmad, L. Heng, N. Karuppiah, H. Sidek (2007), An Optical Biosensor based on Immobilization of Laccase and MBTH in Stacked Films for the Detection of Catechol. Sensors 7 (2238-2250).
[33] Weiss (1999), S. Science, 283, 1676-1683.
[34] Prendergast FG, Mann KG; Mann (1978). "Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from Aequorea forskålea". Biochemistry 17 (17): 3448–53.
[35] Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ; Cubitt; Kallio; Gross; Tsien; Remington (1996). "Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein". Science 273 (5280): 1392–5.
[36] Laurent, S. (2012). Détections d'interactions biologiques par imagerie de résonance plasmonique de surface : Applications au criblage pharmaceutique de chimiotèques & à la détection de toxines.
[37] Jang, H. S., Park, K. N., Kang, C. D., Kim, J. P., Sim, S. J., & Lee, K. S. (2009). Optical fiber SPR biosensor with sandwich assay for the detection of prostate specific antigen. Optics Communications, July 2005282(14), 2827–2830.
[38] A. Qureshi, W. Kang, J. Davidson, and Y. Gurbuz, (2009): Review on carbonderived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications," Diamond and Related Materials, vol. 18, pp. 1401–1420.
[39] B. Chachulski and J. Gebicki, (2006).Influence of aprotic solvent on a signal of an amperometric sensor with Nafion membrane," Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 119, pp. 435–440.
[40] X. Lu, S.Wu, L.Wang, and Z. Su, (2005).Solid-state amperometric hydrogen sensor based on polymer electrolyte membrane fuel cell," Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 107, pp. 812–817.

[41] P. Schmidt-Zhang, W. Zhang, F. Gerlach, K. Ahlborn, and U. Guth, (2005).Electrochemical investigations on multi-metallic electrodes for amperometric NO gas sensors, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 108, pp. 797–802.
[42] A. Lund, T. Jacobsen, K. Hansen, and M. Mogensen, (2011).Limitations of potentiometric oxygen sensors operating at low oxygen levels, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 160, pp. 1159–1167.
[43] E. Macam, B. Blackburn, and E. Wachsman,(2011).Effect of La2CuO4 electrode area on potentiometric NOx sensor response and its implications on sensing mechanism, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 158, pp. 304–312.
[44] J. Wang, H. Zhao, L. Du, H. Cai, and P. Wang, (2013).An enzyme-metal-insulator-silicon structured sensor using surface photovoltage technology for potentiometric glucose detection, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 187, pp. 147–152.
[45] Elshafey, R., Tavares, A. C., Siaj, M., & Zourob, M. (2013). Electrochemical impedance immunosensor based on gold nanoparticles-protein G for the detection of cancer marker epidermal growth factor receptor in human plasma and brain tissue. Biosensors & Bioelectronics, 50, 143–9.
[46] G. Cote, (2003).Emerging biomedical sensing technologies and their applications, IEEE sensors, vol. 3, no. 3, p. 251.
[47] J. Mo and W. Smart, (2004).Lactate biosensors for continuous monitoring, Front Bioscience, vol. 1, no. 9, pp. 3384–91.
[48] J. Wang, (2002).Electrochemical detection for microscale analytical systems : a review, Talanta, vol. 56, pp. 223–31.
[49] De Sanoit, J., Vanhove, E., Mailley, P., & Bergonzo, P. (2009). Electrochemical diamond sensors for TNT detection in water. Electrochimica Acta, 54(24), 5688–5693.
[50] Ghasemi-Varnamkhasti, M., Mohtasebi, S. S., Siadat, M., & Balasubramanian, S. (2009). Meat quality assessment by electronic nose (machine olfaction technology). Sensors (Basel, Switzerland), 9(8), 6058–83.
[51] L. Rodriguez-Pardo, J. Farina, C. Gabrielli, H. Perrot, and R. Brendel, (2007).Simulation of QCM sensors based on high stability classical oscillator configurations in damping media, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 123, pp. 560–567,
[52] Lu, C.-S. (1972). Investigation of film-thickness determination by oscillating quartz resonators with large mass load. Journal of Applied Physics, 43(11), 4385.
[53] W.H. King, Jr. (1964). Piezoelectric sorption detector. Analytical Chemistry 36 (9): 1735–1739.
[54] R. Ruby, (2007).Review and Comparison of Bulk Acoustic Wave FBAR, SMR Technology, in IEEE Ultrasonics Symposium, pp. 1029–1040.
[55] Rodriguez-Pardo, L. Rodriguez, J. F. Gabrielli, C. Perrot, H.; Brendel, R. (2005).IEEE Sensors Journal, 5, 1251-1257
[56] Eickes, C., Rosenmund, J., Wasle, S., Doblhofer, K., Wang, K., & Weil, K. (2000). The electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM).in the studies of complex electrochemical reactions. Electrochimica Acta, 45(22-23), 3623–3628.
[57] Szunerits, S., Niedzio, J., Boukherroub, R., Woisel, P., & Siriwardena, A. (2010). Label-Free Detection of Lectins on Surfaces, 82(19), 8203–8210.
[58] X. Du, Z. Wang, J. Huang, S. Tao, X. Tang, and Y. Jiang, (2009).A new polysiloxane coating on QCM sensor for DMMP vapor detection, Journal of Materials Science, vol. 44, pp. 5872–5876.
[59] X. Ji, W. Yao, J. Peng, N. Ren, J. Zhou, and Y. Huang, (2012).Evaluation of Cu-ZSM-5 zeolites as QCM sensor coatings for DMMP detection, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 166-167, pp. 50–55.
[60] Z. Ying, Y. Jiang, X. Du, G. Xie, J. Yu, and H. Wang, PVDF coated quartz crystal microbalance sensor for DMMP vapor detection, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 125, pp. 167–172.
[61] R. Ruby, (2007)Review and Comparison of Bulk Acoustic Wave FBAR, SMR Technology, in IEEE Ultrasonics Symposium, pp. 1029–1040.
[62] D. Ballantine, R. White, S. Martin, J. Ricco, E. Zellers, G. Frye, and H. Wohltjen, (1997).Acoustic wave sensors Theory, Design, and Physico-Chemical Applications. Academic Press.
[63] Morgan, D. P. (1973). Surface acoustic vwave devices and applications, 121–131.
[64] B. Tard. (2013).Etudes des interactions gaz-surfaces diamant par gravimétrie sur résonateur à onde acoustique. Thèse. Université Pierre et Marie Curie.

[65] J. Grate, (2008).Hydrogen-bond acidic polymers for chemical vapor sensing., Chemical reviews, vol. 108, pp. 726–45.
[66] C. Lim, W. Wang, S. Yang, and K. Lee, (2011).Development of SAW-based multi-gas sensor for simultaneous detection of CO2 and NO2, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 154, pp. 9–16.
[67] K. Länge, B. Rapp, and M. Rapp, (2008).Surface acoustic wave biosensors : a review, Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 391, no. 5, pp. 1509–1519.
[68] D. S. Moore, (2004).Instrumentation for trace detection of high explosives, Review of Scientific Instruments, vol. 75, no. 8, p. 2499.
[69] G. Tortissier, L. Blanc, a. Tetelin, J.-L. Lachaud, M. Benoit, V. Conédéra, C. Dejous, and D. Rebière, (2011).Langasite based surface acoustic wave sensors for high temperature chemical detection in harsh environment : Design of the transducers and packaging, Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 156, pp. 510–516.
[70] H. C. Nathanson, W. E. Newell, R. A. Wickstrom, J. R. Davis, (1967).The Resonant Gate Transistor, IEEE transactions on electron devices, vol. ED-14, no. 3.
[71] Lavrik, N. V., Sepaniak, M. J., & Datskos, P. G. (2004). Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors. Review of Scientific Instruments, 75(7), 2229.
[72] Waggoner, P. S.; Craighead, H. G. Lab on a chip 2007, 7, 1238-55
[73] Eom, K. Kwon, T. Yoon, D. Lee, H.; Kim, T. Physical Review B 2007, 76, 1-4.
[74] Stoney, G. G. (1909).Proceedings of the Royal Society of London Series a- Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 82, 172-175.
[75] Godin,M.; Tabard-Cossa, V.;Miyahara, Y.;Monga, T.;Williams, P. J.; Beaulieu, L. Y.; Bruce Lennox, R.; Grutter, P. (2010).Nanotechnology , 21, 75501.
[76] Hwang, K.; Jeon, H.; Kim, S.; et al. (2009).Prostate Cancer Antigen Detection Using Miniaturized Microcantilever System Clinical Chemistry [0009-9147] Vol. :55 iss :6 pg :A43 -A43.
[77] Gupta, A; Akin, D.; Bashir, R. (1976).Applied Physics Letters 2004, 84.
[78] Johnson, L. Gupta, A. K. Ghafoor, A. Akin, D.; Bashir, R. (2006).Sensors and Actuators B: Chemical, 115, 189-197.
[79] Mertens, J. Rogero, C. Calleja, M. Ramos, D. Martín-Gago, J. A. Briones, C.; Tamayo, J. (2008).Nature nanotechnology, 3, 301-7.
[80] Yang, S. M. Chang, C. Yin, T. I.; Kuo, P. L. (2008).Sensors and Actuators B: Chemical, 130, 674-681.
[81] Campbell, G. a; Uknalis, J. Tu, S.-I.; Mutharasan, R. (2007).Biosensors & bioelectronics, 22, 1296-302.
[82] Urbiztondo, M. a; Pellejero, I. Villarroya, M. Sesé, J. Pina, M. P. Dufour, I.; Santamaría, J. (2009).Sensors and Actuators B: Chemical, 137, 608-616.
[83] Kooser, A Gunter, R. L. Delinger, W. D. Porter, T. L.; Eastman, M. P. (2004).Sensors and Actuators B: Chemical, 99, 474-479.
[84] Zia, A. I., Syaifudin, a R. M., Mukhopadhyay, S. C., Yu, P. L., Al-Bahadly, I. H., Gooneratne, C. P., Liao, T.-S. (2013). Electrochemical impedance spectroscopy based MEMS sensors for phthalates detection in water and juices. Journal of Physics: Conference Series, 439, 012026.
[85] Timurdogan, E., Alaca, B. E., Kavakli, I. H., & Urey, H. (2011). MEMS biosensor for detection of Hepatitis A and C viruses in serum. Biosensors & Bioelectronics, 28(1), 189–94.
[86] Huang, X., Li, S., Davis, E., Leduc, C., Ravussin, Y., Cai, H., Lin, Q. (2013). A MEMS differential viscometric sensor for affinity glucose detection in continuous glucose monitoring. Journal of Micromechanics and Microengineering : Structures, Devices, and Systems, 23(5), 55020.
[87] Zhang, J., Lang, H. P., Battiston, F., Backmann, N., Huber, F., & Gerber, C. (2013). Development of robust and standardized cantilever sensors based on biotin/NeutrAvidin coupling for antibody detection. Sensors (Basel, Switzerland), 13(4), 5273–85.
[88] Oliviero, G., Chiari, M., De Lorenzi, E., Colombo, R., Cretich, M., Damin, F., Bergese, P. (2013). Leveraging on nanomechanical sensors to single out active small ligands for β2-microglobulin. Sensors and Actuators B: Chemical, 176, 1026–1031.
[89] A. Kraft, G. Gmbh, and K. Str, (2007).Doped Diamond : A Compact Review on a New, Versatile Electrode Material, International Journal of Electrochemistry Science, vol. 2, pp. 355–385.
[90] B. Caylar, M. Pomorski, and P. Bergonzo, (2013).Laser-processed three dimensional graphitic electrodes for diamond radiation detectors, Applied Physics Letters, vol. 103,
no. 4, p. 04350.

[91] A. Kriele, O. a. Williams, M. Wolfer, D. Brink, W. Muller-Sebert, and C. Nebel,(2009).Tuneable optical lenses from diamond thin films, Applied Physics Letters, vol. 95, no. 3, p. 031905.
[92] M. Lions, (2011).Synthèse et caractérisation de films ultraminces de diamant polycristallin pour les applications Silicon-On-Diamond. PhD thesis, UPMC Paris VI,.
[93] A. Bongrain, C. Agnès, L. Rousseau, E. Scorsone, J. Arnault, S. Ruffinatto, F. Omnès, P. Mailley, G. Lissorgues, and P. Bergonzo, (Oct. 2011).High sensitivity of diamond resonant microcantilevers for direct detection in liquids as probed by molecular electrostatic surface interactions., Langmuir, vol. 27, pp. 12226–34.
[94] O. Shenderova, V. Zhirnov, and D. Brenner, Carbon Nanostructures, (2006). Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences, vol. 27, pp. 227–356.
[95] H. Girard, E. Scorsone, S. Saada, C. Gesset, J. Arnault, S. Perruchas, L. Rousseau, S. David, V. Pichot, D. Spitzer, and P. Bergonzo, (2012).Electrostatic grafting of diamond nanoparticles towards 3D diamond nanostructures, Diamond and Related Materials, vol. 23, pp. 83–87.
[96] Aleksov, A Diamond and Related Materials 2004, 13, 233-240.
[97] Lions, M. Saada, S. Mazelier, J.-P. Andrieu, F. Faynot, O.; Bergonzo, P. (2009).2009 Physica Status Solidis, 3, 205-207.
[98] Kriele, A. Williams, O. a; Wolfer, M. Brink, D. Müller-Sebert, W.; Nebel, C.E. (2009).Applied Physics Letters, 95, 031905.
[99] S. Sahli, (1997).Electronic Characterization and Fabrication of CVD DiamondPiezoresistive Pressure Sensors, Thèse, Michigan State University.
[100] Williams, O. A. Diamond & Related Materials 2011, 20, 621-640.
[101] Djemia, P. Dugautier, C. Chauveau, T. Dogheche, E. De Barros, M. I.;Vandenbulcke, L. (2001). Journal of Applied Physics, 90, 3771.
[102] P. Bergonzo, R. Jackmann, C. Nebel, and J. Ristein, (2003).Thin Film Diamond. Academic Press.
[103] Bongrain. A. (2011). Nouvelles technologies de capteurs MEMS en diamant pour applications de transduction. Thèse. Université Paris Est.
[104] Bouvier, P. Delabouglise, D. Denoyelle, a; Marcus, B. Mermoux, M.; Petit, J.-P. (2005). Electrochemical and Solid-State Letters, 8, E57.
[105] Szunerits, S.; Boukherroub, R. (2007).Journal of Solid State Electrochemistry, 12, 1205-1218.
[106] Marcon, L., Wang, M., Coffinier, Y., Le Normand, F., Melnyk, O., Boukherroub, R., & Szunerits, S. (2010). Photochemical immobilization of proteins and peptides on benzophenone-terminated boron-doped diamond surfaces. Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids, 26(2), 1075–80.
[107] Girard, H. a, Petit, T., Perruchas, S., Gacoin, T., Gesset, C., Arnault, J. C., & Bergonzo, P. (2011). Surface properties of hydrogenated nanodiamonds: a chemical investigation. Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP, 13(24), 11517–23.
[108] E. Vanhove, J. de Sanoit, J. Arnault, S. Saada, C. Mer, P. Mailley, P. Bergonzo,
and M. Nesladek, (2007).Stability of H-terminated BDD electrodes : an insight into the influence of the surface preparation, Physica Status Solidi (a), vol. 204, pp. 2931– 2939.
[109] T. Ando, M. Nishitani-Gamo, R. Rawles, K. Yamamoto, M. Kamo, and Y. Sato, (1996). Chemical modification of diamond surfaces using a chlorinated surface as an intermediate state, Diamond and Related Materials, vol. 5, pp. 1136–1142.
[110] D. Delabouglise, B. Marcus, M. Mermoux, P. Bouvier, J. Chane-Tune, J.-P. Petit, P. Mailley, and T. Livache, (2003).Biotin grafting on boron-doped diamond., Chemical communications, vol. 1, pp. 2698–9.
[111] S. Szunerits, N. Shirahata, P. Actis, J. Nakanishi, and R. Boukherroub, (2007).Photografting and patterning of oligonucleotides on benzophenone-modified boron-doped diamond., Chemical communications, pp. 2793–5.
[112] Arnault, J.-C., Petit, T., Girard, H., Chavanne, A., Gesset, C., Sennour, M., & Chaigneau, M. (2011). Surface chemical modifications and surface reactivity of nanodiamonds hydrogenated by CVD plasma. Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP, 13(24), 11481–7.
[113] Uetsuka, H. Shin, D. Tokuda, N. Saeki, K.; Nebel, C. E. Langmuir (2007): the ACS journal of surfaces and colloids, 23, 3466-72.
[114] Nebel, C. E. Rezek, B. Shin, D. Uetsuka, H.; Yang, N. (2007).Journal of Physics: Applied Physics, 40, 6443-6466.
[115] Wang, J. Carlisle, J. A. Shin. (2006).Diamond and Related Materials, 15, 279-284.

[116] Agnès, C., Ruffinatto, S., Delbarre, E., Roget, A., Arnault, J.-C., Omnès, F., & Mailley, P. (2010). New one step functionalization of polycrystalline diamond films using amine derivatives. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 16, 012001.
[117] P. Mailley, C. Agnes, F. Omnes, S. Ruffinatto, (2009).: Brevet PCT, Fonctionnalisation de surfaces à base de carbone, de silicium et/ou de Germanium hybridées sp3. FR 2947544.
[118] Lee, J., & Park, S.-M. (2005). Direct electrochemical assay of glucose using boron-doped diamond electrodes. Analytica Chimica Acta, 545(1), 27–32.
[119] Szunerits, S., Niedzio, J., Boukherroub, R., Woisel, P., & Siriwardena, A. (2010). Label-Free Detection of Lectins on Surfaces, 82(19), 8203–8210.
[120] Weng, J., Zhang, J., Li, H., Sun, L., Lin, C., & Zhang, Q. (2008). Label-free DNA sensor by boron-doped diamond electrode using an ac impedimetric approach. Analytical Chemistry, 80(18), 7075–83.
[121] Kiran, R., Scorsone, E., Mailley, P., & Bergonzo, P. (2012). Quasi-Real Time Quantification of Uric Acid in Urine Using Boron Doped Diamond Microelectrode with in Situ Cleaning.
[122] T. Takada, T. Fukunaga, K. Hayashi, Y. Yokota, T. Tachibana, K. Miyata, and K. Kobashi, (2000). Boron-doped diamond thin film sensor for detection of various semiconductor manufacturing gases, Sensors and Actuators A : Physical, vol. 82, pp. 97–101.
[123] C. Blin et al, (2013). Optical Analysis of p-Type Surface Conductivity in Diamond with Slotted Photonic Crystals. Advanced Optical Materials, 1,12, 963 -970
[124] Bongrain, a., Uetsuka, H., Rousseau, L., Valbin, L., Saada, S., Gesset, C., P, Bergonzo, P. (2010). Measurement of DNA denaturation on B-NCD coated diamond micro-cantilevers. Physica Status Solidi (a), 207(9), 2078–2083.
[125] Tard, B., Trouvé, A., Scorsone, E., Voigt, A., Rapp, M., & Bergonzo, P. (2012). Warfare Gas Detection at Trace Level Using a Multiple SAW Sensor Approach Based on Functionalized Nanodiamond Coatings, 481–484.
[126] Bongrain, A., Scorsone, E., Rousseau, L., Lissorgues, G., & Bergonzo, P. (2011). Realisation and characterisation of mass-based diamond micro-transducers working in dynamic mode. Sensors and Actuators B: Chemical, 154(2), 142–149.
[127] Ikehara, T., Lu, J., Konno, M., Maeda, R., & Mihara, T. (2007). A high quality-factor silicon cantilever for a low detection-limit resonant mass sensor operated in air. Journal of Micromechanics and Microengineering, 17(12), 2491–2494.
[128] Naeli, K., & Brand, O. (2009). Dimensional considerations in achieving large quality factors for resonant silicon cantilevers in air. Journal of Applied Physics, 105(1), 014908.
[129] Takahashi, H. Ono, T. Onoe, A.; Cho, Y. (2006). 1620, 1-6.
[130] Wang, J. Butler, J. E. Hsu, D. S. Y.; Nguyen, C. T. (2002).Solid-State Sensors, Actuator and Microsystems Workshop, 61-62.
[131] Ahmad, R. K., Parada, A. C., Hudziak, S., Chaudhary, A., & Jackman, R. B. (2010). Nanodiamond-coated silicon cantilever array for chemical sensing. Applied Physics Letters, 97(9), 093103.
[132] Chevallier, E., Scorsone, E., Girard, H. a., Pichot, V., Spitzer, D., & Bergonzo, P. (2010). Metalloporphyrin-functionalised diamond nano-particles as sensitive layer for nitroaromatic vapours detection at room-temperature. Sensors and Actuators B: Chemical, 151(1), 191–197.
[133] Pelosi, P. (2001). Cellular and Molecular Life Sciences The role of perireceptor events in vertebrate olfaction, 58, 503–509.
[134] U. J. Meierhenrich, J. Golebiowski, X.Fernandezet D.Cabrol-Bass. (2005). L'actualité chimique: De la molécule à l'odeur : Les bases moléculaires des premières étapes de l'olfaction- n° 289
[135] Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. (2014). "Press Release: The 2004 Nobel Prize in Physiology or Medicine to Richard Axel and Linda B. Buck".
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2004/press.html
[136] Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., Cambillau, C. (2000). Mammalian odorant binding proteins. Biochimica et Biophysica Acta, 1482(1-2), 229–40.
[137] Pevsner, J., Sklar, P. B., & Snyder, S. H. (1986). Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83(13), 4942–6.
[138] De Bruyne, M., & Baker, T. C. (2008). Odor detection in insects: volatile codes. Journal of Chemical Ecology, 34(7), 882–97.

[139] FLOWER D. R. (1996).The lipocalin protein family: structure and function, Biochem. J. 318, 1–14.
[140] Pelosi, P., Pisanelli, A. M., Agrarie, I., Baldaccini, N. E., Gagliardo, A., Generate, B., & Pisa, U. (1981). Binding of [3H]2-isobutyl-S-methoxypyrazine to cow olfactory mucosa, 6(2), 77–85.
[141] Tegoni, M., Campanacci, V., & Cambillau, C. (2004). Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. Trends in Biochemical Sciences, 29(5), 257–64.
[142]Lopez-Larrea C., (2012), Sensing in nature, Advances in experimental medicine and biology, 739.
[143] Bignetti, E., Cavaggioni, A., Pelosi, P., Persaud, K. C., Sorbi, R. T., & Tirindelli, R. (1985). Purification and characterisation of an odorant-binding protein from cow nasal tissue. European Journal of Biochemistry, 149(2), 227–231.
[144] Pelosi, P. (2001). Cellular and Molecular Life Sciences The role of perireceptor events in vertebrate olfaction, 58, 503–509.
[145] Spinelli, S., Ramoni, R., Grolli, S., Bonicel, J., Cambillau, C., Tegoni, M., Taglio, V. (1998). The Structure of the Monomeric Porcine Odorant Binding Protein Sheds Light on the Domain Swapping Mechanism, 2960(98), 7913–7918.
[146] Dal Monte, M., Andreini, I., Revoltella, R., & Pelosi, P. (1991). Purification and characterization of two odorant-binding proteins from nasal tissue of rabbit and pig. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 99(2), 445–451.
[147] Pes, D., & Pelosi, P. (1995). Odorant-binding proteins of the mouse. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 112(3), 471–9.
[148] Nespoulous, C. (2004). Odorant Binding and Conformational Changes of a Rat Odorant-binding Protein. Chemical Senses, 29(3), 189–198.
[149] Wetzel, C.H., Oles, M.,Wellerdieck, C., Kuczkowiak, M., Gisselmann, G. and Hatt, H. (1999).Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and Xenopus laevis oocytes. J. Neurosci., 19, 7426–7433
[150] Lazar, J.; Greenwood, D.R.; Rasmussen, L.E.L. & Prestwich, G.D. (2002). Molecular and functional characterization of an odorant binding protein of the asian elephant, elephas maximus: implications for the role of lipocalins in mammalian olfaction. Biochemistry, (October 2002), Vol.41, No.39, pp. 11786-11794.
[151] Briand, L. Eloit, C., Nespoulous, C., Bezirard, V., Huet, J-C., Henry, C., Blon, F., Trotier, D., and Pernollet, J-C. (2002). Evidence of an Odorant-Binding Protein in the Human Olfactory Mucus : Location Structural Characterization, and Odorant-Binding Properties, Biochemistry, 41, 7241–7252.
[152] Vincent, F., Ramoni, R., Spinelli, S., Grolli, S., Tegoni, M., & Cambillau, C. (2004). Crystal structures of bovine odorant-binding protein in complex with odorant molecules. European Journal of Biochemistry 271(19), 3832–42.
[153] Dani, F. R., Michelucci, E., Francese, S., Mastrobuoni, G., Cappellozza, S., La Marca, G., Pelosi, P. (2011). Odorant-binding proteins and chemosensory proteins in pheromone detection and release in the silkmoth Bombyx mori. Chemical Senses, 36(4), 335–44.
[154] Pelosi, P., Mastrogiacomo, R., Iovinella, I., Tuccori, E., & Persaud, K. C. (2014). Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins. Applied Microbiology and Biotechnology, 98(1), 61–70.
[155] Bianchet MA, Bains G, Pelosi P, Pevsner J, Snyder SH, Monaco HL, Amzel LM (1996).The three dimensional structure of bovine odorant-binding protein and its mechanism of odor recognition. Nat Struct Biol 3:934–939.
[156] Vincent F, Spinelli S, Ramoni R, Grolli S, Pelosi P, Cambillau C, Tegoni M. (2000).Complexes of porcine odorant binding protein with odor- ant molecules belonging to different chemical classes. J Mol Biol 300:127–139.
[157] HorstR,Damberger F, Luginbuhl P,Guntert P, Peng G, Nikonova L, Leal WS, Wuthrich K (2001).NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release. Proc Natl Acad Sci U S A 98:14374–14379.
[158] Pevsner, J., Hou, V., Snowman, A. M., Snowman, M., & Snyder, H. (1990). Odorant-binding Protein characterization of ligand binding. The Journal of Biological hemistry, Vol. 265, No. 11, Issue of April 15, pp. 6118-6125.
[159] Pelosi, P., Pisanelli, A. M., Agrarie, I., Baldaccini, N. E., Gagliardo, A., Generate, B., & Pisa, U. (1981). Binding of H^3-l-isobutyl-S-methoxypyrazine to cow olfactory mucosa, 6(2), 77–85.

[160] Vincent F, Spinelli S, Ramoni R, Grolli S, Pelosi P, Cambillau C, Tegoni M(2000).Complexes of porcine odorant binding protein with odor- ant molecules belonging to different chemical classes. J Mol Biol 300:127–139.
[161] Pevsner, J., Trifiletti, R. R., Strittmatter, S. M., & Snyder, S. H. (1985). Isolation and characterization of an olfactory receptor protein for odorant pyrazines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82(9), 3050–4.
[162] Matarazzo, V., Zsürger, N., Guillemot, J.-C., Clot-Faybesse, O., Botto, J.-M., Dal Farra, C., Ronin, C. (2002). Porcine odorant-binding protein selectively binds to a human olfactory receptor. Chemical Senses, 27(8), 691–701.
[163] Vidic, J., Grosclaude, J., Monnerie, R., Persuy, M.-A., Badonnel, K., Baly, C., Pajot-Augy, E. (2008). On a chip demonstration of a functional role for Odorant Binding Protein in the preservation of olfactory receptor activity at high odorant concentration. Lab on a Chip, 8(5), 678–88.
[164] Loïc Briand, Encyclopedia of Neuroscience (2009), pp 2953-2957, Odorant-Binding Proteins, Marc D.Binder, Nobutaka Hirokawa, Uwe Windhorst.
[165] Picimbon J-F. (2002). Les péri-récepteurs chimiosensoriels des insectes. Médecine/Sciences, 18 : 1089-94.
[166] Sankaran, S., Khot, L. R., & Panigrahi, S. (2012). Biology and applications of olfactory sensing system: A review. Sensors and Actuators B: Chemical, 171-172, 1–17.
[167] Hajjar, E., Perahia, D., Débat, H., Nespoulous, C., & Robert, C. H. (2006). Odorant binding and conformational dynamics in the odorant-binding protein. The Journal of Biological Chemistry, 281(40), 29929–37.
[168] Manoharan, M., Fuchs, P. F. J., Sowdhamini, R., & Offmann, B. (2013). Insights on pH-dependent conformational changes of mosquito odorant binding proteins by molecular dynamics simulations. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 37–41.
[169] Salesse, R, R. Gervais, (2013).Odorat et goût, De la neurobiologie des sens chimiques aux applications. Chapitre 7 Périréception et protéines porteuses, Martine Maïbèche, Jean-Marie Heydel, Anne-Marie Le Bon, Jérôme Golebiowski et Loïc Briand.
[170] Cavaggioni A, Findlay JBC, Tirindelli R. (1990). Ligand binding characteristics of homologous rat and mouse urinary proteins and pyrazine binding protein of the calf. Comp Biochem Physiol. 96B:513–520.
[171] Novotny, M. V, & Wiesler, D. (1999). Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse : the volatile ligands associating with the major urinary protein Positive identification of the puberty- accelerating pheromone of the house mouse : the volatile ligands.
[172] Novotny, M. V, Ma, W., Wiesler, D., & Zídek, L. (1999). Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society, 266(1432), 2017–22.
[173] T. Addis, (1932). Proteinuria and cylinduria , Proceedings of the California Academy of Sciences, vol. 2,‚p‚ 38–52.‚‚
[174] Bell ME., (1933). Albuminuria in the normal male rat , Journal of Physiology, vol. 79, no 2,, p. 191–93
[175] IA Parfentjev, WA Perlzweig, (1933). The Composition of the Urine of White Mice , The Journal of Biological Chemistry, vol. 100,‚p‚ 551–55.
[176] JS Finlayson, R Asofsky, M Potter, CC Runner, (1965). Major urinary protein complex of normal mice: origin , Science, vol. 149, no 687,‚p.‚981–‚82.
[177] AK Roy, OW Neuhaus, (1966). Identification of rat urinary proteins by zone and immunoelectrophoresis, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 121, (3),‚‚ 894-99.
[178] M Halpern, A Martínez-Marcos, (2003). Structure and function of the vomeronasal system: an update , Progress in Neurobiology, vol. 70, no 3,‚p.‚245–318.
[179] DE Timm, LJ Baker, H Mueller, L Zidek, MV Novotny, (2001). Structural basis of pheromone binding to mouse major urinary protein (MUP-I)., Protein Science, 10 (5),‚997–‚ 1004
[180] Pertinhez, T. a, Ferrari, E., Casali, E., Patel, J. a, Spisni, A., & Smith, L. J. (2009). The binding cavity of mouse major urinary protein is optimised for a variety of ligand binding modes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 390(4), 1266–71.

[181] SD Armstrong, DH Robertson, SA Cheetham, JL Hurst, RJ Beynon, (2005). Structural and functional differences in isoforms of mouse major urinary proteins: a male-specific protein that preferentially binds a male pheromone. The Biochemical Journal, vol. 391‚ p.‚ 343–50
[182] Brennan, P. a. (2010). On the scent of sexual attraction. BMC Biology, 8, 71.
[183] L Stowers, TF Marton, What is a pheromone Mammalian pheromones reconsidered , Neuron, vol. 46, no 5‚ juin‚ 2005‚ p.‚ 699–702
[184] Buck L, Axel R. (1991).A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell; 65:175-187
[185] http://senselab.med.yale.edu/senselab/ordb
[186] Breer, H. (2003). Olfactory receptors: molecular basis for recognition and discrimination of odors. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 377(3), 427–33.
[187] Ihara, S., Yoshikawa, K., & Touhara, K. (2013). Chemosensory signals and their receptors in the olfactory neural system. Neuroscience, 254, 45–60.
[188] Vaidehi, N., Floriano, W. B., Trabanino, R., Hall, S. E., Freddolino, P., Choi, E. J. Goddard, W. a. (2002). Prediction of structure and function of G protein-coupled receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(20), 12622–7.
[189] Vidic, J., Pla-Roca, M., Grosclaude, J., Persuy, M.-A., Monnerie, R., Caballero, D., Samitier, J. (2007). Gold surface functionalization and patterning for specific immobilization of olfactory receptors carried by nanosomes. Analytical Chemistry, 79(9), 3280–90.
[190] S. Sankaran, S. Panigrahi, S. Mallik, Odorant binding protein based biomimetic sensors for detection of alcohols associated with Salmonella contamination in packaged beef, Biosens. Bioelectron. 26 (2011).3103–3109.
[191] Marrakchi, M., Vidic, J., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., & Pajot-Augy, E. (2007). A new concept of olfactory biosensor based on interdigitated microelectrodes and immobilized yeasts expressing the human receptor OR17-40. European Biophysics Journal : EBJ, 36(8), 1015–8.
[192] Persaud, K. C. (2013). Biomimetic Olfactory Sensors, 12(11), 3108–3112.
[193] Glatz, R., & Bailey-Hill, K. (2011). Mimicking nature's noses: from receptor deorphaning to olfactory biosensing. Progress in Neurobiology, 93(2), 270–96.
[194] Pelosi, P., Mastrogiacomo, R., Iovinella, I., Tuccori, E., & Persaud, K. C. (2014). Structure and biotechnological applications of odorant-binding proteins. Applied Microbiology and Biotechnology, 98(1), 61–70.
[195] Sankaran, S., Khot, L. R., & Panigrahi, S. (2012). Biology and applications of olfactory sensing system: A review. Sensors and Actuators B: Chemical, 171-172, 1–17.
[196] Ko, H. J., & Park, T. H. (2005). Piezoelectric olfactory biosensor: ligand specificity and dose-dependence of an olfactory receptor expressed in a heterologous cell system. Biosensors & Bioelectronics, 20(7), 1327–32.
[197] Zhao, X., Ashley, G. M., Garcia-Gancedo, L., Jin, H., Luo, J., Flewitt, A. J., & Lu, J. R. (2012). Protein functionalized ZnO thin film bulk acoustic resonator as an odorant biosensor. Sensors and Actuators B: Chemical, 163(1), 242–246.
[198] Bonnot, K., Cuesta-Soto, F., Rodrigo, M., Varriale, A., Sanchez, N., D'Auria, S., Lopez-Royo, F. (2014). Biophotonic ring resonator for ultrasensitive detection of DMMP as a simulant for organophosphorus agents. Analytical Chemistry, 86(10), 5125–30.
[199] Goldsmith, B. R., Mitala, J. J., Josue, J., Castro, A., Lerner, M. B., Bayburt, T. H., Johnson, a T. C. (2011). Biomimetic chemical sensors using nanoelectronic readout of olfactory receptor proteins. ACS Nano, 5(7), 5408–16.
[200] Bianchi, F., Basini, G., Grolli, S., Conti, V., Bianchi, F., Grasselli, F., Ramoni, R. (2013). An innovative bovine odorant binding protein-based filtering cartridge for the removal of triazine herbicides from water. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405(2-3), 1067–75.
[201] Stepanenko, O., Fonin, A., Stepanenko, O., Kuznetsova, I., & Turoverov, K. (n.d.). Ligand-Binding Proteins : Structure , Stability and Practical Application.
[202] Wu, C., Du, L., Wang, D., Wang, L., Zhao, L., & Wang, P. (2011). A novel surface acoustic wave-based biosensor for highly sensitive functional assays of olfactory receptors. Biochemical and Biophysical Research Communications, 407(1), 18–22.

[203] De Wolf, F. a, & Brett, G. M. (2000). Ligand-binding proteins: their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands. Pharmacological Reviews, 52(2), 207–36.
[204] Hou, Y., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Zhang, A., Minic-Vidic, J., Gorojankina, T., Errachid, A. (2007). A novel detection strategy for odorant molecules based on controlled bioengineering of rat olfactory receptor I7. Biosensors & Bioelectronics, 22(7), 1550–5.
[205] Panigrahi, S., Sankaran, S., Mallik, S., Gaddam, B., & Hanson, A. a. (2012). Olfactory receptor-based polypeptide sensor for acetic acid VOC detection. Materials Science and Engineering: C, 32(6), 1307–1313.
[206] Pardo, M., Sberveglieri, G., Beccherelli, R., Zampetti, E., Pantalei, S., Bernabei, M., & Persaud, K. C. (2010). Design of a very large chemical sensor system for mimicking biological olfaction. Sensors and Actuators B: Chemical, 146(2), 446–452.
[207] K. C. Persaud, S. M. Ng, C. Mucignat, and P. Pelosi, (2009).Odorant binding proteins and mouse urinary proteins: Potential biomimetic sensing systems, Chem. Senses, vol. 34, no. 3, pp. E36–E37.
[208] Di Pietrantonio, F., Cannatà, D., Benetti, M., Verona, E., Varriale, a, Staiano, M., & D'Auria, S. (2013). Detection of odorant molecules via surface acoustic wave biosensor array based on odorant-binding proteins. Biosensors & Bioelectronics, 41, 328–34.
[209] Rodgers, M. a., Findlay, J. B. C., & Millner, P. a. (2010). Lipocalin based biosensors for low mass hydrophobic analytes; development of a novel SAM for polyhistidine tagged proteins. Sensors and Actuators B: Chemical, 150(1), 12–18.
[210] S. Schütz, M.J. Schoning, P. Schroth, Ü. Malkoc, B. Weibbecker, P. Kordos, H. Lüth, H.E. Hummel, (2000).An insect-based biofet as a bioelectronic nose, Sens. Actuators, B 65, 291–295.
[211] V. Akimov, E. Alfinito, J. Bausells, I. Benilova, I. C. Paramo, A. Errachid, G. Ferrari, L. Fumagalli, G. Gomila, J. Grosclaude, Y. Hou, N. Jaffrezic-Renault, C.Martelet, E. Pajot-Augy, C. Pennetta, M. A. Persuy, M. Pla-Roca, L. Reggiani, S. Rodriguez-Segui, O. Ruiz, R. Salesse, J. Samitier, M. Sampietro, A. P. Soldatkin, J. Vidic, and G. Villanueva, (2008).Nanobiosensors based on individual olfactory receptors, Analog Integr. Circuits Signal Process., vol. 57, no. 3, pp. 197–203.
[212] Wu, T. Z. (1999). A piezoelectric biosensor as an olfactory receptor for odour detection: electronic nose. Biosensors & Bioelectronics, 14(1), 9–18.

Chapitre 2

Caractéristiques physico-chimiques des transducteurs MEMS en diamant et descriptions des dispositifs employés

Sommaire

2.1 Introduction..... 63

2.2 Fabrication des capteurs..... 63

2.2.1 Description des réacteurs de croissance de films de diamant……...63
2.2.1.a Le réacteur THOR……...64
2.2.1.b Le réacteur SEKI…….....65
2.2.1.c Le réacteur CLEOPATRA…….....66
2.2.1.d Mesure de l'épaisseur de la couche de diamant……..…..67
2.2.2 Les microleviers.....70
2.2.2.a Les techniques de micro-fabrication des MEMS…….70
2.2.2.a.i Descriptions des microleviers et leur actionnement……..70
2.2.2.a.ii Simulations effectuées pour déterminer les dimensions des microleviers……..…72
2.2.2.a.iii Description de la micro-fabrication des microleviers…….....74
2.2.2.a.iv Elaboration d'une cellule gaz pour microleviers…….....77
2.2.3 Les SAW 80
2.2.3.a Description des transducteurs SAW…….....80
2.2.3.b Dépôt de nanodiamants sur transducteurs SAW……81

2.3 Choix des greffages pour notre étude 83

2.3.1 Méthode 1 de greffage 84
2.3.2. Méthode 2 de greffage 85
2.3.3 Choix des récepteurs pour notre étude 89
2.3.3.a OBP 90
2.3.3.b MUP 95
2.3.3.c OR 98

2.3.4 Caractérisation des greffages : Protocoles d'expérimentations 99
2.3.4.a Présentation du dispositif d'analyse XPS 99
2.3.4.b Principe du microscope électronique à balayage 99
2.3.4.c Spectroscopie de fluorescence 100
2.3.4.d Le microscope AFM 100
2.3.4.e Caractérisations électrochimiques 100

2.4 Caractérisations des dispositifs utilisés en milieu liquide et gazeux 104

2.4.1 Dispositifs de caractérisation des propriétés de résonance des poutres en diamant en milieu liquide 104
2.4.1.a Description de l'équipement de mesure par effet Doppler laser 104
2.4.1.b Protocoles d'expérimentation en milieu liquide 106
2.4.2 Dispositifs de caractérisation des biocapteurs SAW et microleviers en diamant en milieu gaz 107
2.4.2.a Instrumentations de mesure pour transducteurs SAW 107
2.4.2.b Présentation du dispositif Sniffer développé au cours de l'étude 109
2.4.2.c Méthodes de génération de vapeurs de composés volatils et méthodes de validation des concentrations de vapeurs générées 111

2.5 Conclusion 117

Bibliographie du chapitre 2 118

2.1 Introduction

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, un biocapteur est généralement constitué d'un transducteur et d'une couche biologique composée de biorécepteurs ; de type LBP dans notre cas de prospection. Comme précisé aussi dans le chapitre 1, les transducteurs MEMS en diamant de type microleviers et SAW ont été choisis dans cette étude pour leurs nombreux avantages tels que leur grande sensibilité à détecter tous types de molécules et les propriétés de la surface de diamant pour réaliser différents greffages. Ainsi, ce second chapitre présente dans un premier temps les conditions de fabrication de ces deux types de transducteurs en diamant: les microleviers et les SAW. Dans un deuxième temps, nous allons nous attarder sur la réalisation et l'optimisation du dépôt des LBP sur ces transducteurs. Nous détaillerons ici les différentes voies de greffage utilisées dans ces travaux. L'objectif final de ce chapitre est d'expliciter les protocoles de caractérisation de ces différentes couches immobilisées. C'est pourquoi, dans un dernier temps, ce chapitre passera en revue les outils utilisés pour caractériser les greffages et les performances des capteurs ainsi développées ainsi que les dispositifs utilisés pour permettre une détection en milieux liquides et gazeux.

2.2 Fabrication des capteurs

Comme précisé précédemment, les transducteurs MEMS en diamant de type microleviers et SAW ont été choisis dans cette étude pour leurs nombreux avantages potentiels. Le développement des MEMS en diamant est une thématique de recherche qui a été explorée par le passé par plusieurs chercheurs au laboratoire LCD. Avant mes travaux, des études prospectives ont donc été réalisées sur la réalisation de ces transducteurs. Dans notre étude, ces deux types de transducteurs en diamant sont étudiés en les fonctionnalisant avec les LBP.

Cette partie présente donc les conditions de fabrication de ces deux types de transducteurs: les microleviers et les SAW. Avant d'expliciter les différents types d'immobilisation de LBP envisagés, les paramètres de croissance du diamant constituant la surface de ces deux transducteurs seront détaillés.

2.2.1 Description des réacteurs de croissance de films de diamant

Au laboratoire LCD du CEA, les procédés de croissance sélective de diamant ont été développés et caractérisés. Le schéma d'un réacteur MPCVD à géométrie cylindrique est présenté sur la Figure 2.1 suivante [1].

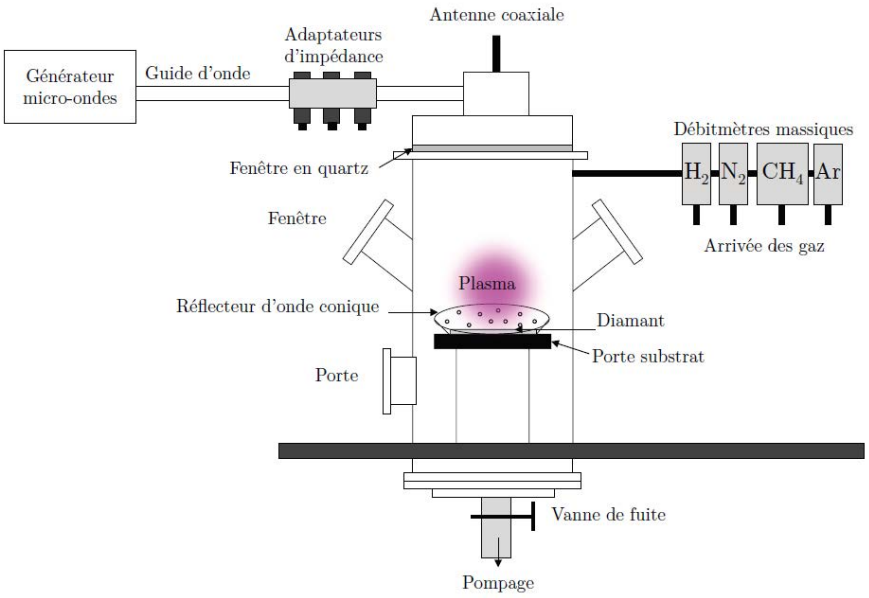


Figure 2.1 - Schéma d'un réacteur de croissance de films de diamant MPCVD [1]

Pour obtenir un film de diamant, comme détaillé dans le chapitre 1, il faut faire croitre des nanocristaux de diamant souvent déposés sur silicium par CVD. On utilise un plasma généré dans une cavité micro-ondes pour la génération de radicaux carbonés dans un mélange gazeux composé d'hydrogène et de méthane. L'hydrogène ionisé grave de manière sélective la phase graphitique (sp2) permettant ainsi de favoriser la croissance de la phase diamant (sp3).

Le laboratoire LCD dispose actuellement de 6 réacteurs de croissance MPCVD dont 2 qui permettent des croissances de films de diamant polycristallin sur des substrats de 4 pouces. Ces deux derniers réacteurs ont été utilisés pour la réalisation de micro-poutres en diamant sur des substrats de 4 pouces. Ces réacteurs utilisés dans notre étude seront dénommés, pour la suite, THOR et SEKI : THOR permet la synthèse de poutres intrinsèques, SEKI est dédié à la croissance de matériau dopé au Bore. Un autre réacteur permettant une croissance sur des surfaces de diamètre 2 pouces, et dénommé CLEOPATRA, sera utilisé pour la croissance de diamant sur transducteurs SAW.

2.2.1.a Le réacteur THOR

Le réacteur THOR est un réacteur industriel développé par la société SEKI Technotron et commercialisé sous l'appellation AX6500X. Il s'agit d'un réacteur à cavité résonante multimodes qui permet de synthétiser des films de diamant sur des grandes surfaces. Le constructeur garantit des procédés de croissances de diamant quasi-homogène jusqu'à des dimensions de substrat de 3 pouces.

Dans notre étude, ce réacteur a été optimisé pour la réalisation micro-poutres en diamant sur des substrats de 4 pouces. Une homogénéité de croissance de l'ordre de 60% a été mesurée en comparant l'épaisseur du centre aux bords du substrat. Une photographie du réacteur est présentée sur la Figure 2.2.

Figure 2.2 -Photographie du réacteur THOR de type AX6050X et de son enceinte.

Ce réacteur est relié à des lignes d'hydrogène et de méthane pour la synthèse de films de diamant. Ce réacteur est dédié aux étapes de croissance de couches de diamant intrinsèques sur des substrats en silicium de 4 pouces. Le réacteur suivant, nommé SEKI, est, quant à lui, dédié aux étapes de croissance de couches de diamant dopées.

Le Tableau 2.1 ci-dessous résume les conditions conventionnelles de croissance utilisées pour la croissance du diamant sur des microleviers pour l'obtention d'une épaisseur de diamant d'environ 3 µm.

Tableau 2.1 - Conditions de synthèse typiques d'un film de diamant polycristallin par procédé MPCVD avec le réacteur THOR

Puissance (kW)	Pression (mbar)	Flux gazeux (sccm)	Taux de H_2 (%)	Taux de CH_4 (%)	Température (°C)	Temps de croissance (heure)	Vitesse de croissance (nm/h)
3	26	200	99	1	750-800	12	250

2.2.1.b Le réacteur SEKI

Le réacteur SEKI est de même conception que le réacteur THOR. Ce dernier est dédié à la croissance de couches dopées au Bore, grâce à la disponibilité d'une ligne de triméthyle de bore (TMB) [2]. Le dopage de type p de films de diamant, avec l'élément bore, est actuellement bien maitrisé et décrit dans la littérature [3, 4].

Dans notre étude, ce réacteur est utilisé pour le dopage au bore de films de diamant pour réaliser des électrodes et des microélectrodes qui seront utilisées pour des caractérisations électrochimiques. Le niveau de dopage est d'environ 2.10^{21} atomes.cm^{-3} [4]. Le tableau 2.2 ci-dessous résume les conditions classiques de croissance utilisées pour la croissance du diamant dopé pour l'obtention d'électrodes de diamant d'une épaisseur d'environ 500 nm.

Tableau 2.2 - Conditions de synthèse typiques d'un film de diamant dopé au bore avec le réacteur SEKI

Puissance (kW)	Pression (mbar)	Taux de H_2 (sccm)	Taux de CH_4 (sccm)	Taux de TMB (sccm)	[B] (At.com^{-3})	Résistivité (Ω.cm)	Température (°C)	Temps de croissance (heure)
2,6	25	400	4	18	2.10^{21}	0,5	800	15

2.2.1.c Le réacteur CLEOPATRA

Le réacteur MPCVD, utilisé pour les travaux de croissance de diamant sur transducteurs SAW, est communément appelé CLEOPATRA. Une photographie du réacteur est présentée sur la Figure 2.3.

.

Figure 2.3 - Photographie du réacteur CLEOPATRA

Le réacteur CLEOPATRA permet une croissance du diamant à des températures plus faibles, donc plus adaptées à la croissance sur SAW en diamant.

Avant la croissance, un pompage en vide secondaire (<10^{-6} mbar) permet d'évacuer tout gaz polluant pouvant altérer la pureté et la reproductibilité du diamant (oxygène, azote, etc). Le tableau 2.3 ci-dessous résume les conditions classiques de croissance du diamant utilisées pour la croissance sur transducteurs SAW. La croissance se fait en 2 fois 30 minutes avec une puissance de 410 W puis de 400W.

Tableau 2.3 - Conditions de synthèse typiques d'un film de diamant polycristallin sur transducteur SAW par procédé MPCVD avec le réacteur CLEOPATRA

Puissance (kW)	Pression (mbar)	Flux gazeux (sccm)	Taux de H2 (%)	Taux de CH4 (%)	Température (°C)	Temps de croissance (min)
400-410	15	200	99	1	475-500	1h (2*30 min)

La température est mesurée à l'aide d'un pyromètre infrarouge (Ircon modline 3l-07c10). Il a été étalonné grâce à une plaque chauffante (Präzitherm TR 28-3T) délivrant des températures de 30 à 600 °C et à l'aide d'une caméra thermique (FLIR SC300, gamme 8 à 14 µm). Un wafer de silicium 2 pouces (500 µm d'épaisseur) a été découpé en échantillons de 1x1 cm, et utilisé comme référence car la température lue pendant la croissance sur les SAW est erronée étant donné l'émissivité de la surface. Cette référence est utilisée pour suivre la température dans le réacteur de croissance, et est toujours placée au centre du porte substrat. Une erreur significative estimée à +/- 5 °C doit être considérée sur la mesure de la température. Il est très important de contrôler précisément la température des SAW puisque le quartz qui compose les transducteurs SAW perd ses propriétés piézoélectriques autour de 573 °C [5, 6] (point de Curie du Quartz). Nos conditions expérimentales de mesure ne dépassent pas 500 °C, afin de garder une marge de sécurité. Il a été démontré qu'une croissance d'une heure était suffisante pour obtenir un film de diamant suffisamment fin pour ne pas sortir des gammes de fréquence de l'instrument d'acquisition et ne pas avoir une atténuation du signal trop importante [1, 7].

2.2.1.d Mesure de l'épaisseur de la couche de diamant

Plusieurs méthodes pour mesurer l'épaisseur de diamant déposée sur les substrats en silicium ont été utilisées. Ces méthodes ont principalement servi à vérifier que l'on avait bien les épaisseurs attendues en sortie de réacteur pour les microleviers en diamant. Ils ont aussi permis un tri sélectif de poutres selon leur épaisseur pour améliorer la reproductibilité des tests de performances.

Pour mesurer l'épaisseur de couches en diamant nous disposons, au laboratoire LCD, d'un banc de mesures interférométriques laser [8]. Le principe de mesures d'épaisseur est illustré par la Figure 2.4.

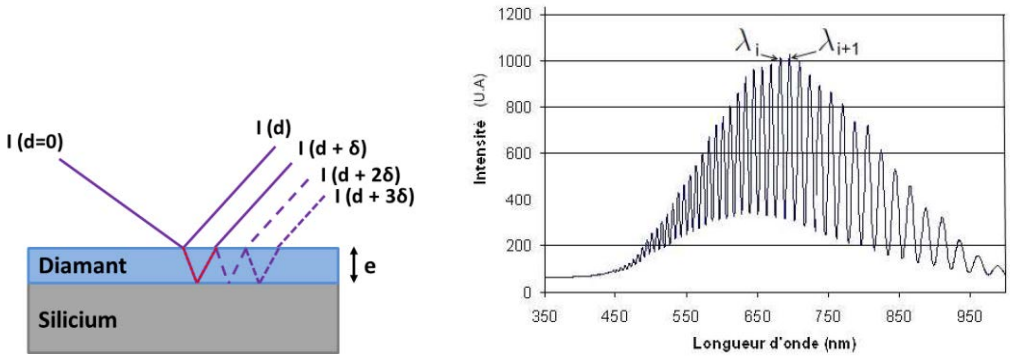


Figure 2.4 - Illustration du principe de mesure d'épaisseur de films par interférométrie optique : Représentation du parcours de rayons lumineux subissant une succession de réfractions et de réflexions aux interfaces air/diamant et diamant/substrat (à gauche) et Spectre typique de lumière présentant des minima et maxima d'interférences (à droite)

En pratique, une fibre optique à trois entrées/sorties est utilisée pour guider la lumière incidente sur l'échantillon et collecter les faisceaux réfléchis pour les guider à l'entrée d'un spectromètre (USB2000 Ocean Optics), relié à un ordinateur. La mesure des valeurs de 2 minima ou 2 maxima successives sur le spectre permet à partir d'un calcul simple de remonter ainsi à la valeur de l'épaisseur e.

La Figure 2.5 présente une photographie du dispositif de mesure d'épaisseur.

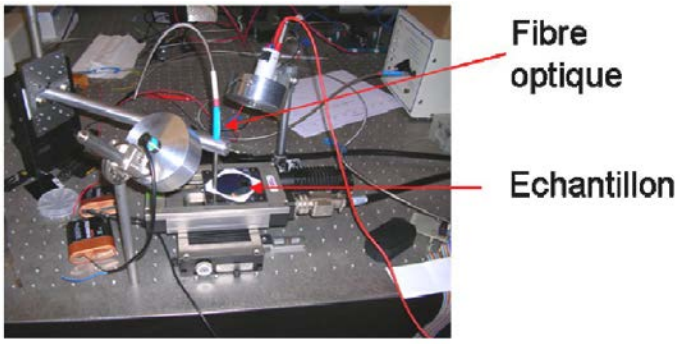


Figure 2.5 - Photo du dispositif de mesure d'épaisseur de films en diamant

Une autre méthode de caractérisation pour mesurer l'épaisseur du diamant est l'ellipsométrie. Ici, cette technique a été utilisée pour vérifier l'épaisseur de diamant sur les SAW après croissance dans le réacteur CLEOPATRA. Les épaisseurs attendues sont très faibles. L'ellipsométrie est une technique qui permet la caractérisation optique de films très minces.

Cette technique est basée sur le changement de polarisation de la lumière par réflexion sur la surface de l'échantillon. La mesure sur l'échantillon fournit soit des constantes optiques (n et k), soit des valeurs d'épaisseurs et de rugosités. Le modèle d'empilement classiquement utilisé au laboratoire (Figure 2.6 ci-dessous) comporte le substrat silicium d'une épaisseur infinie (500 µm), une couche diamant (100%) et une couche modélisant la rugosité de surface (vide à 50%). Ensuite, un modèle mathématique ajuste les paramètres d'épaisseur des deux couches supérieures afin d'obtenir les mêmes valeurs des constantes n et k obtenues lors de la mesure.

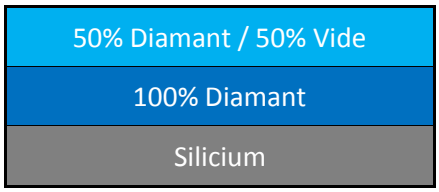


Figure 2.6 - Empilement utilisé pour la mesure d'ellipsométrie.

Enfin, la dernière méthode utilisée pour vérifier l'épaisseur du diamant sur les microleviers est l'utilisation d'un profilomètre mécanique (DEKTAK, pointes 25 µm de rayon de courbure et incrémentation de 33 nm) qui permet de calculer des hauteurs de marches. Plusieurs microleviers après croissance du diamant dans le réacteur THOR ont été étudiés au profilomètre pour effectuer un tri sélectif selon leur épaisseur avant toute expérience de détection. Des études de simulation ont défini que la valeur de l'épaisseur du microlevier doit être très proche de 3 µm pour rester dans les conditions optimales de performance du capteur. La Figure 2.7 ci-dessous montre comment la pointe du profilomètre mesure l'épaisseur des microleviers en diamant après croissance dans le réacteur THOR et définit une épaisseur d'environ 3,1 µm dans ce cas.

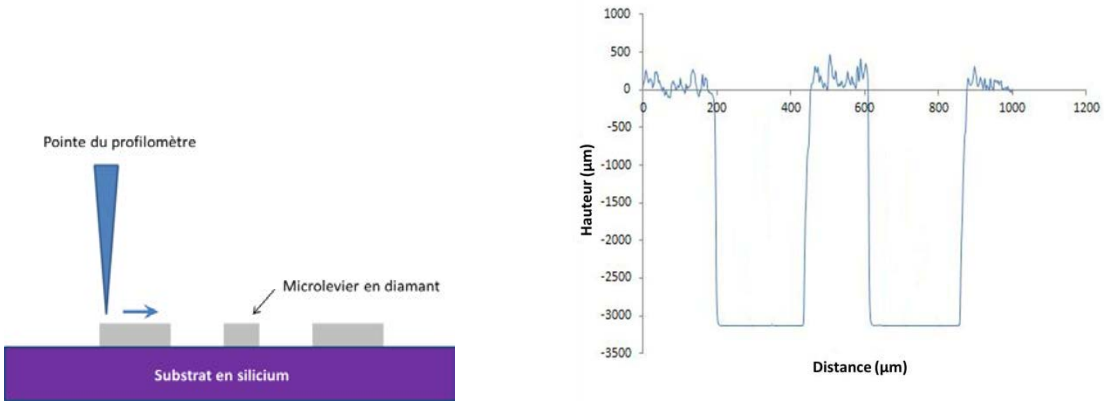


Figure 2.7 - Schéma de la mesure d'épaisseur du diamant du microlevier grâce au profilomètre DEKTAK.

2.2.2 Les microleviers

Le développement de MEMS en diamant est une thématique de recherche qui a démarrée en 2010 au Laboratoire Capteurs Diamant (voir Bongrain [9]). Ces travaux ont notamment permis la mise au point de procédés de micro-structuration de micro-poutres en diamant polycristallin permettant la fabrication de capteurs MEMS et leur utilisation pour des mesures de détection en milieu liquide.

2.2.2.a Les techniques de micro-fabrication des MEMS

2.2.2.a.i Descriptions des microleviers et leur actionnement

La modélisation, la fabrication et le développement de micro-poutres en diamant a explorée antérieurement au laboratoire [10]. La géométrie de micro-poutres de type « rectangulaire » a été plus spécifiquement étudiée (Figure 2.8).

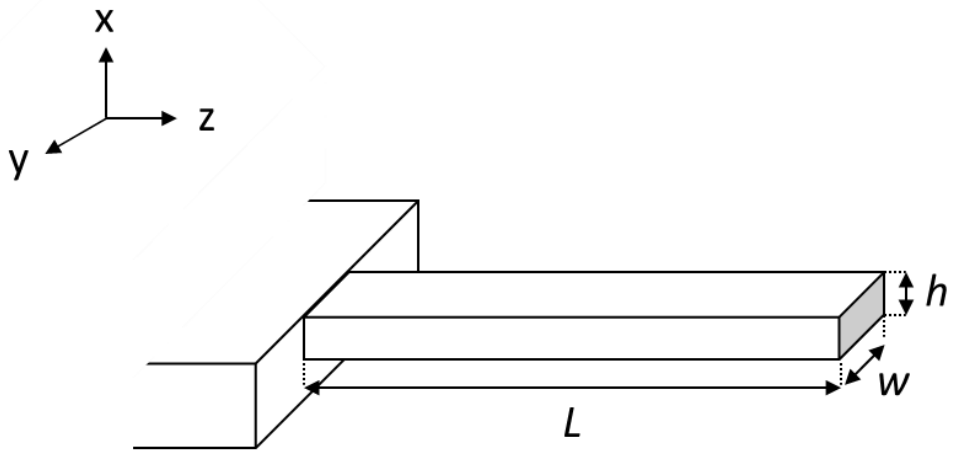


Figure 2.8 - Schéma de poutre à géométrie rectangulaire de longueur L, de largeur w et d'épaisseur h.

Cette géométrie élémentaire permettra une interprétation et une validation des résultats notamment par le calcul. Le but de l'étude présente est la fonctionnalisation biologique de tels transducteurs. Pour cela, nous allons uniquement effectuer quelques modifications pour permettre une détection en milieu gazeux plus optimale.

Pour cette étude, nous avons bénéficié des procédés de micro-fabrications dans la salle blanche de l'ESIEE pour la réalisation de structures MEMS en diamant [10] en

collaboration avec le laboratoire ESYCOM (Electronics, Communication Systems and Microsystems) de l'École Supérieure d'Ingénieurs en Électronique et Électrotechnique. Cette collaboration a notamment permis, en amont de cette thèse, la mise au point de techniques de croissance sélective de diamant. Dans le cadre du projet SNIFFER, des études de simulations ont été effectuées pour obtenir les dimensions des microleviers les plus adéquates et avoir une performance mécanique optimale en milieux gazeux. Par rapport aux travaux antérieurs (Bongrain et al. [9], les micro-poutres présentent des dimensions plus petites afin d'obtenir une augmentation de la fréquence de résonance et du facteur de qualité : les dimensions (L, w, h) ont été modifiées (et seront détaillées dans la section 2.2.2.a.ii). Aussi, le matériau utilisé pour les jauges piézorésistives est dorénavant en poly-silicium qui présente des facteurs de jauges plus élevés (environ 100) que ceux du diamant dopé au bore précédemment étudié (entre 2 et 14) [9].

Afin de pouvoir développer des procédés de greffages spécifiques pour l'immobilisation des biorécepteurs LBP, nous avons préféré travailler sur la fabrication de poutres individuelles au lieu d'un réseau de poutres non séparables. Ceci permet le greffage individualisé sur chaque microlevier. Aussi, cette approche permet-elle de fonctionnaliser chaque micro-poutre avec un biorécepteur spécifique.

Actionnement des microleviers

L'actionnement externe des microleviers se fait grâce à une cellule piézoélectrique (Figure 2.9) sur laquelle ils sont disposés. Ceci sera plus détaillé dans la section 2.4.1.

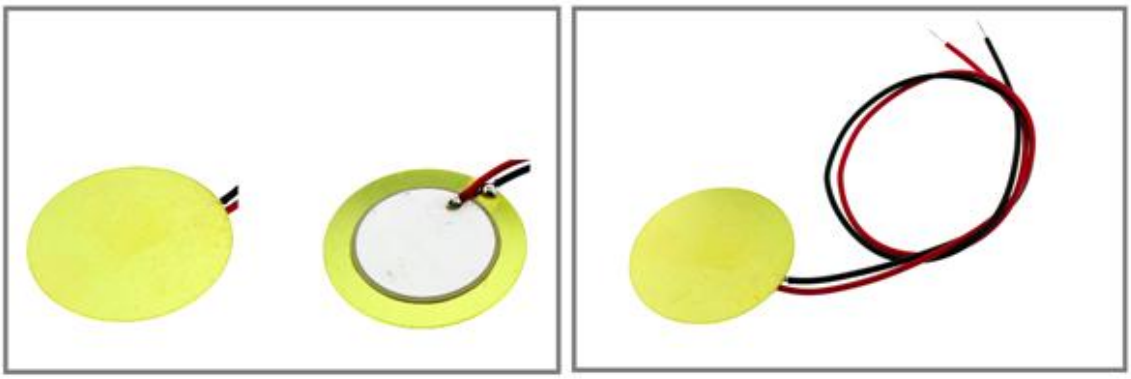


Figure 2.9 - Cellule piézoélectrique externe (Radiospare)

Deux méthodes de mesure de la fréquence de résonance de chaque microlevier ont été utilisées : (i) à l'aide de jauges piézorésistives intégrées, ou (ii) par mesure optique (vibrométrie laser). Les jauges piézorésistives insérées dans les microleviers

permettent une lecture électronique des oscillations. La Figure 2.10 ci-dessous présente un schéma des jauges piézorésistives intégrées sur les microleviers. Cette configuration permet de transformer la déformation du microlevier en un signal électrique exploitable.

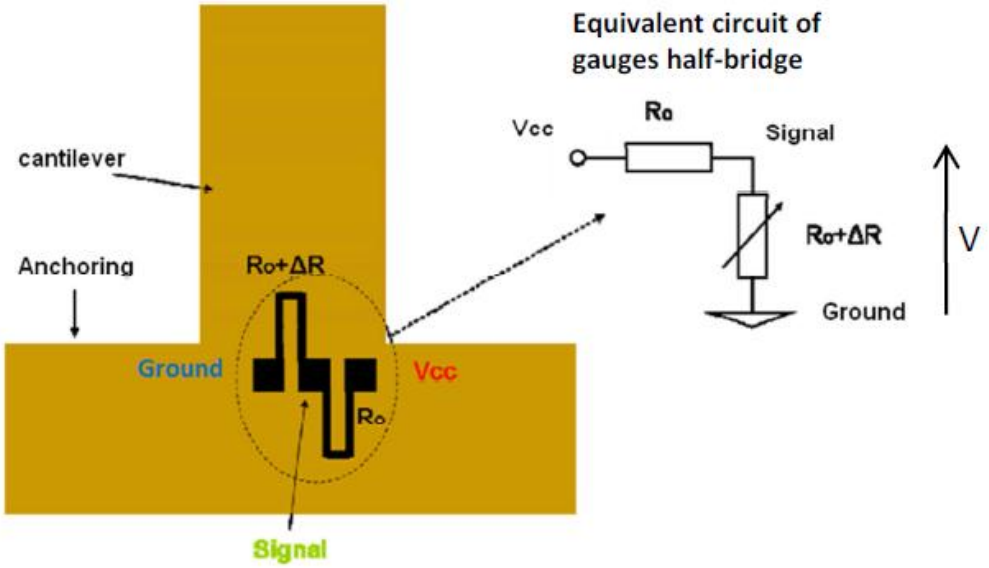


Figure 2.10 - Schéma de la lecture des jauges piézorésistives

Le second type de mesure (mesure optique) par vibrométrie laser permet en laboratoire une mesure directe de la fréquence de vibration notamment lors des étapes successives de greffage des LBP et leur mise au point. Ce système de mesure sera détaillé dans la section 2.4.1.

2.2.2.a.ii Simulations effectuées pour déterminer les dimensions des microleviers

Comme précisé précédemment, différentes simulations ont été menées en partenariat avec l'ESIEE dans le cadre du projet SNIFFER pour définir les meilleures performances des microleviers réalisables et obtenir de bons rapports signal sur bruit (S/N) pour l'application de détection en milieu liquide et gazeux. Les résultats des simulations effectuées sont résumés dans le Tableau 2.4.

Tableau 2.4 - Valeurs du S/N en faisant varier les jauges d'impédance R et les facteurs de jauge G avec une force F de 1nN appliquée sur un microlevier en diamant (épaisseur de 3 µm). Les valeurs surlignées en vert sont considérées comme acceptables étant donné un S/N ≥10)

	G	2	5	10	20	50	80	100
R								
10		13,9140217	34,7850543	69,5701085	139,140217	347,850543	556,560868	695,701085
50		6,22253967	15,5563492	31,1126984	62,2253967	155,563492	248,901587	311,126984
100		4,4	11	22	44	110	176	220
500		1,96773982	4,91934955	9,8386991	19,6773982	49,1934955	78,7095928	98,386991
1000		1,39140217	3,47850543	6,95701085	13,9140217	34,7850543	55,6560868	69,5701085
5000		0,62225397	1,55563492	3,11126984	6,22253967	15,5563492	24,8901587	31,1126984
10000		0,44	1,1	2,2	4,4	11	17,6	22
50000		0,19677398	0,49193496	0,98386991	1,96773982	4,91934955	7,87095928	9,8386991
100000		0,13914022	0,34785054	0,69570109	1,39140217	3,47850543	5,56560868	6,95701085

En résumé, ces simulations ont permis au partenaire ESIEE de tirer les conclusions suivantes : le facteur de jauge doit être supérieur à 20 avec une résistance inférieure à 1 KΩ. Ces performances ont été retenues pour l'ensemble des micro-poutres utilisées dans le projet.

D'autres simulations ont été effectuées pour trouver les dimensions optimales du microlevier en termes de performances de détection.

Nous savons, grâce aux considérations théoriques déjà prises en compte dans le chapitre 1, que dans l'air, plus le microlevier est court et plus la fréquence de résonance f_0 et le facteur de qualité Q seront importants. Les microleviers de faibles longueurs sont plus sensibles à la masse. Les autres éléments pris en considération pour paramétrer les simulations sont : la fréquence f_0 du microlevier, qui ne doit dépasser 300 kHz (la limitation imposée par la bande passante de l'électronique) et le facteur Q, qui doit être optimum ainsi que le rapport signal sur bruit.

Ainsi, la Figure 2.11 résume les simulations effectuées sur la fréquence f_0 et sur le facteur Q pour différentes épaisseurs du microlevier. Ces résultats montrent qu'avec une épaisseur comprise entre 3 et 5 µm, Q peut atteindre des valeurs comprises entre 500 et 1200. Nous remarquons qu'une épaisseur d'environ 3 µm permet de remplir le cahier des charges souhaité.

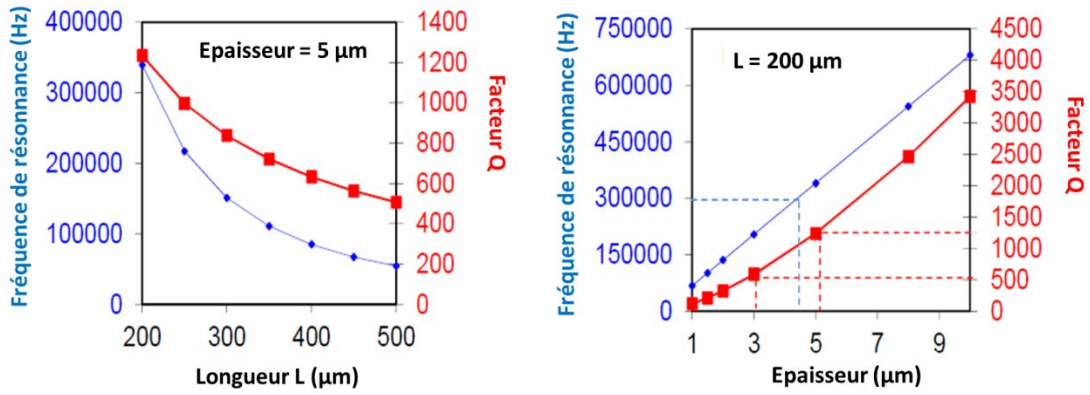


Figure 2.11 - Evolution de la fréquence f_0 en fonction de la longueur L du microlevier en diamant avec une épaisseur fixée à 5 µm (à gauche); Evolution de f_0 et du facteur Q en fonction de l'épaisseur avec L fixée à 200 µm (à droite)

Grâce à ces simulations, les dimensions adéquates à utiliser pour la fabrication des microleviers en diamant ont pu être établies et sont présentées dans le Tableau 2.5. La longueur du microlevier devra être comprise entre 210 et 260 µm, l'épaisseur entre 3 et 4,2 µm et la largeur autour de 140 µm. (La largeur n'a pas un réel impact sur les propriétés de résonance et sur le S/N). L'épaisseur du diamant est fixée à 3 µm dans notre étude pour des soucis de reproductibilité.

Tableau 2.5 - Dimensions des microleviers

Longueur (µm)	Largeur (µm)	Epaisseur (µm)
210 - 260	140	3 - 4,2

2.2.2.a.iii Description de la micro-fabrication des microleviers

Le diamant, de par sa très grande dureté mécanique et de son inertie chimique, est plus difficile à micro-structurer en utilisant des procédés de gravure sélective classiques que les matériaux couramment utilisés en microélectronique. Pour éviter les multiples étapes de gravure, des travaux antérieurs ont permis le développement de plusieurs approches micro-structuration spécifique du diamant en faisant croitre sélectivement le diamant sur des motifs prédéfinis par lithographie [9].

La Figure 2.12 ci-dessous résume les principales étapes de fabrication des microleviers en diamant.

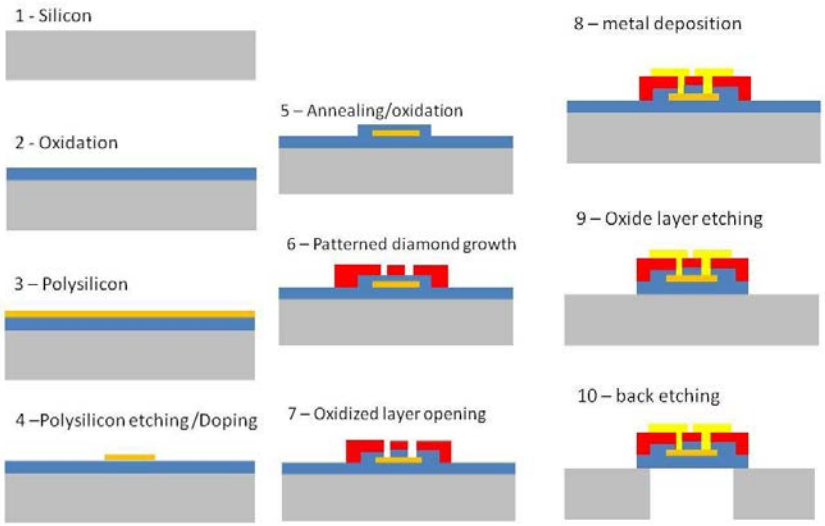


Figure 2.12 - Schéma conceptuel des étapes de fabrication des microleviers en diamant

Les étapes liées au dépôt de nanoparticules de diamant sur les substrats de silicium par nanoseeding ainsi qu'à la croissance du diamant sont effectuées au CEA. Elles seront davantage détaillées dans la section 2.2.1.b. Les autres étapes sont effectuées au sein de la salle blanche de l'ESIEE.

L'étape 2 consiste à l'oxydation thermique du substrat du silicium. Puis un dépôt de polysilicium (Poly Si) sur l'oxyde est réalisé sur les deux faces de la plaquette, suivi d'une gravure des jauges par photolithographie. La résine est alors exposée aux ultraviolets UV. Pour avoir une meilleure adhésion de la résine, l'équipe de l'ESIEE a d'abord déposé le primer hexamethyldisilazane (HMDS) avant la résine. La gravure ionique réactive (RIE pour Reactive-Ion Etching) du PolySi face avant s'est effectuée avec une épaisseur de gravure de 200 nm puis la résine a été enlevée dans un bain d'acétone. Une croissance thermique de SiO2, un dopage (implantation ionique) et un recuit thermique (étapes 4-5) sont nécessaires avant le dépôt du diamant (étape 6).
Au préalable, une étape dite de « nanoseeding » consiste à répandre des nanoparticules de diamant (5-20nm) sur la surface du substrat par la technique d'ensemencement à la tournette, comme décrit dans la littérature [11]. Le substrat est ensuite recouvert d'une couche d'aluminium de 500nm déposée par pulvérisation d'une cible d'aluminium sous un faisceau d'argon ionisé. Après un étalement de résine photosensible et une photolithographie permettant de définir les motifs, l'aluminium est gravé sélectivement sous plasma chloré au niveau des zones non recouvertes par la résine.

Après gravure de l'aluminium, les nanoparticules de diamant non masquées peuvent être exposées à un plasma oxygène (gravure RIE face avant) pour les supprimer sélectivement. Après la gravure sélective des nanoparticules, le substrat est d'abord plongé dans un bain de solvant afin d'éliminer les résidus de résine pouvant subsister après le plasma oxygène avant de graver l'aluminium dans une solution concentrée en soude. Une fois la croissance du diamant effectuée dans un réacteur MPCVD de sorte à obtenir une épaisseur de diamant de 3µm, on procède à l'ouverture des contacts en enlevant l'oxyde face avant et face arrière grâce à la gravure avec de l'acide fluorhydrique (HF). Une métallisation est effectuée pour recouvrir toute la surface du microlevier puis une lithogravure est faite pour le développement du métal. Une nouvelle fois, une gravure RIE du PolySi face arrière est effectuée avant le dépôt d'aluminium. Enfin la libération de la poutre par DRIE est effectuée.

La structure 3D du résultat final de fabrication des microleviers est présentée sur la Figure 2.13.

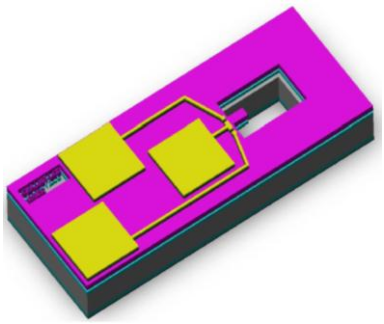


Figure 2.13 - Schéma de la structure 3D finale (vue de dessus) du microlevier en diamant à l'étape finale de fabrication avec ses jauges permettant la mesure piézorésistive

La Figure 2.14 est une photographie d'un substrat de silicium contenant un lot de poutres en diamant. A droite une image MEB d'une poutre est observée.

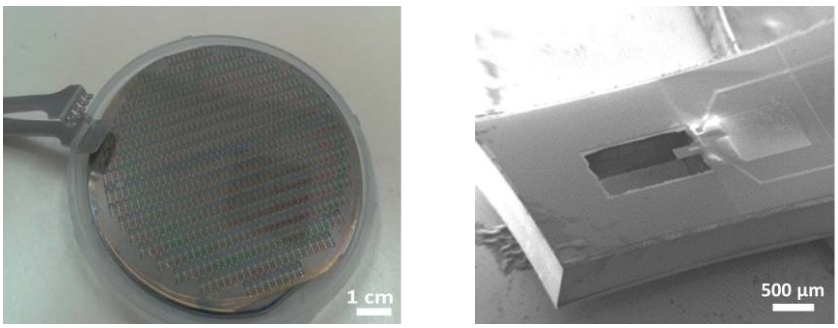


Figure 2.14 - Photographie d'un substrat de silicium de 4 pouces après libération des poutres en diamant (à gauche), Image MEB d'une poutre en diamant (à droite)

2.2.2.a.iv Elaboration d'une cellule gaz pour microleviers

La conception et la fabrication d'une cellule pouvant contenir plusieurs transducteurs pour une détection en gaz ont été élaborés au cours de cette étude (Figure 2.15) en collaboration avec l'ESIEE et l'Université de Manchester.

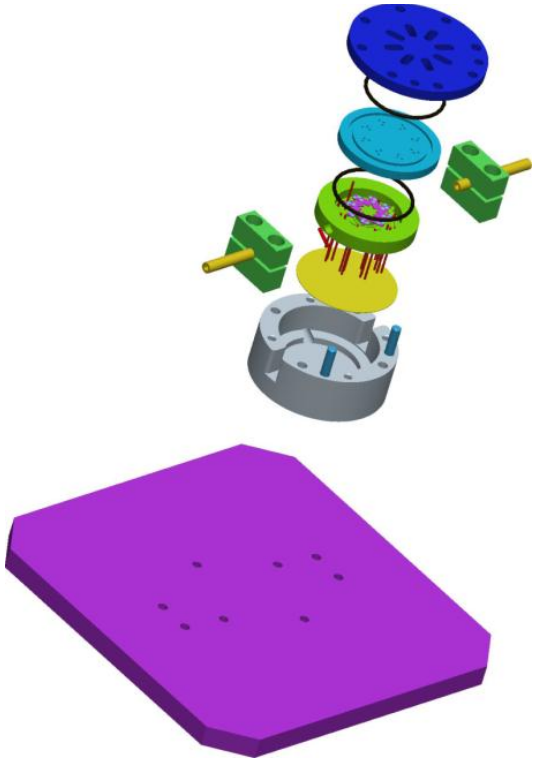


Figure 2.15 - Vue éclatée de la cellule gaz avant assemblage

La cellule a été dessinée afin de pouvoir accueillir simultanément 8 microleviers différents selon la disposition indiquée dans la Figure 2.16.

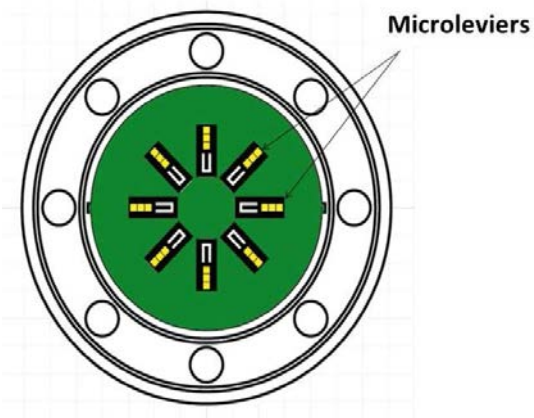


Figure 2.16 - Schéma de la vue du dessus sur les 8 microleviers dans la cellule

La chambre de la cellule a été optimisée pour être la plus petite possible pour éviter les volumes morts. Tous les microleviers peuvent être activés par un unique transducteur piézoélectrique placé en dessous de la plateforme soutenant les capteurs. La cellule est principalement faite d'acier inoxydable comme on peut le voir sur la Figure 2.17. Elle est donc chimiquement inerte et permet une bonne conduction de la chaleur, ce qui permettra de contrôler facilement la température des capteurs.
La tête de la cellule est compatible pour une connexion directe pour être adaptée directement au préconcentrateur développé par des collaborateurs du projet Sniffer.

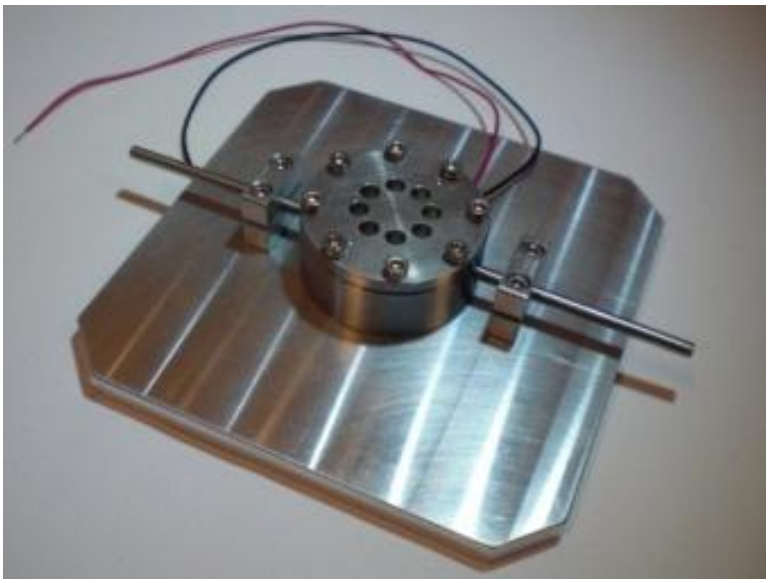


Figure 2.17 - Illustrations de la cellule gaz pouvant accueillir 8 microleviers.

La Figure 2.18 montre un spectre de fréquence typique d'un microlevier placé dans la cellule. La fréquence de résonance est ici d'environ 145,65 kHz avec un facteur Q d'environ 600. Ces valeurs restent relativement constantes lorsque le microlevier est déplacé dans les 8 positions différentes de la cellule.
Des connections électriques reliées aux jauges piezorésistives permettent une lecture électronique des transducteurs directement dans la cellule. Cet actionnement électronique des microleviers a été principalement développé par l'ESIEE.

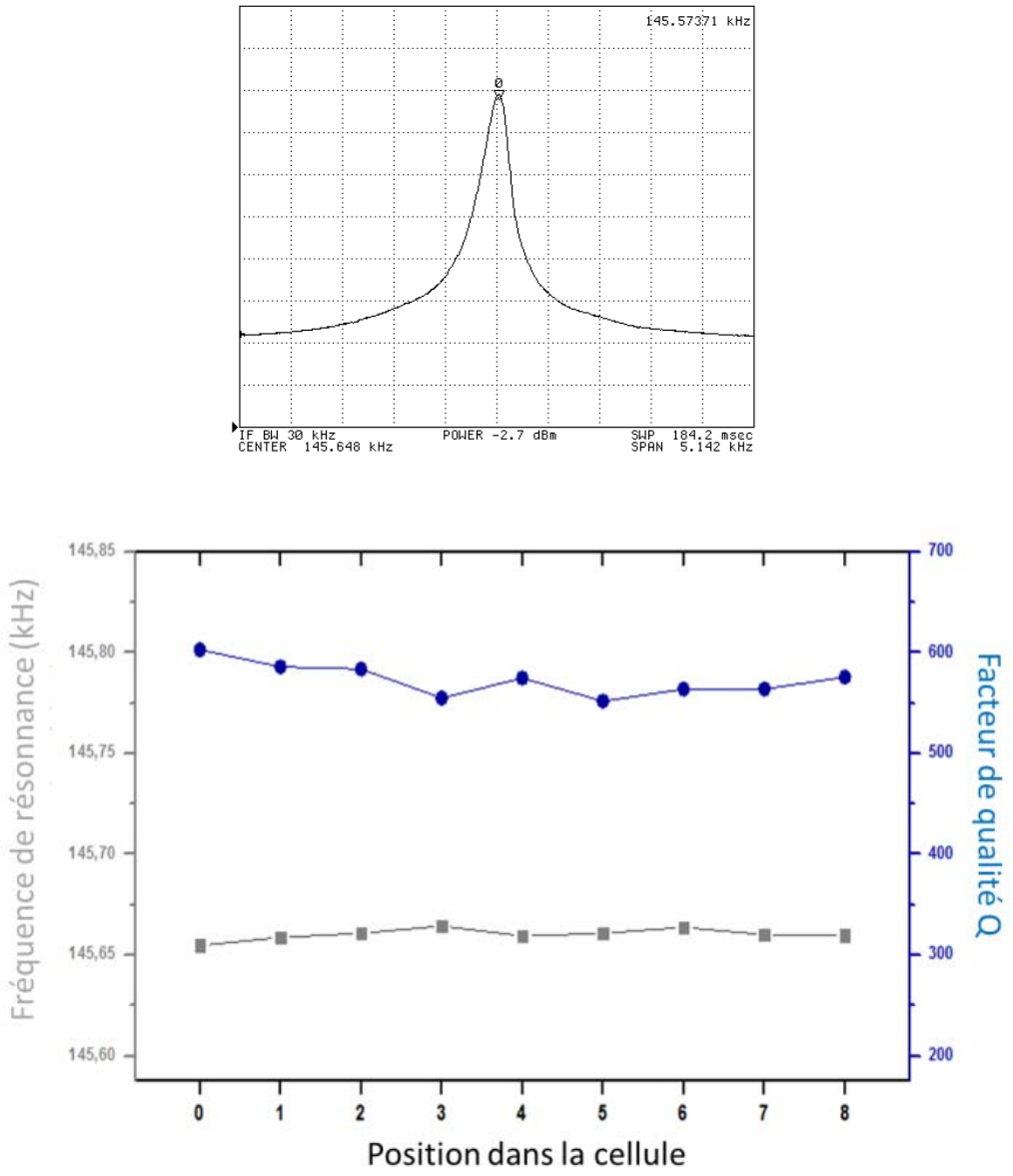


Figure 2.18 - Spectre de la fréquence de résonance d'un microlevier en diamant placé dans la cellule (en haut) ; Variation de la fréquence de résonance et du facteur de qualité Q des microleviers placés sur les 8 positions dans la cellule (la « position 0 » est la position en dehors de la cellule) (en bas)

Malheureusement, cette cellule n'a été que très peu utilisée étant donné que son emploi dépendait de l'avancement du dispositif électronique relié à celle-ci, développé par d'autres collaborateurs.

2.2.3 Les SAW

Plusieurs étapes de la mise au point des techniques de greffage des LBP sur microleviers ont aussi été optimisées sur SAW (Surface Acoustique Wave). Ici, le Laboratoire Capteurs Diamant dispose d'une plus grande antériorité grâce notamment aux travaux de Chevalier E. ; Scorsone E. et Tard B [1, 12, 7]. Ces études ont permis d'optimiser les techniques de dépôts de couches homogènes de nanodiamants (NDs) sur des SAW par technique de « layer by layer » [7, 12], décrite dans la section 2.2.3.b. Les travaux de Chevalier et al. et de Tard et al. ont respectivement démontré la réalisation de capteurs chimiques pour la détection du DNT [7] et de toxiques de guerre en utilisant des transducteurs SAW en diamant fonctionnalisé [1, 12]. Ces travaux ont ainsi permis d'améliorer le procédé de réalisation de couches diamant sur transducteur SAW en termes de robustesse et de répétabilité.

2.2.3.a Description des transducteurs SAW

Les SAW en quartz avant fonctionnalisation sont fournis par le Karlsruhe Institute of Technology (KIT) et la Figure 2.19 montre la photographie d'un lot de transducteurs.

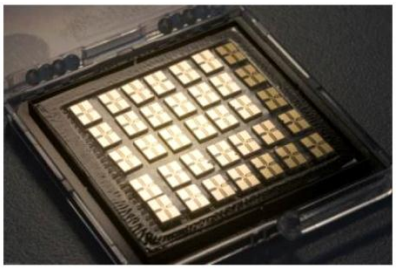


Figure 2.19 - Photographie de transducteurs SAW

Ce sont des transducteurs de type résonateurs à ondes de Rayleigh de 3,9 mm * 5.9 mm et d'environ 0,6 mm d'épaisseur. Le matériau piézoélectrique utilisé est le quartz ST-cut qui possède un bon compromis entre vélocité acoustique élevée et tenue en température acceptable. Des électrodes en or de 100 nm d'épaisseur sont déposées pour établir le contact avec le matériau piézoélectrique. Ces électrodes sont disposées en peignes interdigités avec un pas de 2 µm.

Comme précisé dans le chapitre 1, les transducteurs SAW étudiés dans notre étude sont de types résonateurs.

2.2.3.b Dépôt de nanodiamants sur transducteurs SAW

Les SAW fournis par le KIT sont recouverts par un polymère agissant comme une protection anti-rayures. Une étape de rinçage des SAW est donc nécessaire pour que cette couche soit enlevée. Cette étape consiste en un rinçage intense des SAW à la pissette à l'isopropanol puis à l'éthanol et enfin à l'eau pour éviter toute trace restante de couche de polymère. Les transducteurs sont enfin séchés sous diazote sec.

Les SAW sont ensuite recouverts d'une couche de diamant par une technique de layer by layer déjà optimisée par le LCD et qui permet une déposition de couche homogène de nanodiamants sur la surface du SAW [12]. Le procédé de dépôt layer by layer utilisé ici est le suivant :

Les ND utilisés dans cette étude sont des ND haute pression et haute température (ND-HPHT) qui sont préparés par broyage de diamant HPHT. Le diamant de synthèse HPHT est fabriqué sous haute pression (plusieurs GPa) et haute température (plus de 1500 °C) [13]. La poudre NDHPHT utilisée pour cette étude est la Syndia SYP0-0.02 (achetée auprès du fournisseur Van Moppes), reçue en suspension dans l'eau à une concentration de 69,5 carats/kg (soit 13,9 g/L), et utilisée après dilution à 0,1% en masse. Afin de diminuer la taille moyenne des NDs, et ainsi limiter la masse déposée sur les transducteurs SAW, un tri en taille par ultra centrifugation (2x30 minutes) est nécessaire. La centrifugation permet également d'éliminer les plus grosses nanoparticules ou agrégats en suspension.

Afin de permettre la préparation d'un dépôt homogène de ND sur plusieurs transducteurs en même temps, tout en minimisant leur manipulation et en consommant un minimum de solution de NDs, un moule en Téflon capable d'accueillir 10 transducteurs a été utilisé (Figure 2.20). [1]

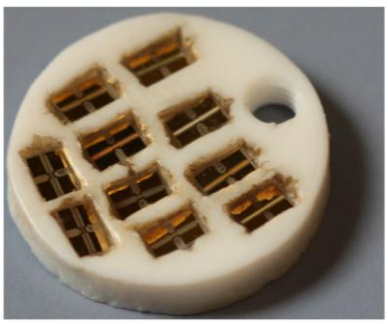


Figure 2.20 - Photographie du moule utilisé pour le dépôt de NDs

Le procédé de dépôt des ND-HPHT sur les SAW est adapté des travaux de Scorsone et al [14]. Avant de déposer les ND-HPHT à la surface des SAW, une goutte d'un polymère, est déposé sur les SAW pendant 2 minutes. Le polymère utilisé pour les dépôts est le polydiallyldimethylammonium chloride) (PDDAC 20%, Sigma Aldrich) dilué dans de l'eau déionisée pour obtenir une solution de concentration 1% en masse. Puis un rinçage à l'eau est effectué, et une goutte de ND est déposée à la surface des transducteurs pendant 2 minutes. Ce procédé est répété 3 fois. Enfin, un séchage à l'azote sec est effectué. L'utilisation de cette technique de dépôt de ND permet d'obtenir une couche de diamant très fine sur les SAW (inférieure à 20 nm), rugueuse, avec une surface disponible élevée.

Après le dépôt des 3 couches de ND par la technique layer by layer, une exposition courte à un plasma dans le réacteur CLEOPATRA permet d'une part, d'éliminer le PDDAC résiduel, et d'autre part de faire croître le diamant grâce à la technique MPCVD sur cette couche de ND (Figure 2.21) pour la formation d'un dépôt de diamant coalescent.

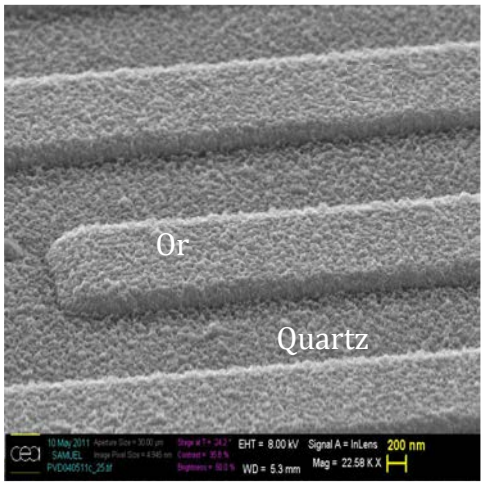


Figure 2.21 - Image MEB d'un transducteur SAW avec des couches de NDs

La Figure 2.22 représente un spectre caractéristique d'un transducteur SAW après dépôt d'une couche de diamant obtenu à l'analyseur de réseau. Sa fréquence de résonance initiale dès réception (avant dépôt couche de diamant) est comprise entre 428 et 430 MHz [15], avec un facteur de qualité typiquement autour de 3500. L'atténuation, après le dépôt des 3 couches de NDs, est faible (autour de -5 dB par rapport au transducteur initial) et le facteur de qualité peu impacté.

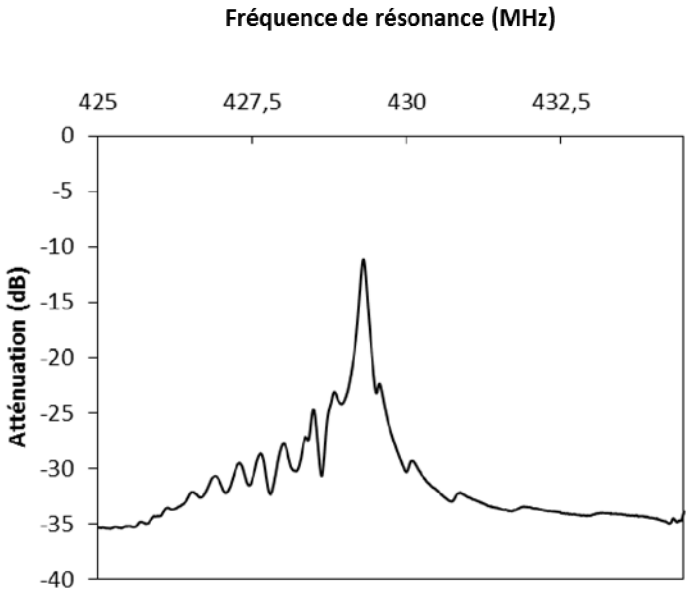


Figure 2.22 - Spectre classique d'un transducteur SAW après dépôt d'une couche de diamant

2.3 Choix des greffages pour notre étude

Il existe, comme souligné dans les sections précédentes, différentes techniques pour immobiliser OBP, OR ou MUP sur des surfaces de transducteurs. Il n'existe à ce jour aucun travail traitant de l'immobilisation de LBP sur des transducteurs en diamant.

Une fois sortis de réacteurs MPCVD, les transducteurs de type microleviers et SAW sont recouverts d'une couche de diamant homogène et coalescée. Cette couche possède de nombreuses propriétés intéressantes. Pour des raisons de simplicité, nous avons décidé de travailler avec une surface de diamant hydrogéné car le diamant est majoritairement composé de terminaisons hydrogènes en surface en fin de croissance [2] et est donc immédiatement disponible pour être fonctionnalisé sans aucune étape intermédiaire. Au cours de cette étude, le procédé de fonctionnalisation de Ruffinatto et al a été utilisé [16, 17]. Ce choix a été fait pour plusieurs raisons : d'une part, parce que cette procédure de greffage est simple et que l'on peut contrôler aisément le dépôt d'une monocouche avec un temps de greffage adéquat et d'autre part, parce qu'elle permettra par la suite d'immobiliser aisément nos biorécepteurs LBP sur les surfaces de nos structures SAW et microleviers en diamant fonctionnalisé par des terminaisons carboxyliques. Ainsi, des acides comprenant une terminaison amine, pour permettre le greffage spontané sur diamant hydrogéné, et une terminaison –COOH, pour faciliter l'accroche des LBP en utilisant deux techniques différentes, ont été utilisés.

2.3.1 Méthode 1 de greffage

La première méthode utilisée pour immobiliser les LBP sur les SAW et microleviers en diamant hydrogéné est détaillée dans cette section. Le greffage de l'acide aminocaproïque sur surface en diamant a déjà été mis œuvre par sur microleviers et a donc été explicitement prouvé et démontré dans la littérature [9, 18].

Les solutions de greffage ont été préparées en dissolvant la quantité adéquate d'acide amino-caproïque anhydre dans une solution de tampon phosphate à 0.2 M à pH 9.8 pour obtenir une solution d'acide aminocaproïque à une concentration de 1mM. Le radical d'acide hexanoïque a été greffé sur la surface du diamant hydrogénée en immergeant le substrat dans une solution d'acide aminocaproïque pendant 5 minutes puis a été rincé vigoureusement avec de l'eau déionisée (DI).

L'acide carboxylique ainsi greffé est ensuite activé par un couplage classique EDC/NHS (30mM/60mM) pendant deux heures. Les étapes du couplage EDC/NHS sont représentées dans la Figure 2.23 suivante [19].

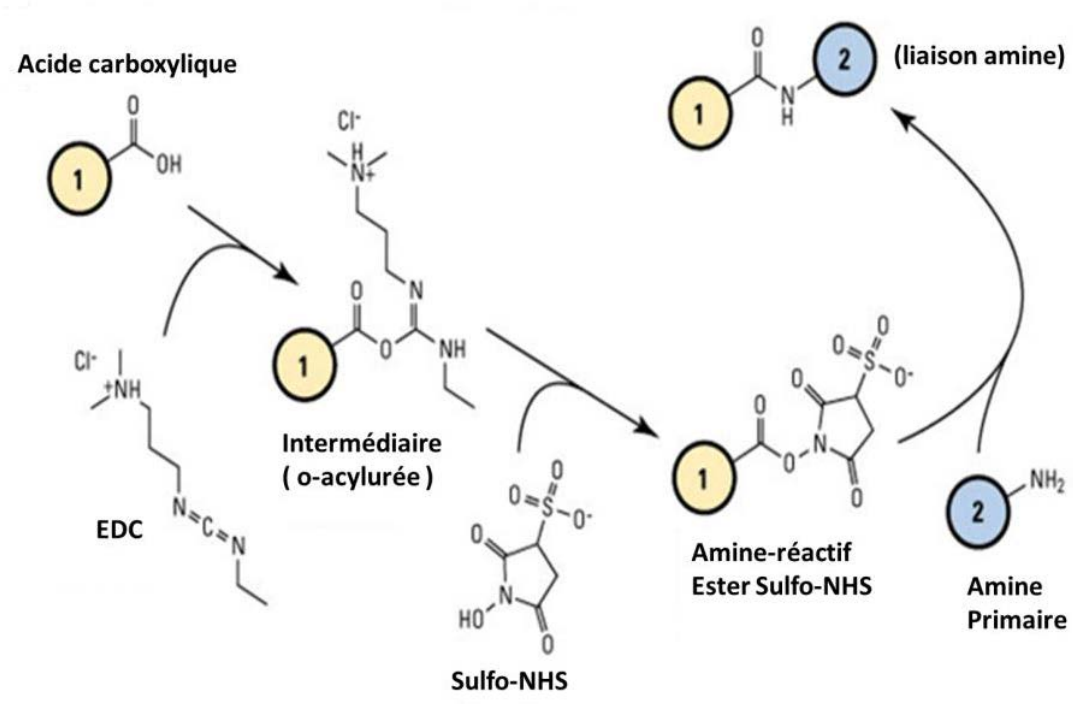


Figure 2.23 - Etapes des réactions du couplage EDC/NHS sur une surface d'acide carboxylique. Ici (1) peut représenter la surface de diamant fonctionnalisé avec des terminaisons -COOH et (2) le récepteur olfactif LBP contenant une amine [20]

Ce protocole EDC/NHS sur la surface fonctionnalisée du diamant permet donc l'immobilisation des protéines LBP en surface. L'immobilisation des LBP se fait donc après le couplage EDC/NHS en solution concentrée en LBP à hauteur de 0.95 mg/mL dans une solution tampon $NaHCO_3$ à une concentration de 50 mM et à un pH égale à 8.00 pendant 2 heures. Enfin, les substrats sont vigoureusement rincés à l'eau DI et stockés dans une solution tampon phosphate saline (PBS pour phosphate buffered saline).

Les étapes de cette immobilisation de LBP sont représentées dans la Figure 2.24 suivante pour le cas d'une immobilisation d'OBP. Cette technique d'immobilisation sera communément appelée « méthode 1 » d'immobilisation.

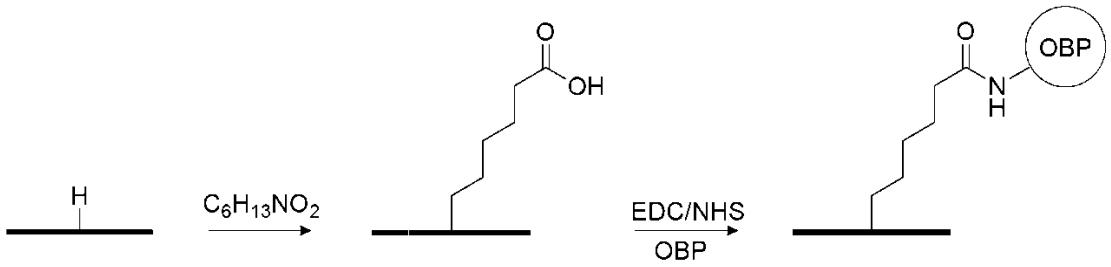


Figure 2.24 - Résumé des étapes d'une immobilisation d'OBP sur une surface en diamant préalablement hydrogénée greffé en utilisant la méthode 1

2.3.2. Méthode 2 de greffage

Le couplage EDC/NHS est connu dans la littérature pour permettre l'accroche de protéines à la surface terminée par des fonctions -COOH [21]. On peut souligner le fait que la méthode 1 procède par une immobilisation aléatoire et non orientée des protéines LBP sur la surface en diamant fonctionnalisé.

Idéalement, un procédé d'immobilisation doit conduire à lier fortement ces éléments sur la surface, à optimiser la densité du dépôt, certes, mais aussi à orienter uniformément et surtout convenablement les récepteurs LBP de façon à garantir leur accessibilité pour les ligands et donc leur fonctionnalité, et enfin, il doit minimiser les interactions non spécifiques des espèces odorantes avec les sous-couches de fonctionnalisation du support. C'est pourquoi une seconde approche d'immobilisation a été investiguée afin de contrôler l'orientation des protéines LBP immobilisées en surface. Cette seconde technique d'immobilisation originale sera communément appelée « méthode 2 » d'immobilisation.

Le choix d'utiliser cette technique d'immobilisation a été inspiré par le fait que le complexe NTA•Ni^{2+} a été intensivement caractérisé dans le passé [22] et que les tags (ou étiquettes) polyhistidinés 6his sont utilisés depuis les années 90 pour filtrer et immobiliser des protéines sur les colonnes de chromatographie en effectuant une étape de purification [23]. Cette technique n'a été employée que très récemment pour immobiliser des biomolécules pour la fabrication de biocapteurs [24, 25, 26]. A notre connaissance, cette méthode n'a jamais été utilisée pour immobiliser des LBP taggués 6his sur des transducteurs SAW et microleviers. Cette technique est plutôt fréquemment utilisée pour la purification par chromatographie d'affinité de protéines synthétisées par génie génétique [27]. Dans une telle technique, on a recours à l'affinité et l'interaction de certaines molécules pour d'autres composés.

La chromatographie IMAC (immobilized metal affinity chromatography) fait appel spécifiquement à la méthode employée dans notre méthode d'immobilisation 2 [28, 29, 30]. En effet, ce type de chromatographie d'affinité utilise l'immobilisation, sur une résine, d'un atome métallique comme le nickel ou le cobalt. En règle générale, les résines contenant du nickel ont une plus grande capacité de fixation, tandis que les résines au cobalt conduisent à une pureté supérieure. Cet atome immobilisé peut établir des liens de coordination avec certains polypeptides, comme par exemple une chaîne d'histidines [24]. L'étiquette 6his est justement ajoutée aux protéines pour que ces dernières soient plus aisément purifiées par chromatographie d'affinité pour le métal. L'étiquette poly-histidine se lie au NTA-Ni avec une affinité micromolaire [31].

La Figure 2.25, ci-dessous, représente le principe de chromatographie IMAC [32].

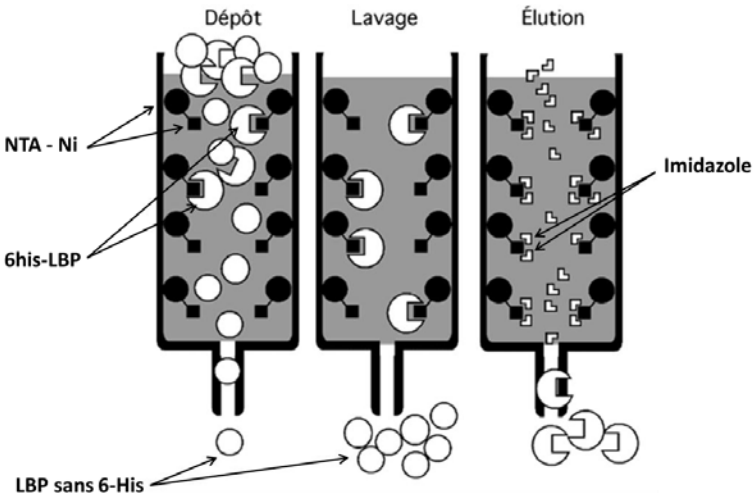


Figure 2.25 - Schéma représentant le principe de chromatographie IMAC avec l'exemple d'une résine NTA-Ni en présence de LBP

Dans la Figure 2.26, ci-dessous, une résine IMAC NTA-Ni, utilise un ion de nickel comme site actif. L'ion Ni^{2+} possède six liens de coordination. Quatre sont sollicités par le NTA pour l'immobiliser sur la résine; il en reste donc deux pour interagir avec les atomes d'azote du cycle de la chaîne latérale de deux résidus histidines des LBP par exemple.

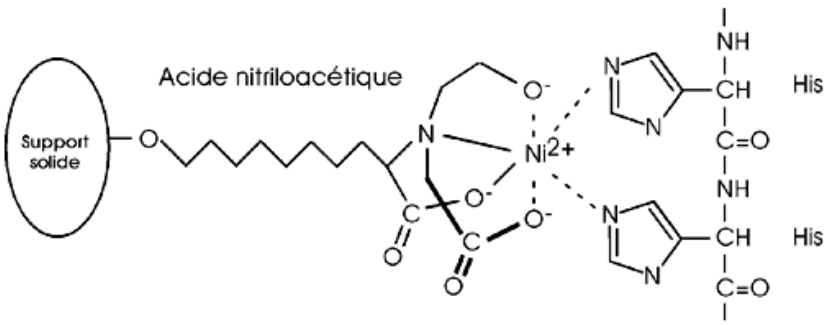


Figure 2.26 - Schéma représentant le mécanisme d'accroche des protéines tagguées 6his sur une résine NTA-Ni [32]

Le pH peut être utilisé pour contrôler le lavage : la résine peut être éluée avec un tampon phosphate de façon à éliminer les protéines qui ne portent pas de résidus 6his, et qui ne se sont donc pas liées à la résine.

Plusieurs techniques peuvent être employées pour contrôler l'élution. A pH inférieur à 6, les résidus histidines commenceront à être réduits et ne pourront plus lier le nickel. En effet à ce pH, l'histidine devient protonée et se détache des ions métalliques. Une variation de pH peut donc être utilisée pour faire décoller les protéines 6his de la résine NTA-Ni. Le nickel peut aussi être chélaté avec de l'EDTA et pour détacher le nickel du NTA [29, 33]. Cependant, la technique d'élution la plus usuelle et la plus douce se fera à l'aide d'un composé qui rentrera en compétition avec l'histidine pour le nickel: l'imidazole, représenté ci-dessous dans la Figure 2.27.

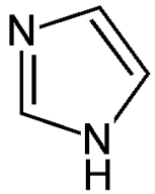


Figure 2.27 - Molécule d'imidazole

Décrivons à présent la méthode 2 de greffage utilisée dans cette étude.

En bref, elle consiste à greffer un acide nitrilo-acétique contenant 3 groupements –COOH sur une surface en diamant hydrogéné en utilisant le même processus que pour la fonctionnalisation de méthode 1 [16]. Les solutions de greffage ont été préparées en dissolvant la quantité adéquate de Nα,Nα-Bis-(carboxymethyl)-L-lysine hydraté (NTA) dans une solution de tampon phosphate à 0.2 M à pH 9.8 pour obtenir une solution de NTA à une concentration de 1mM. Le transducteur SAW ou microlevier en diamant hydrogéné est immergé dans cette solution ainsi préparée pendant 5 minutes puis il est vigoureusement rincé avec de l'eau DI. Ensuite, la surface fonctionnalisée est exposée à une solution de 1mM de Nickel II (Ni) pendant 2h à température ambiante.

Le complexe NTA•Ni^{2+} résultant de cette réaction ainsi formé permet l'immobilisation des LBP comprenant un groupe de six histidines (6his) grâce à leur interaction spécifique [29]. Une étiquette poly-histidine est un motif d'acides aminés dans une protéine constituée d'au moins six résidus histidines, souvent insérés à l'extrémité N- ou C- terminale de la protéine. Cette étiquette est parfois désignée par les noms hexa-histidine tag (en anglais), 6xHis-tag ou encore la marque déposée His-tag de EMD Biosciences. En effet, le NTA a la capacité de se lier au Nickel et le complexe, ainsi formé, a une très grande affinité avec les groupes histidines. Nous disposons de plusieurs LBP taggués 6his, le tag 6his a été inséré à l'extrémité N-terminal dans notre cas d'étude. Dans le cas des OBP, le 6his est situé à l'opposé de la cage réceptrice d'odeurs de l'OBP. Ce qui peut donc conduire à une immobilisation orientée des OBP en utilisant la méthode 2 d'immobilisation.

L'immobilisation des LBP taggués 6his se fait grâce à une solution concentrée en LBP à hauteur de 1 $mg.mL^{-1}$ dans une solution tampon PBS à une concentration de 20 mM et à un pH égale à 8 pendant 2 heures. Enfin, les substrats sont vigoureusement rincés à l'eau DI et stockés dans une solution tampon phosphate saline (PBS pour phosphate buffered saline).

Les étapes de cette immobilisation de LBP sont représentées dans la Figure 2.28 suivante pour le cas d'une immobilisation d'OBP.

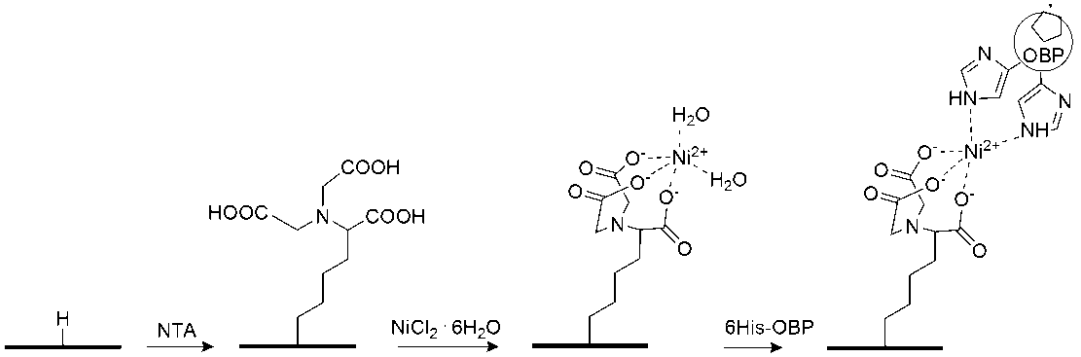


Figure 2.28 - Résumé des étapes d'une immobilisation d'OBP sur une surface en diamant préalablement hydrogénée greffé en utilisant la méthode 2

2.3.3 Choix des récepteurs pour notre étude

Comme indiqué précédemment, nous avons collaboré, dans le cadre du projet Sniffer, avec plusieurs équipes internationales pour la réalisation de biocapteurs à base de récepteurs olfactifs de type OBP et MUP pour la détection de drogues et d'explosifs aux frontières aéroportuaires. Comme nous l'avons vu précédemment dans la section 1.5, les récepteurs olfactifs de type LBP ont une certaine capacité à détecter des odeurs dans le règne animal [34, 35]. En mimant le système olfactif grâce à l'utilisation d'OBP par exemple, on suppose créer un biocapteur efficace pour la détection optimale de petites molécules organiques volatiles.

Les OBP ont été fournis par l'université de Manchester (School of Chemical Engineering and Analytical Science, Royaume-Uni). Les MUP ont été fournis par l'université de Padova (Italie). L'entreprise GTP Technology a par ailleurs permis de produire ces protéines en grandes quantités.

Dans un autre contexte, nous avons collaboré dans le cadre d'un échange avec l'unité de neurobiologie de l'olfaction et modélisation en imagerie (NOeMi) d'Edith Pajot-Augy à l'institut national de la recherche agronomique (INRA) de Jouy en Josas pour l'utilisation d'OR dans la fabrication de biocapteurs.

Nous détaillerons ici les différents OBP, MUP, OR utilisés dans cette étude pour la réalisation de biocapteurs de type SAW ou microleviers. La liste de tous les LBP se trouve également dans les annexes A.

2.3.3.a OBP

Les OBP sont des protéines de transport de molécules odorantes ayant des affinités avec celles-ci [36]. Les différents OBP, sur lesquels cette étude porte, ont été exprimés par des techniques simples et connues déjà décrites dans la littérature.

Les OBP utilisés pour ces travaux proviennent d'insectes et de mammifères. Certains OBP sont dit « sauvages » car ils proviennent de la souche sauvage de l'animal et d'autres sont dits « mutants » car ils ont été modifiés de façon à être plus spécifiques à certains composés [37, 38]. En effet, grâce à la multitude d'informations disponibles sur les structures des OBP dans les PDB (Protein Data Bank) [39] et grâce aux simulations faites par logiciel d'ingénierie génétique, on peut moduler leur structure pour obtenir une spécificité de liaison et une affinité accrue envers différentes molécules. Le design d'OBP mutant avec des caractéristiques distinctes est donc possible en rendant cet OBP spécifique à une molécule ou à une famille de molécules chimiques spécifiques [40, 41]. Certains OBP possèdent le tag 6his pour permettre une immobilisation via ce tag.

Basé sur ces approches, il a été possible par exemple de concevoir un OBP mutant plus sensible au DMMP [42].

La liste des OBP utilisés dans cette étude est résumée dans le Tableau 2.6 ci-dessous. Le choix de travailler avec ces OBP et de les immobiliser sur nos transducteurs en diamant a été motivé par le fait que ces OBP ont été caractérisés (structures et propriétés de liaison) par l'équipe de l'université de Manchester.

Tableau 2.6 - Liste des OBP utilisés dans cette étude

Nom	Type (mammifère ou insecte)	Mutant (oui / non)	Tag 6his (oui / non)	Lieu de fabrication
wtOBPpig	porc	non	non	Université de Manchester
wt6hisOBP pig	porc	non	oui	GTP
m6hisOBP pig	porc	oui (spécifique au DNT)	oui	GTP
P.domin OBP	guêpe (Polistes dominulus)	non	non	Université de Manchester
6hisOBP-1Pd	guêpe (Polistes dominulus)	non	oui	GTP
Amel OBP14	abeille (Apis Mellifera)	non	non	Université de Manchester
Agam4	moustique (Anopheles gambiae)	non	non	Université de Manchester
Agam47	moustique (Anopheles gambiae)	non	non	Université de Manchester

L'OBP de porc est l'OBP le plus caractérisé dans la littérature [43, 44, 45, 46]. Il se lie avec un grand nombre de ligands avec de bonne affinité [47]. Les meilleurs ligands pour l'OBP de porc montrent des K_D de l'ordre du 0,1-1 µM et incluent les dérivés hétérocycliques [48] tels que les pyrazines et les thiazoles, les terpénoïdes tels que le menthol et les alcools et les aldéhydes de taille aliphatiques moyennes [49]. Les molécules présentant de faibles affinités avec l'OBP de porc sont souvent des composés polaires ou des acides gras à courtes chaines. Les liaisons entre l'OBP de porc et l'odorant sont basées sur les liaisons de Van der Walls.

Plusieurs études montrent que les OBP se lient avec une grande affinité à des ligands ayant des masses molaires et des propriétés physico-chimiques similaires aux composés explosifs [50]. Une étude récente prouve même la capacité des OBP de porc à se lier à des composés explosifs tels que le diméthylphthalate, le dinitrotoluène, résorcinol et diphénylamine [51].

De façon à rendre l'OBP de porc plus sensible aux composés explosifs, une mutation a été faite pour obtenir un OBP mutant spécifique aux explosifs. L'OBP de porc sauvage et non muté ne contient qu'un seul résidu tryptophane en position 16. Pour l'OBP mutant, un résidu phénylalanine en position 88 a été remplacé par un tryptophane pour ainsi avoir deux tryptophanes dans la structure de l'OBP : un, assez loin de la poche de liaison et un autre, au centre de la cavité de liaison.

Le tableau 2.7 montre l'affinité de différents composés explosifs envers l'OBP de porc mutant. Les valeurs de constante de dissociation et les IC_{50} sont donc indiqués ci-dessous. On constate que l'OBP mutant de porc (m6hisOBP pig) est plus sensible au 2,4-DNT, comme attendu, en comparaison avec tous les autres composés.

Tableau 2.7 - Valeurs des K_D et IC_{50} de différents explosifs pour l'OBP mutant de porc

Composés	IC_{50} µM	Constante de dissociation K_D (µM)
1-aminoanthracene		0,66
2-amino-4,6-dinitrotoluène	1,92	4,76
4-amino-2,6-dinitrotoluène	2,14	5,31
1,3-dinitrobenzène	1,66	4,12
2,4-dinitrotoluène	0,9	1,06
2,6-dinitrotoluène	1,69	4,2
nitrobenzène	1,81	4,49
3-nitrotoluène	1,45	3,59
4-nitrotoluène	1,13	2,81
1,3,5-trinitrobenzène	1,6	3,97

L'OBP P.domin a été extrait de la guêpe Polistes dominulus et a une masse d'environ 15 kDalton (kDa) [52]. Cet OBP est exprimé dans les antennes, les ailes et les pattes des guêpes femelles et mâles [41].

Cet OBP a déjà été caractérisé par l'équipe de Pelosi, notamment sa structure et ses caractéristiques de liaisons avec certains ligands [53]. En utilisant la sonde fluorescente N-phenyl-1-naphthylamine (1-NPN), quelques affinités envers certains ligands ont pu être déterminées pour l'OBP P.domin. Ces données sont reportées dans le tableau 2.8 ci-dessous.

Tableau 2.8 - Constantes de dissociations de quelques composés envers l'OBP P.domin

Composés	Constante de dissociation K_D (µM)
Acide perlagonique	11
Acide myristique	7,1
Acide oléique	0,71
Dodécanol	0,29
Tétradécanol	2,8
Octadecanol	11
Acide laurique	7,9
Acide stéarique	2,8
Méthyl laurate	0,89

On remarque que dans le cas de l'OBP du P.domin, les longues chaines aliphatiques font de bons ligands avec de fortes affinités et que les différences entre constantes de dissociation sont importantes ; ce qui implique que cet OBP montre d'importantes spécificités envers certains ligands. Dans ce tableau, le dodécanol et l'acide oléique sont les deux ligands montrant une meilleure affinité pour l'OBP P.domin.

La capacité de l'OBP d'abeille Amel14 à détecter des molécules odorantes provenant de composés explosifs ou de drogues a déjà été prouvée et étudiée [41,54]. Les meilleurs ligands pour cet OBP sont le 2-methoxy-4-allylphenol et le 2-methyl-3-phenylprop-2-enal avec des constantes de dissociation d'environ 90 nM.

Pour rappel, en mesurant les interactions OBP/ligand, on a défini qu'une bonne affinité envers un ligand est mesurée par une constante d'affinité (Ka) comprise entre 1 μM^{-1} to 0.1 μM^{-1} ce qui équivaut à une constante de dissociation comprise entre 1 µM et 10 µM.

En utilisant ces critères, l'équipe de l'université de Manchester a pu résumer les sélectivités des OBP envers certains analytes comme présentés dans le Tableau 2.9. Les compositions et informations diverses sur les différents composés explosifs et drogues testés au cours de cette étude sont détaillées en annexes B.

Les Figure 2.29 et Figure 2.30 ci-dessous montrent les affinités de plusieurs OBP envers des composés explosifs et de drogues. Pour information, le MDMA est le composé 3,4-méthylène-dioxy-methamphétamine (ecstasy) et le THC est le Δ-9-tétrahydrocannabinol qui est la molécule la plus connue dans le cannabis. Les OBP suivants :, OBP Agam 5, OBP Agam 19, OBP Agam 21, ne sont pas arrivés suffisamment tôt dans l'étude afin de pouvoir être traité en même temps que les autres. Les OBP Agam proviennent tous du moustique, le L Mig OBP provient une sauterelle Locusta migratoria. Le 6hisGOBP2 et le 6hisPBP1 proviennent du Bombyx mori. Le 6hisPBP1 est une protéine qui se lie fortement aux phéromones (PBP pour Pheromone Binding Protein).

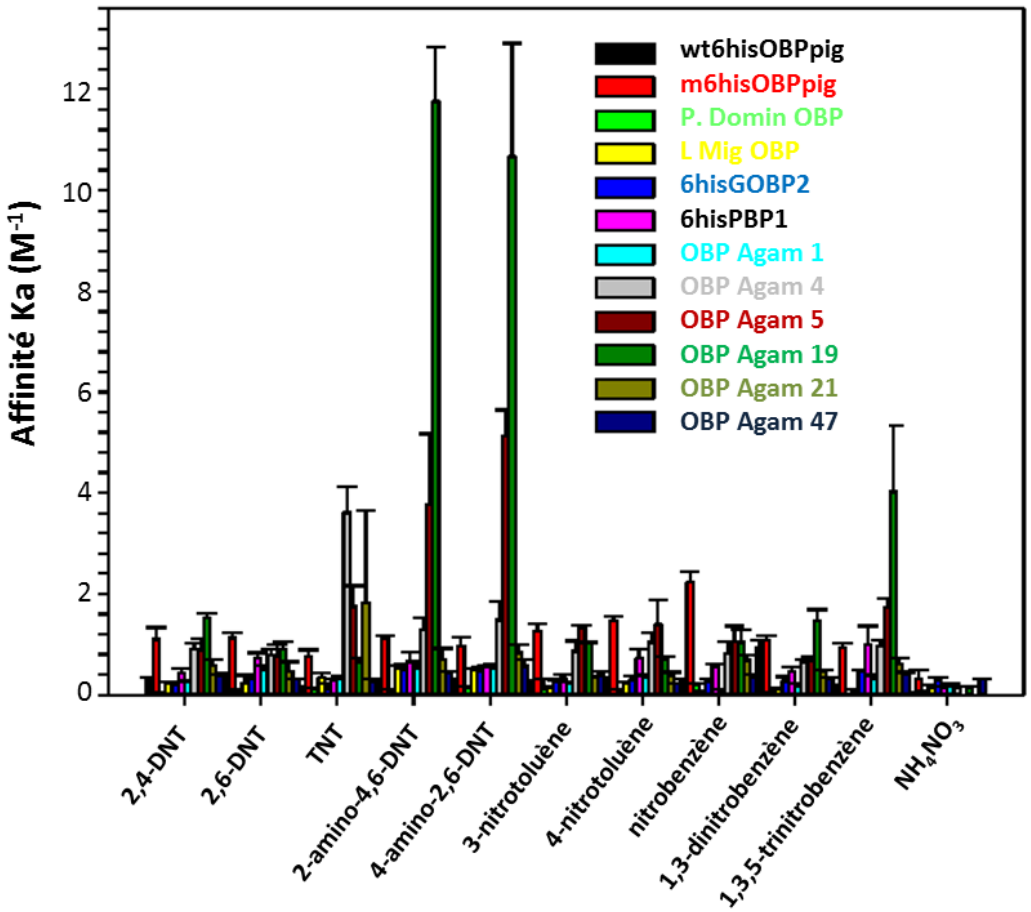


Figure 2.29 - Affinités de différents OBP envers plusieurs composés explosifs

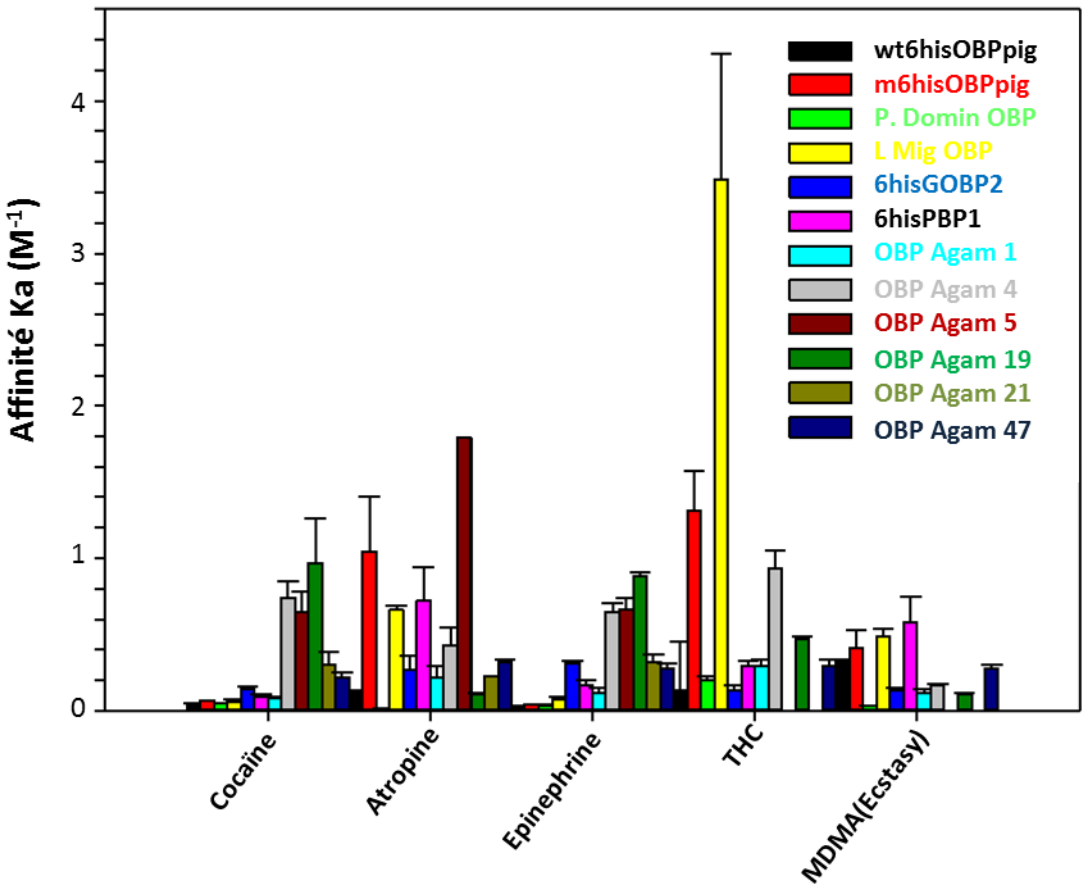


Figure 2.30 - Affinités de différents OBP envers plusieurs drogues

Tableau 2.9 - Résumé des sélectivités des OBP envers certains composés (explosifs et drogues). Les meilleures affinités envers un composé en particulier sont en vert (gras italiques).

Protéines	Détection d'explosifs	Détection de drogues				
		Atropine	Cocaïne	Epinéphrine	THC	MDMA
wt6hisOBP pig	OUI sauf pour NH_4NO_3	OUI	NON	NON	***OUI***	OUI
m6hisOBP pig	***OUI***	OUI	NON	NON	***OUI***	OUI
P.Domin OBP	NON	NON	NON	NON	NON	NON
Agam4	***OUI***	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
Agam 47	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI

Comme constaté dans les figures et tableaux précédents, les OBP provenant de moustiques (Agam) paraissent très affins aux composés explosifs et aux drogues. Ainsi observé, Agam 5, Agam 21 et Agam 4 semblent montrer le plus d'affinité avec le TNT. L'Agam 4 a une affinité d'environ 4 M^{-1} avec le TNT. L'Agam 19 et l'OBP de porc mutant (m6hisOBP pig) ont plus d'affinités avec le 2,4-DNT comparé aux autres OBP.

En effet, le m6hisOBP pig a une affinité d'environ 1,4 M^{-1} pour le 2,4-DNT alors que l'Agam 4 présente une affinité d' 1 M^{-1}, le rMUP a une affinité 2 fois plus faible et les autres OBP tels le wtOBPpig ou encore le P.domin ont une affinité 3 à 4 fois plus faibles que celle-ci. Le m6hisOBP pig, avec une affinité de 1,6 M^{-1}, est l'OBP utilisé dans notre étude qui présente le plus d'affinité avec le composé 4-NT suivi de l'Agam 19 et de l'Agam 4 (K_a=1,1 M^{-1}).

Les OBP Agam semblent largement plus affins à la cocaïne et à l'éphédrine. Pour le cas des drogues THC, le m6hisOBP pig semble avoir le plus d'affinités avec ces composés illicites avec une constante d'affinité d'environ d' 1 M^{-1}. Le wt6hisOBP pig (OBP sauvage de porc) se montre plus sensible au MDMA que les OBP Agam. L'OBP P.domin (guêpe) reste insensible à la majorité des composés explosifs et des drogues. Des études, menées par l'université de Manchester, ont montré que la constante d'association du m6hisOBP pig envers l'IBMP est d'environ 4,6 M^{-1} et que la Ka du P.domin OBP est de 0,25 M^{-1}.

2.3.3.b MUP

Comme vu dans le chapitre 1, les MUP de souris ont la capacité à se lier à de spécifiques molécules organiques dans leur poche de liaison hydrophobique [55, 56, 57]. Les MUP jouent un rôle important dans le transport des phéromones dans le règne animal en les capturant puis en les relarguant lentement dans l'air. En considérant cette principale fonction et leurs caractéristiques biochimiques, les MUP peuvent être facilement employés pour des applications de biocapteurs. L'affinité des MUP envers plusieurs familles de composés chimiques a déjà été testée [58].

La liste des MUP fournis par l'université de Padova est résumée dans le Tableau 2.10.

Tableau 2.10 - Liste des MUP utilisés dans cette étude

Nom	Type (mammifère ou insecte)	Mutant (oui / non)	Tag 6his (oui / non)	Lieu de fabrication
rMUP	souris	non	non	Université de Padova
6his-MUP3		oui	oui	GTP
6his-MUP20		oui	oui	Université de Padova
6his-MUP20-Y103R		oui	oui	Université de Padova
6his-MUP20-Y103D		oui	oui	Université de Padova
6his-MUP20-L88Q		oui	oui	Université de Padova
6his-MUP20-L124V		oui	oui	Université de Padova

Les acides aminés de la poche de liaison impliqués dans le processus de liaison avec les ligands ont été intensivement décrits et comparés pour tenter d'améliorer l'affinité des MUP envers certains composés. En se basant sur des publications, les acides aminés jouant un rôle privilégié dans l'affinité des ligands ont été identifiés et plusieurs mutants de rMUP ont été créés en modifiant la séquence d'acides aminés de la poche de liaison des MUP. Ces modifications joueront surement un rôle dans la capacité des MUP à se lier à différents ligands. Le tableau 2.11 et 2.12 ci-dessous montrent les différences des séquences aminées entre rMUP, MUP3 et MUP20.

Tableau 2.11 - Différences des séquences aminés impliquées dans le processus de liaison de MUP3 et MUP20 par rapport à celles de rMUP (en rouge). Les différences sont notées de couleur bleue

Position *(alignement des ammino-acides)*	**45**	**62**	**64**	**78**	**106**	**108**	**127**	**142**	**144**
rMUP	T	F	L	L	V	Y	A	G	Y
MUP3	S	M	A	F	M	Y	I	E	Y
MUP20	T	M	V	L	V	Y	I	E	Y

Tableau 2.12 - Autres différences de séquences aminées (situés en bout de chaine) de MUP3 et MUP20 par rapport à celles de rMUP (en rouge gras italiques). Les différences sont notées de couleur bleue et en gras.

rMUP	***ASDKREKIEDNG***
MUP3	ASD**E**REKIE**EH**G
MUP20	A**T**DKREKIE**EH**G

Des études de compétition par liaison, menées à l'université de Padova, ont montré que le MUP20 était plus sensible à plusieurs composés. Plusieurs mutants de ce MUP 20 ont été réalisés. Dans le Tableau 2.13 et le Tableau 2.14, les constantes de dissociation de rMUP et des quatre mutants MUP 20 envers plusieurs ligands, dont certains composés explosifs, sont représentées.

Tableau 2.13 - Constantes de dissociation K_D de rMUP envers plusieurs ligands

Composés	IC_{50} µM	Constante de dissociation K_D (µM)
2-amino-4,6-dinitrotoluène	1,6	1,22
4-amino-2,6-dinitrotoluène	1,65	1,33
1,3-dinitrobenzène	1,9	1,41
2,4-dinitrotoluène	1,6	1,18
2,6-dinitrotoluène	1,65	1,22
3-nitrotoluène	1,35	1
4-nitrotoluène	2	1,48
1,3,5-trinitrobenzène	1,8	1,33

Tableau 2.14 - Constantes de dissociation K_D des quatre mutants MUP20 envers plusieurs ligands

Ligand	MUP20L88Q	MUP20L124V	MUP20Y103D	MUP20Y103R
	Kd (µM)			
2-amino-4,6-dinitrotoluène	2.49	0.54	2.55	6.41
4-amino-2,6-dinitrotoluène	2.78	0.60	2.73	7.06
1,3-dinitrobenzène	2.30	0.73	1.75	7.22
2,4-dinitrotoluène	2.79	0.60	4.51	4.66
2,6-dinitrotoluène	4.11	0.76	4.37	7.04
3-nitrotoluène	9.20	1.21	3.71	15.53
4-nitrotoluène	2.05	1.07	1.78	10.29
1,3,5-trinitrobenzène	21.52	1.80	2.04	7.22
L-adrénaline	11.66	1.29	3.17	7.22
ménadione	1.27	0.06	0.75	1.37
1-NPN	2.07	0.22	1.58	4.39

Comme constaté dans les figures et tableaux précédents, le MUP20 semble plus affin au 2,4-DNT et au 4-NT comparé au rMUP. Cependant il présente une moins bonne affinité (0,76 M^{-1}) à ces composés en comparaison avec le m6hisOBP pig (1,4 M^{-1}). Le MUP mutant MUPL124V parait le plus affin à ces 2 composés comparés aux autres mutants MUP20 L88Q, MUP20 Y103D et MUP20 Y103R. Le MUP20 Y103R est le MUP présente les affinités les plus faibles avec la plupart des composés.

2.3.3.c OR

Les récepteurs olfactifs proviennent de souris et ont été fournis par l'équipe NOeMI à l'INRA à Jouy en Josas [59].

La liste des OR utilisés dans cette étude est indiquée dans le Tableau 2.15 ci-dessous.

Tableau 2.15 - Liste des OR utilisés dans cette étude

Nom	Tag 6his (oui / non)	Lieu de fabrication
cmyc OR1740	non	INRA (Jouy en Josas)
cmyc OR7D4	non	
M71	oui	

D'après plusieurs publications précédentes et des résultats obtenus en SPR, on peut souligner le fait que l'OR M71 se lie fortement à l'acétophénone et qu'un contrôle négatif de l'OR M71 est le 2-octanone. [34, 35, 60, 61]

Le cmyc OR1740 se lie fortement à l'hélional et très peu à la vanilline. Le cmyc OR7D4 se lie fortement à l'androsténone [34, 62, 63].

Ces différents composés sont illustrés dans la Figure 2.31 suivante.

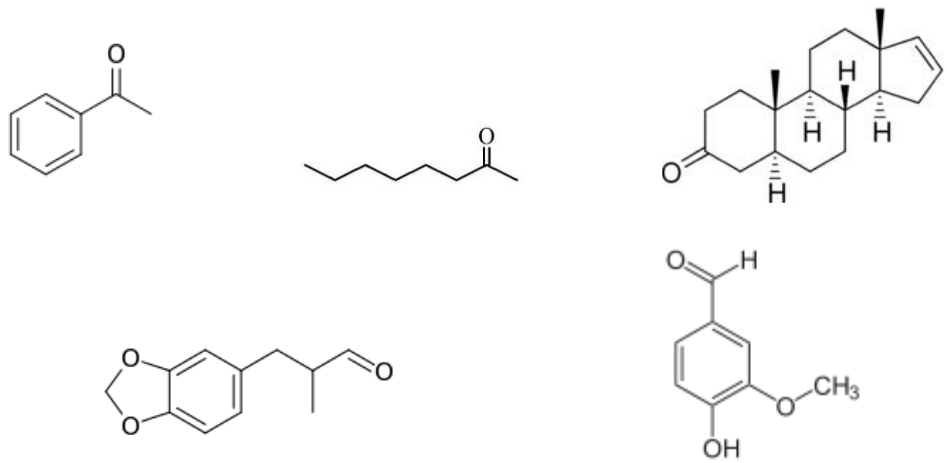


Figure 2.31 - Structure de l'acétophénone, 2-octanone, androsténone, hélional, vanilline.

2.3.4 Caractérisation des greffages

Chaque greffage et chaque immobilisation ont été caractérisés par diverses techniques, et notamment par XPS, MEB, Spectroscopie de fluorescence, AFM, et par mesures électrochimiques.

2.3.4.a Présentation du dispositif d'analyse XPS

L'analyse XPS permet de déterminer la composition atomique de la surface des échantillons analysés sur une profondeur de quelques couches atomiques. Les analyses sont effectuées sous ultravide à 10^{-10} Torr. Un échantillon est irradié par une source monochromatique de photons X qui émettent des électrons par effet photoélectrique. L'énergie cinétique des photoélectrons induits est mesurée et permet de remonter à l'énergie de liaison initiale de l'atome sondé. Cela permet d'obtenir la composition atomique de la surface, sur une profondeur d'environ 10 nm. Des analyses quantitatives peuvent être également extraites des spectres XPS normalisés en se basant sur l'intégrale des pics. Les analyses XPS ont été réalisées à l'aide d'une anode Al Kα monochromatique (1486,6 eV) et la calibration est faite sur le pic de l'Au $4f_{7/2}$ localisé à 84,0 eV. La résolution de l'instrument est d'environ 0,6 eV. La détection limite de notre XPS est estimé à 0.5 at. %.

Les analyses XPS n'ont pas été effectuées directement sur les SAW ou microleviers en diamant car ces derniers sont de dimensions trop petites pour être ciblés de manière précise par le faisceau d'électrons. Pour éviter une perte quantitative d'une partie du signal lors de l'analyse, les analyses XPS sont donc réalisées sur substrat silicium 1x1cm² sur lequel aura été déposé une couche de diamant de 500 nm.

2.3.4.b Principe du microscope électronique à balayage

Dans le but de visualiser l'immobilisation des protéines OBP sur une surface diamant fonctionnalisé, une première caractérisation par imagerie MEB (microscopie électronique à balayage) Supra 40 Zeiss a été réalisée. L'imagerie MEB permet d'obtenir des images très contrastées, ce qui pourrait ainsi différencier une zone greffée par des OBP d'une zone non greffée.

Le principe du MEB consiste à balayer la surface d'un échantillon par un faisceau très fin d'électrons focalises. Des interactions interviennent entre les électrons incidents et l'échantillon. Les électrons secondaires ou rétrodiffusés issus de ces interactions sont amplifiés, puis détectés et convertis en un signal électrique. A chaque point d'interactions, le rendement en électrons secondaires et donc l'intensité du signal électrique dépend de la nature de l'´échantillon et de sa topographie.

Le MEB se compose d'un canon à électrons (FEG, Field Emission Gun) permettant de générer les électrons par effet thermoélectrique en chauffant à haute température un filament en tungstène ou par effet de champ à partir d'une pointe métallique très acérée. Des lentilles magnétiques permettent ensuite de focaliser le faisceau d'électrons émis. Enfin, un système de balayage constitué de bobines de déflexion permet de balayer l'ensemble de la surface de l'échantillon.

2.3.4.c Spectroscopie de fluorescence

L'immobilisation des protéines OBP fluorescentes a été caractérisée par imagerie de fluorescence. Les images de fluorescence ont été prises selon: λexc = 550 nm et λem = 570 nm à l'aide d'un microscope NIKON Eclipse CV100 intégré d'une caméra Axio Cam MRc.

2.3.4.d Le microscope AFM

Un microscope à force atomique AFM (pour atomic force microscope) a été utilisé dans cette étude pour vérifier l'immobilisation des OBP sur diamant et pour estimer la rugosité de la surface après immobilisation d'OBP.

L'AFM possède une sonde locale (pointe) qui permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Il est basé sur le principe suivant : les forces atomiques entre la surface et la pointe sont mesurées pour obtenir une image de la topographie de la surface. Quand la pointe se rapproche de la surface, l'amplitude des oscillations de la pointe, qui est déterminée par la déviation d'un faisceau laser focalisé sur la pointe, est modifiée par les forces atomiques pouvant être de différentes natures (Van der Waals, électrostatique, etc.). Une boucle de rétrocontrôle permet de maintenir constante l'amplitude des oscillations entre la pointe et la surface, les variations de hauteur permettent de déterminer la topographie de la surface. Les images AFM sont été prises grâce au Molecular Imaging PicoLE AFM en mode non-contact avec une fréquence de résonance comprise entre 50 et 400 kHz. La rugosité moyenne (RMS) de la surface est systématiquement estimée à partir des images AFM.

2.3.4.e Caractérisations électrochimiques

Les caractérisations électrochimiques ont permis dans cette étude de caractériser et comparer le recouvrement des LBP immobilisés sur la surface de diamant selon plusieurs paramètres tels que le temps d'immobilisation, le type de LBP utilisé, la méthode de greffage (1 ou 2) utilisée, etc.

Dans cette partie, l'électrode en diamant dopée au bore a été utilisée dans le but de caractériser et de suivre le greffage des OBP sur une surface diamant. Cette caractérisation électrochimique a été réalisée par EIS au potentiel de repos.

L'EIS est une méthode très efficace pour analyser la réponse impédancemétrique d'un système électrochimique. Cette technique est très sensible aux phénomènes de surface [64]. Le système électrochimique est représenté par un circuit équivalent. Le circuit équivalent du montage de l'électrode en diamant de synthèses, utilisé dans tout au long de cette étude, est le circuit de Randles. Un graphique de Nyquist correspondant est schématisé sur la Figure 2.32 ci-dessous.

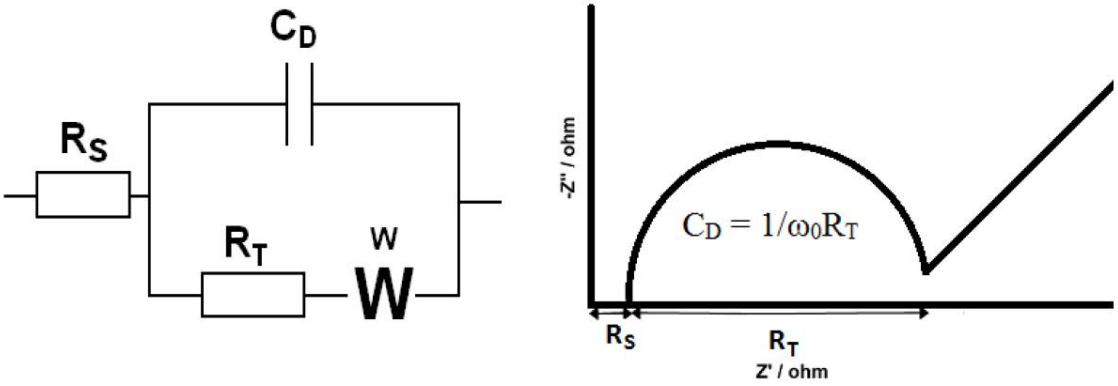


Figure 2.32 - Circuit équivalent de Randles (à gauche); Graphique de Nyquist qui décrit l'impédance d'une cellule électrochimique (à droite) [65]

Où R_S est la résistance série du système
RT est la résistance de transfert de charge
CD est la capacitance du matériau
W est lié à la diffusion des espèces, nommé Warburg

Le graphique de l'impédance d'une réaction redox est obtenu à l'aide de mesures effectuées par un potentiostat et un analyseur d'impédance. Il permet la mesure de la résistance de transfert de la réaction, de la capacité de double couche interfaciale et de la résistance d'électrolyte. Lorsque ce tracé est effectué pour une surtension nulle, il est possible de déterminer la densité de courant d'échange. Dans notre cas, la mesure d'impédance est toujours effectuée autour du potentiel de repos.

Aussi la mesure impédancemétrique permet de suivre l'évolution de la réactivité électrochimique de la surface du diamant électro-actif pendant l'immobilisation d'espèces organiques, comme par exemple l'immobilisation de LBP sur diamant comme c'est le cas dans notre étude. Cette mesure est estimée grâce à l'indicateur : constante de vitesse de transfert de charges, noté k_0 et de dimension cm^{-1}. Cet indicateur, intègre dans son calcul à la fois la résistance de transfert de charges et la surface active des électrodes. On estime que la réactivité d'une électrode mesurée à l'aide d'un couple électrochimique rapide (exemple le complexe $Fe(CN)_6^{3-/4-}$) est satisfaisante si la valeur de k_0 se trouve être supérieure à 10^{-3} cm/s. Le k_0 est calculé à l'aide de l'équation (2.1) suivante :

$$k_0 = \left(\frac{RT}{nF}\right)\frac{1}{nSFR_TC_0} \tag{2.1}$$

où k_0 est la constante de vitesse de transfert de charges

R est la constante des gaz parfaits, égale à environ 8,31 $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$

T est la température en kelvin (K)

F est la constante de Faraday, égale à 96 485 $C \cdot mol^{-1}$ (= 1 Farad)

n est le nombre d'électrons transférés

S est l'aire de la surface de l'électrode (cm^2)

R_t est la résistance de transfert de l'électrode (Ω)

C_0 est la concentration du couple rédox (mol.cm-3)

Les valeurs de k_0 seront utilisées pour comparer les différentes immobilisations de couches de LBP sur des surfaces d'électrodes en diamant fonctionnalisées.

La cellule électrochimique utilisée lors de la caractérisation par impédance dans notre étude est constituée de 3 électrodes : l'électrode de travail est le diamant dopé, le platine est la contre électrode, et l'électrode de pseudo-référence en platine. L'eau DI a été utilisée pour préparer toutes les solutions. L'électrolyte utilisé est composé dans tous les cas par une solution équimolaire de ferro-ferricyanure de potassium III/II ($K_3Fe(CN)_6$ et $K_4Fe(CN)_6$) à la concentration de 10^{-3} M. Le sel de fond employé est le chlorure de potassium (KCl) à la concentration de 0,5 M.

Chaque électrode a été préalablement rincée à l'eau DI et séchée sous flux d'argon avant chaque expérience. Le protocole opératoire employé pour l'étude des différents échantillons de diamant dopé au bore a été le suivant :

1) Mesure de Rt par EIS du matériau « as grown » afin de mesurer la réactivité initiale du matériau. Plusieurs mesures successives peuvent être effectuées afin d'évaluer la reproductibilité et la bonne qualité du diamant dopé. (Mesure de k_0)

2) Mesure de Rt par EIS afin de comparer la réponse de l'électrode avant et après chaque greffage et immobilisation. Trois mesures successives sont effectuées afin d'évaluer la reproductibilité de la réponse de l'électrode ou pour mettre en évidence une évolution de la réactivité de l'électrode en cours de mesure.

Le graphique ci-dessous (Figure 2.33) représente à titre d'exemple l'impédance d'une électrode en diamant dopé au bore fraichement sortie du réacteur, avec une teneur minimum en bore de 10^{21} at.B.cm^{-3}.

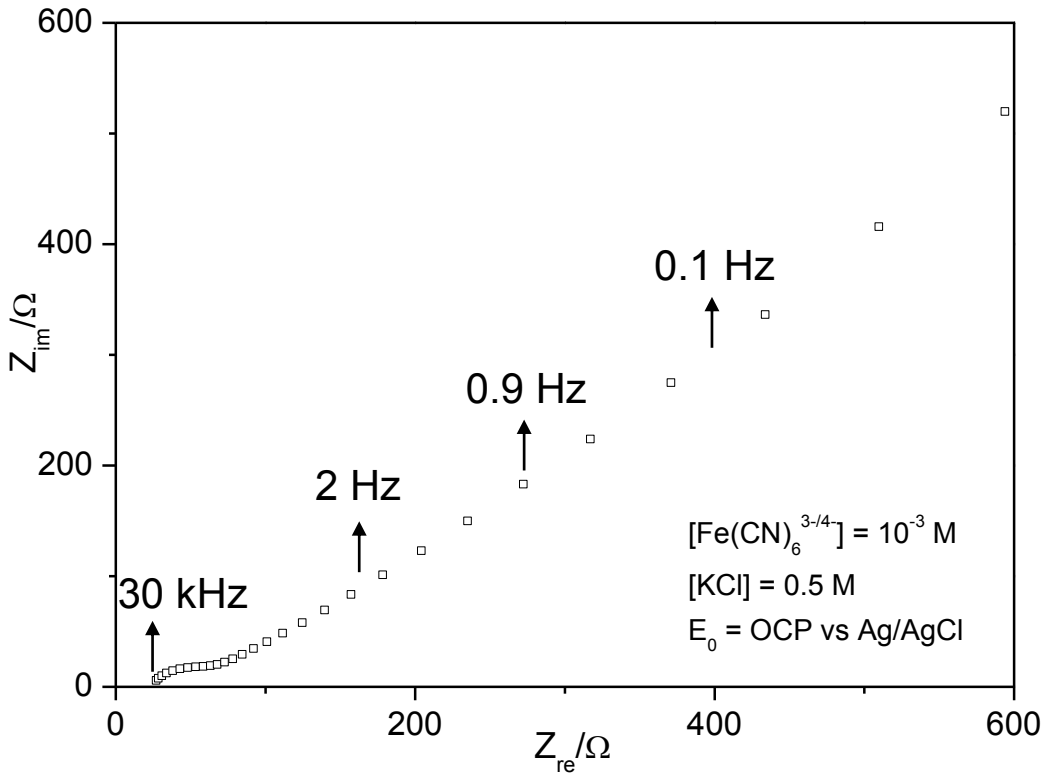


Figure 2.33 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode en diamant dopé au bore fraichement sortie du réacteur (hydrogénée)

En résumé, la résistante de transfert (Rt) a été déterminée expérimentalement avant et après chaque étape de greffage et d'immobilisation. Cette technique a donc été utilisée pour caractériser le recouvrement des LBP immobilisés sur la surface de diamant.

2.4 Caractérisations des dispositifs utilisés en milieu liquide et gazeux

2.4.1 Dispositifs de caractérisation des propriétés de résonance des poutres en diamant en milieu liquide

2.4.1.a Description de l'équipement de mesure par effet Doppler laser

Les mesures des propriétés de résonance de nos microstructures en diamant sont effectuées par vibrométrie laser. Pour cela, nous disposons d'un vibromètre commercial de la société PolytecTM. Cet équipement est composé d'une source laser émettant entre 620 nm et 690 nm, d'un interféromètre à fibre optique (OFV534), d'un démodulateur OFV5000 (Polytec GmbH) et d'un analyseur de réseau. Il permet de mesurer avec une très bonne précision les oscillations d'une microstructure mécanique en exploitant l'effet Doppler. Ce dispositif permet de mesurer des amplitudes d'oscillation comprises entre quelques dizaines de pm et quelques µm sur une gamme de fréquence comprise entre 100 Hz et 20 MHz. Pour toutes les séries de mesures, les microleviers ont été mis en vibration par l'intermédiaire d'une cellule piézo-électrique externe sur laquelle ils ont été fixés.

Le principe de mesure de ce type d'équipement est décrit dans la Figure 2.34 ci-dessous [9].

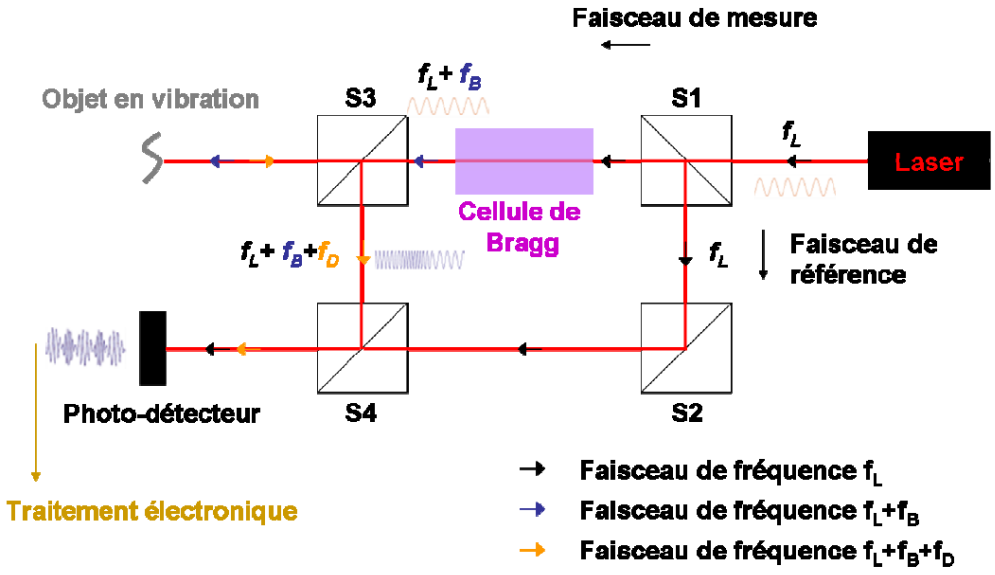


Figure 2.34 - Principe de mesure de fréquences de résonance par effet Doppler laser

Une source laser émet un faisceau de fréquence f_L qui est divisé en deux rayons d'intérêt sur une première lame séparatrice (S1). Un des deux faisceaux (F1) est directement envoyé sur le photodétecteur, par l'intermédiaire des lames séparatrices (F2) et (F4) pour servir de faisceau de référence à fréquence fixe f_L. Le deuxième faisceau passe à travers un interféromètre de Bragg pour y subir un décalage en fréquence fixe f_B par rapport à la fréquence de référence f_L. Ce faisceau, de fréquence f_L+f_B est ensuite envoyé sur l'objet en vibration où il y subit une rétrodiffusion. Par effet Doppler, la fréquence de la lumière rétrodiffusée varie au rythme des vibrations de la structure. Le décalage en fréquence Doppler d'un rayon rétrodiffusé est proportionnel à la vitesse du point de l'objet en vibration ciblé par le faisceau laser à un instant donné. Une partie du faisceau rétrodiffusé de fréquence $f_L+f_B+f_D$ retourne vers le système de lames séparatrices où il interfère avec le faisceau de référence après avoir franchi la lame séparatrice (S4). L'intensité de la lumière résultante est lumineuse est détectée par un photodétecteur.

Les mesures de fréquence de résonance sont effectuées sur un analyseur de réseau qui génère un signal excitateur pour la mise en vibration des micro-poutres. Le signal excitateur ainsi que le signal démodulé variant au rythme des oscillations des micro-poutres sont collectés sur les deux voies d'entrées de l'analyseur de réseau. Le balayage en fréquence excitatrice permet ainsi d'extraire la réponse fréquentielle des micro-poutres. Une photo de l'équipement de mesure est présentée sur la Figure 2.35 ci-dessous.

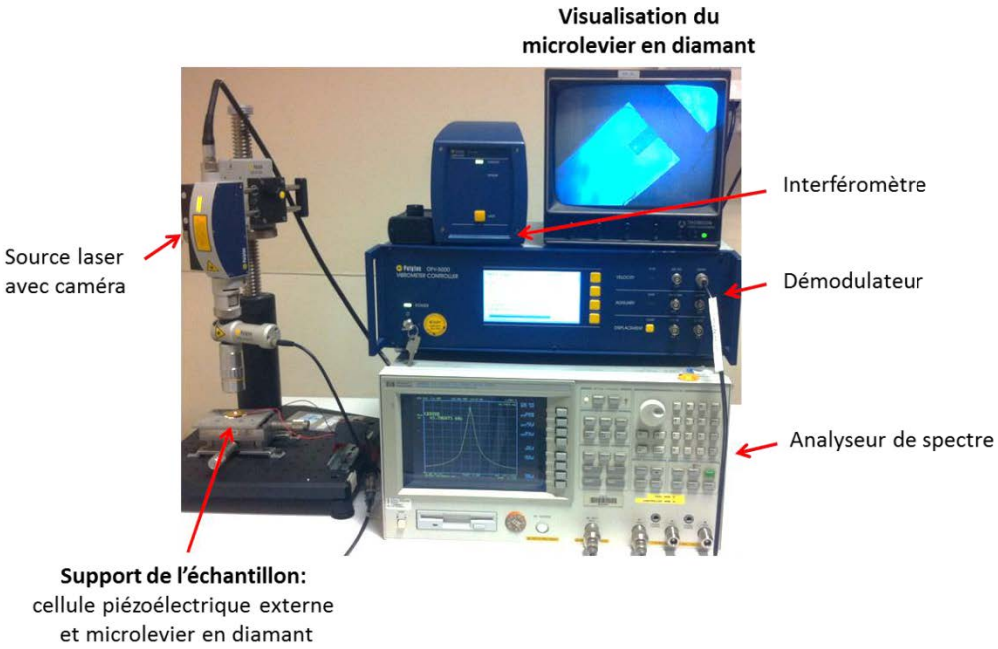


Figure 2.35 - Photographie de l'équipement de mesure de vibration par effet Doppler laser

2.4.1.b Protocoles d'expérimentation en milieu liquide

Pour pouvoir travailler en milieu liquide, une cellule étanche est fabriquée et collée sur la cellule piézoélectrique comme présenté sur la Figure 2.36 ci-dessous. Elle peut contenir une solution liquide de volume constant de 200 µL. Une poutre est fixée sur la cellule piézoélectrique.

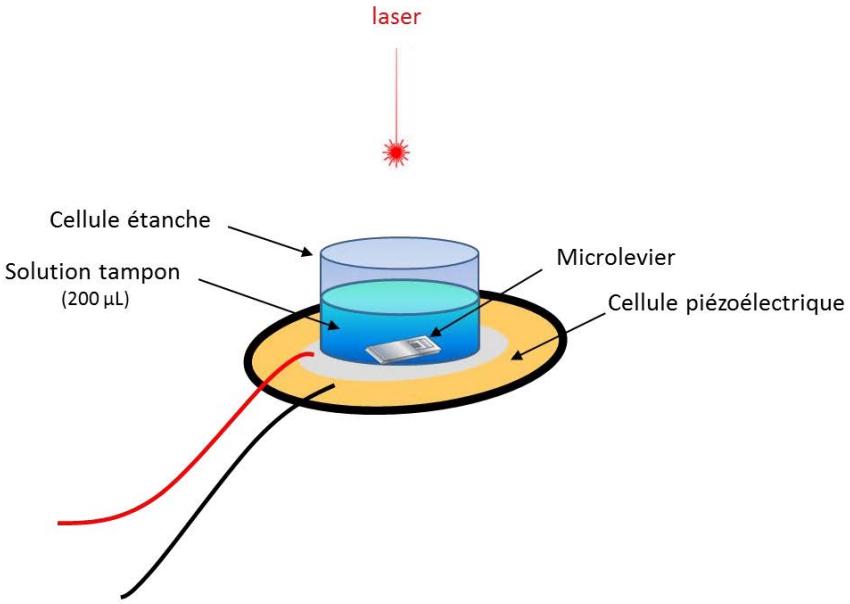


Figure 2.36 - Schéma de la cellule de mesure

Une mesure de la fréquence de résonance des poutres est effectuée dans l'air. Puis, un suivi de la fréquence de résonance des poutres est effectué dans une solution de tampon phosphate ou PBS selon la méthode 1 ou 2 de greffage utilisée ; dépourvue de tout composé de fonctionnalisation. Cette étape reste nécessaire pour stabiliser la fréquence de résonance des poutres lorsque ces dernières passent de l'air à un milieu aqueux et ionique, pour permettre une stabilisation en température. Après stabilisation de la fréquence de résonance, deux rinçages de la cellule liquide sont effectués successivement avec la même solution de tampon. Entre chaque rinçage, la fréquence de résonance est mesurée sur une durée d'au moins dix minutes afin de s'assurer de sa bonne stabilité. La solution de tampon de rinçage est, par la suite, remplacée par la solution de greffage pour l'étape de fonctionnalisation. Sa préparation a déjà été décrite dans la section 2.3.2. Une agitation doit être effectuée pour assurer une concentration homogène pendant les mesures. Ceci n'affecte pas les mesures étant donné que les cinétiques de greffage ou d'immobilisation sont de l'ordre de quelques minutes.

Durant cette étape, l'évolution de la fréquence de résonance est suivie jusqu'à sa stabilisation puis la cellule liquide est à nouveau rincée plusieurs fois par la solution de tampon de rinçage. Une mesure de fréquence de résonance est effectuée toutes les 20 secondes. Toute évolution de fréquence de résonance peut être suivie en temps réel grâce à un logiciel de mesure de fréquences intégré. A nouveau, entre chaque rinçage, la fréquence de résonance est suivie sur une durée d'au moins dix minutes afin de s'assurer de sa stabilité et c'est ainsi pour chaque étape de suivi de greffage, d'immobilisation ou de détection de composés en milieu liquide.

La Figure 2.37 ci-dessous résume ce protocole d'expérimentation.

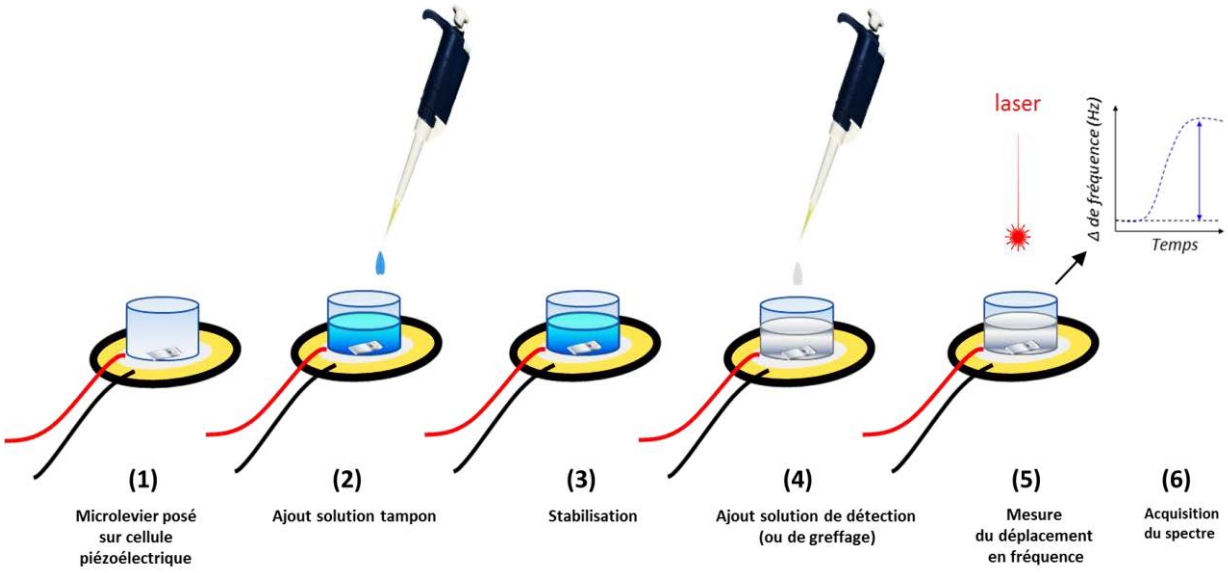


Figure 2.37 - Schéma représentant les étapes du protocole d'expérimentation en milieu liquide

2.4.2 Dispositifs de caractérisation des biocapteurs SAW et microleviers en diamant en milieu gaz

2.4.2.a Instrumentations de mesure pour transducteurs SAW

Présentation du dispositif SAGAS utilisé

Le dispositif utilisé pour la caractérisation des transducteurs SAW recouvert de diamant est l'instrument SAGAS fourni par le KIT. Le système (Figure 2.38) intègre la fluidique qui permet d'amener les vapeurs sur les 8 capteurs, mais également l'électronique capable de traiter les signaux renvoyés par les capteurs. Grâce à un logiciel (Kangaroo v3.3), la réponse des huit capteurs peut être enregistrée en fonction

du temps. Ce logiciel intègre des algorithmes de traitements de données tels l'analyse neuronale SNNS (Stuttgart Neural Network Simulator [66]). Le logiciel permet d'effectuer une reconnaissance en temps réel à partir de bases de données d'apprentissage enregistrées au préalable.

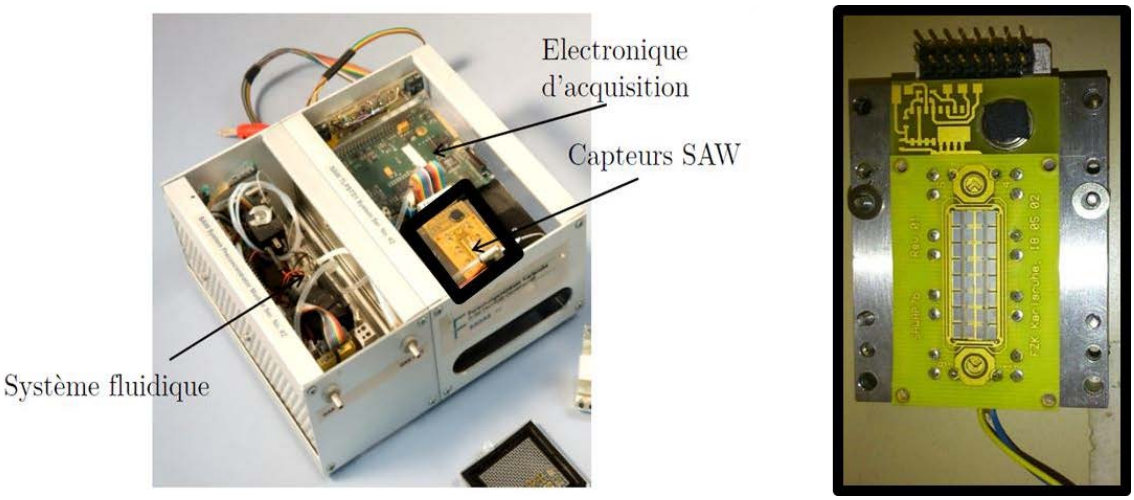


Figure 2.38 - Boitier SAGAS fourni par le KIT ; les 8 capteurs SAW intégrés dans le système SAGAS

Les spectres de déplacement en fréquence des transducteurs SAW sont obtenus grâce à un analyseur de réseau. Un spectre peut donc être acquis après chaque fonctionnalisation du SAW. Ainsi l'évolution des spectres de fréquence avant et après immobilisation de protéines, par exemple, peut être suivie en direct et apporter des informations importantes. De ce fait, la densité de surface des immobilisations d'OBP sur SAW en diamant après greffage peut être calculée (voir chapitre 4).

Le déplacement en fréquence est proportionnel à la densité de surface de protéine (m/A) sur le SAW selon l'équation (2.2) suivante :

$$\Delta f = (k_1 + k_2) f_0^2 \frac{m}{A} \qquad (2.2)$$

Où f_0 est la fréquence de résonance fondamentale
k_1 et k_2 les constantes matérielles du substrat piézoélectrique
(ici le quartz, donc k_1= -8.7*10^{-8} et k_2= and -3.9*10^{-8})
Δf est le déplacement en fréquence
m la masse déposée sur le SAW
A la surface active du SAW

2.4.2.b Présentation du dispositif Sniffer développé au cours de l'étude

Un prototype de détection a été élaboré par différents partenaires du projet Sniffer (Université de Manchester, l'ESIEE et CEA). Il a été utilisé pour cette thèse à l'occasion de tests de détection proches du terrain avec un large panel d'explosifs et de drogues. Ce prototype de mesure complet a été développé pour une interface de capteurs microleviers. Il a été développé de façon à pouvoir travailler avec la cellule de mesure gaz pour microleviers (Figure 2.17). Malheureusement, cette cellule n'a été que très peu utilisée étant donné que son emploi dépendait de l'avancement du dispositif électronique reliée à celle-ci et développé par d'autres collaborateurs. Ainsi, cette cellule n'a été intégrée que tardivement au dispositif Sniffer développé au cours de cette étude. Quelques mesures de détection en milieu gazeux avec des microleviers ont pu cependant être réalisées avant la fin de cette thèse. Néanmoins, le boitier SAGAS contenant les transducteurs SAW a pu être intégré plus rapidement au dispositif Sniffer pour obtenir des réponses de détection qui sont présentés dans le chapitre 4. Ce module de détection comprenant donc les capteurs, une interface électronique qui permet le pilotage de l'équipement et l'acquisition des données, et enfin une algorithme de traitement de ces données faisant appel à une approche multiparamétrique.

Le système de détection ci-dessus est couplé à des outils de collecte d'échantillons, c'est-à-dire d'un préconcentrateur de vapeurs et d'un échantillonneur de particules solides, Le préconcentrateur a été développé par EPFL (le laboratoire Sensors, Actuators and Microsystems Laboratory (SAMLAB) de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne) et Armines (centre SPIN de l'Ecole des Mines de St-Etienne (EMSE)). L'échantillonneur de particules solides quant à lui a été développé par Airbus.

Les fonctions basiques de l'échantillonneur de particules solides sont de collecter et de séparer les composés solides (particules de drogues ou d'explosifs) à détecter des autres éléments présents (polluants par exemple). L'étape 1 de l'échantillonneur, la précipitation électrostatique des particules sur une plaque chauffante et l'étape 2, la désorption thermique et la génération de vapeur, sont résumées dans la Figure 2.39. Les particules vertes étant les particules cibles à détecter et les particules rouges étant les polluants.

Le principe de fonctionnement de l'étape 1 peut être décomposé en trois phases qui sont : l'ionisation de l'air par effet couronne et la charge des particules présent dans l'air par interaction avec les ions créés, la précipitation des espèces chargées par action d'un champ électrique et le nettoyage des surfaces de collecte. Après l'étape de précipitation, les particules collectées sont converties en phase gazeuse grâce à une désorption thermique pour faciliter la détection.

Dans ce cas, l'électrode de collecte est chauffée à l'aide d'une résistance en appliquant un potentiel électrique à 160°C pendant 5 secondes.

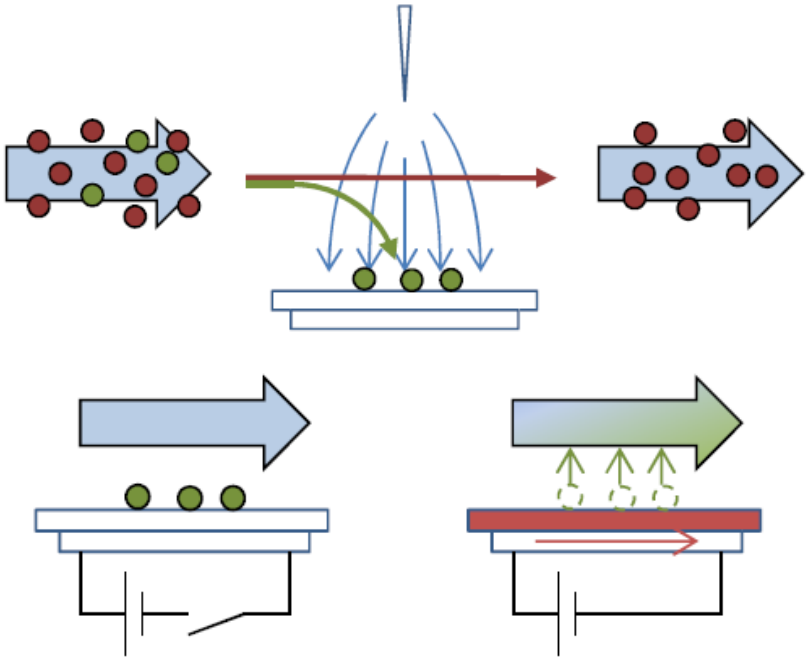


Figure 2.39 - Principe des étapes 1 et 2 du sampler

Lors de ces travaux la décharge corona n'a pas été utilisée. Le dispositif a été utilisé pour déposer des quantités connues de drogues ou d'explosifs solides dissous en solution sur la plaque chauffante comme illustré Figure 2.41 afin de pouvoir vaporiser ces espèces et les envoyer vers les capteurs pour pouvoir les caractériser.

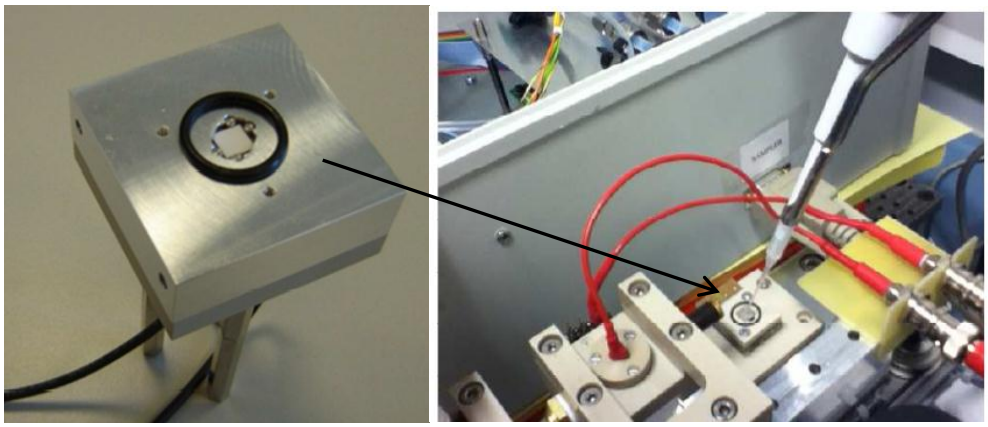


Figure 2.40 - Plateforme contenant l'électrode à chauffer (à gauche), Déposition du composé à détecter sur l'électrode (à droite)

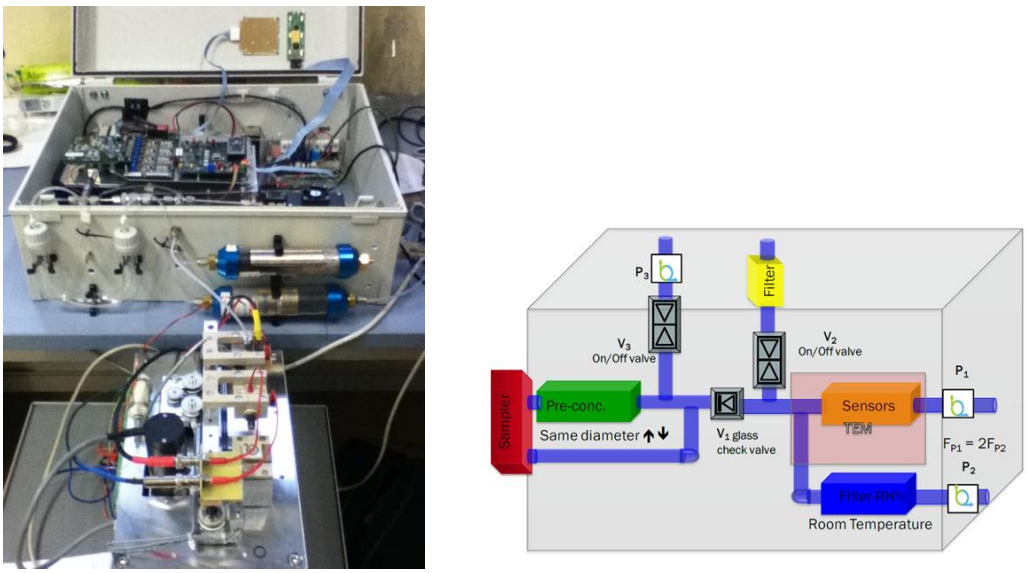


Figure 2.41 - Photographie du sampler (en bas) relié à l'équipement électronique de mesure de détection (en haut) (à gauche); Schéma du système de mesure complet (à droite)

La Figure 2.42 présente le dispositif Sniffer complet. Comme on peut le voir dans l'architecture du système de mesure, un filtre de charbon actif est intégré dans ce prototype ainsi qu'un filtre d'humidité qui permet de contrôler l'humidité dans l'enceinte des capteurs avec un taux d'humidité compris entre 0 et 100%. La température est gardée constante en utilisant un module thermoélectrique.

2.4.2.c Méthodes de génération de vapeurs de composés volatils et méthodes de validation des concentrations de vapeurs générées

Les différentes méthodes de génération de vapeurs de composés volatils utilisées dans cette étude sont décrites dans cette section.

Le banc gaz, se trouvant au LCD, est présenté dans la Figure 2.44. Il comporte 3 lignes indépendantes pour bouteilles de gaz, une ligne de référence azote sec ou humide (généré via un bulleur intégré), et une ligne raccordée à un four (dans lequel sont placés les tubes à perméation). Les composés sont dilués dans le diazote sec, et le débit total est de 200 mL/min. Les débitmètres massiques sont des MKS 1479A de débit maximal de 500 mL/min. Le pilotage des vannes et des débitmètres s'effectue grâce à un programme Labview.

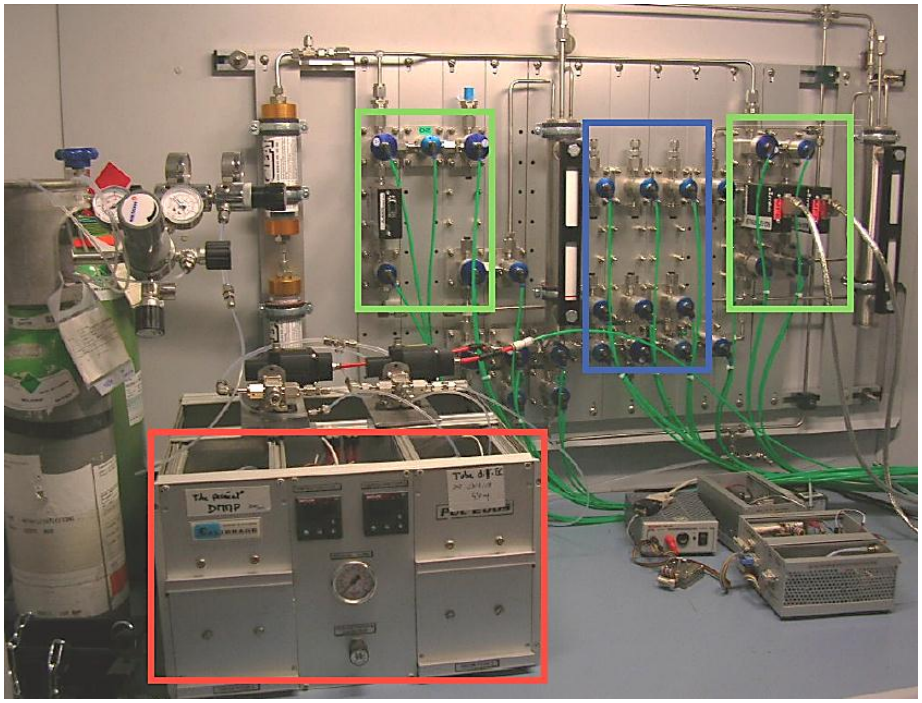


Figure 2.43 - Banc de dilution : lignes d'azote (vert), lignes de gaz (bleu), fours (rouge)

La génération par tubes à perméation repose sur les propriétés de perméabilité d'un matériau par rapport au gaz concerné. Typiquement, un gaz est comprimé au-dessus du point de liquéfaction dans un tube scellé, fabriqué à partir d'un matériau polymère. A une température donnée, les propriétés du polymère pour le produit concerné permettent de laisser échapper une quantité contrôlée de gaz. Pour nos travaux, la génération en tube à perméation a été effectuée à travers un tube en Téflon PFA. Un composé liquide est ainsi placé dans un tube à perméation scellé entre deux billes d'acier (Figure 2.45). Ce tube est ensuite placé dans le four du banc gaz. Le composé volatil libéré par le tube est alors entrainé par un gaz vecteur vers les capteurs. Cette méthode permet de contrôler la quantité de vapeur envoyé sur les capteurs.

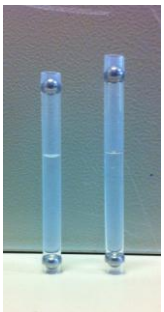


Figure 2.44 -Tubes à perméation contenant une solution d'IBMP

Une autre méthode plus simple et plus intuitive pour réaliser des expériences de détection est la méthode d'entrainement de vapeur par aspiration. Cette méthode est plus adaptée pour des mesures de terrain car elle nécessite peu d'équipement spécifique. Par exemple, une substance peut être contenue dans un tube ouvert. Les molécules odorantes volatiles de cette substance sont alors aspirées sur le dessus du tube. La vapeur de la couche limite présente à la surface du composé (dépendante de la pression de vapeur du liquide ou du solide) est amenée sur les capteurs par aspiration à l'aide d'une pompe.

On a eu l'opportunité par exemple d'utiliser la valise « LIDEEC » (lot d'instruction et de détection d'explosifs des équipes cynophiles) contenant des explosifs et drogues placés dans des tubes métalliques fermés par une grille. Ces tubes sont utilisés par les services de Gendarmerie pour l'entrainement des chiens renifleurs. Les compositions et informations diverses sur les différents composés explosifs et drogues testés au cours de cette étude sont détaillées en annexes B. Le tube présenté dans la Figure 2.45, contient, par exemple, une certaine quantité de composé illicite. Cette technique, contrairement à celles présentées précédemment (banc gaz, tubes à perméation), n'est pas quantitative mais juste qualitative. L'aspiration, dans ce cas, s'est effectuée avec un flux constant de 300 sscm. Les temps d'exposition sont d'environ une minute. Dans ce cas d'étude, aucun préconcentrateur ou chauffage externe n'a été utilisé pour améliorer le signal de détection obtenu.

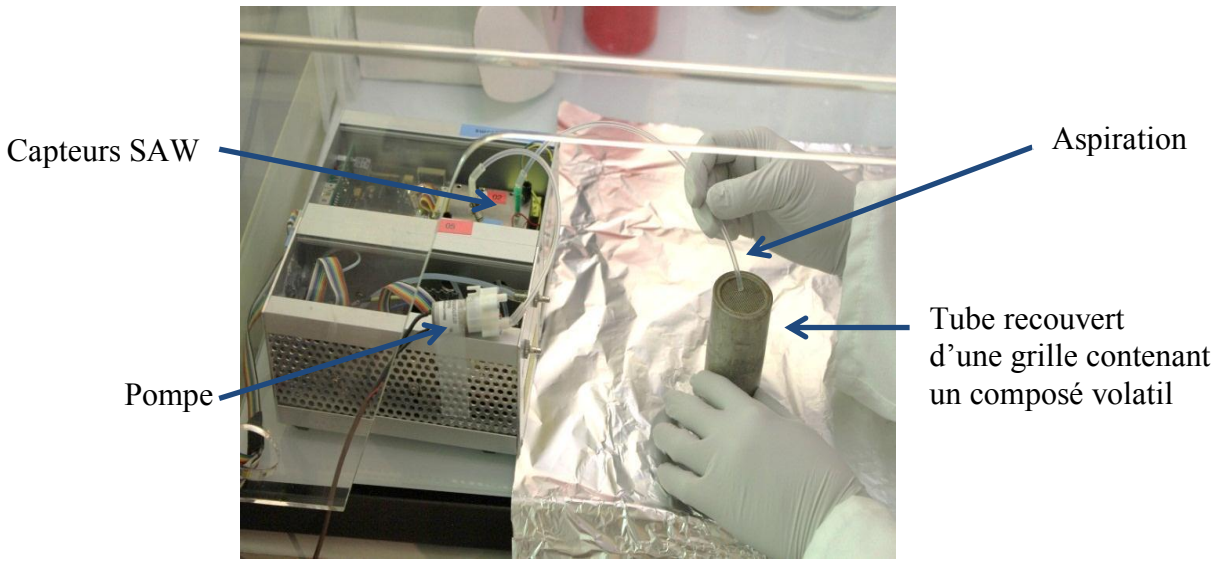


Figure 2.45 - Aspiration d'un composé explosif contenu dans un tube fermé par une grille

Il existe différentes façons pour connaitre la concentration de vapeurs générées envoyées vers les capteurs. Les différentes méthodes d'étalonnage et de validation des concentrations générées utilisées dans cette étude sont décrites à la fin de cette section.

Le suivi de masse permet l'étude des concentrations d'un gaz envoyé vers les capteurs. En utilisant la méthode de tubes à perméation, un contrôle de la concentration est réalisé en suivant la perte de masse des tubes due au gaz qui s'échappe chaque jour des tubes à perméation. En effet, la concentration de gaz généré est directement liée à la masse perdue par minute par l'équation (2.3).

$$C = \frac{\Delta m K}{\Delta t Q} \tag{2.3}$$

Où Δm est la perte de masse en nanogramme (ng) sur une durée Δt en minute,
Q est le débit en $mL.min^{-1}$
K est la constante des gaz en $L.g^{-1}$

Un exemple de suivi de masse par pesée est illustré sur le Tableau 2.16 pour le cas de l'IBMP contenu dans les tubes à perméation installés dans le four à une température de 100°C durant plusieurs semaines. Une pesée a été réalisée toutes les 24 heures.

Les mesures par pesée, prises dans les mêmes conditions sur plusieurs jours, montre après quelques jours de stabilisation une variation des valeurs de la concentration générée calculée inférieure à 10%, ce qui souligne la stabilité de cette méthode de génération.

Tableau 2.16 - Concentrations mesurées par pesée du composé IBMP

Perte de masse (mg)	Débit (mL/min)	Concentration générée (ppm)
25,66	200	12,23
21,13	200	10,17
18,09	200	8,51
16,72	200	7,9
16,54	200	7,84
16,02	200	7,56
15,94	200	7,52
12,24	200	5,89
8,06	200	3,83
4,67	200	2,25

Un Photo Ionization Detector (PID) peut aussi permettre de contrôler les concentrations d'un gaz. Dans un PID, le gaz est bombardé par des photons, ce qui permet d'arracher des électrons aux molécules du gaz. Le gaz est donc ionisé, et l'on récupère en sortie le courant électrique issu de l'ionisation. Cette technique permet de détecter des gaz depuis les ppb jusqu'aux ppm, mais ne cible que les composants ayant une énergie d'ionisation inférieure ou égale à l'énergie des photons émis par le détecteur (dans notre cas la lampe a une énergie de 10 eV). Le principe de fonctionnement du PID est indiqué dans la Figure 2.47 ci-dessous.

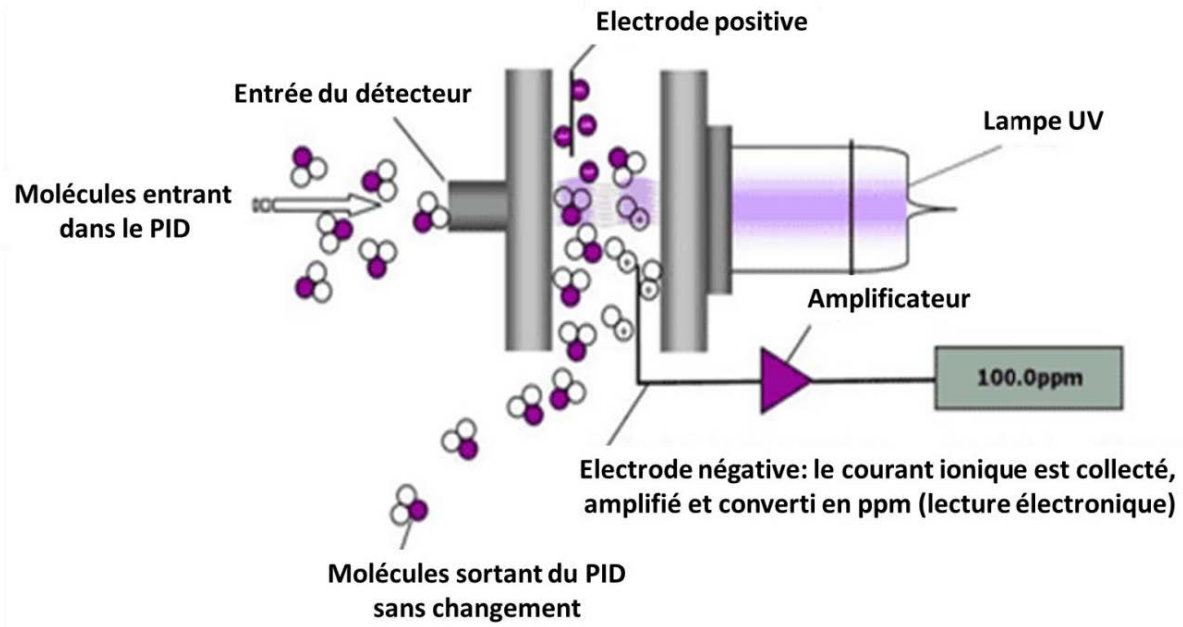


Figure 2.46 - Principe de fonctionnement du PID.

Le PID PhoCheck 2000+ (IonScience), Figure 2.47, utilisé dans cette étude, présente un temps de réponse à 90% inférieur à 1s, une gamme détection de 0,1 à 4000 ppm, et une précision de ± 5% sur le dernier chiffre affiché. Ce détecteur commercial permet de comparer les concentrations déterminées par le suivi de pesée des tubes à perméation. L'erreur est généralement inférieure à 10%. Il a permis de suivre et de contrôler les concentrations de vapeurs des composés à détecter par les capteurs SAW. Un exemple est illustré dans la Figure 2.48.

Figure 2.47 - PID PhoCheck 2000+ utilisé lors de l'étude

La Figure 2.48 présente, par exemple, l'écart entre les concentrations mesurées par pesée et la valeur lue au PID pour différentes concentrations de 4-nitrotoluène. L'erreur entre deux valeurs est systématiquement inférieure à 10%.

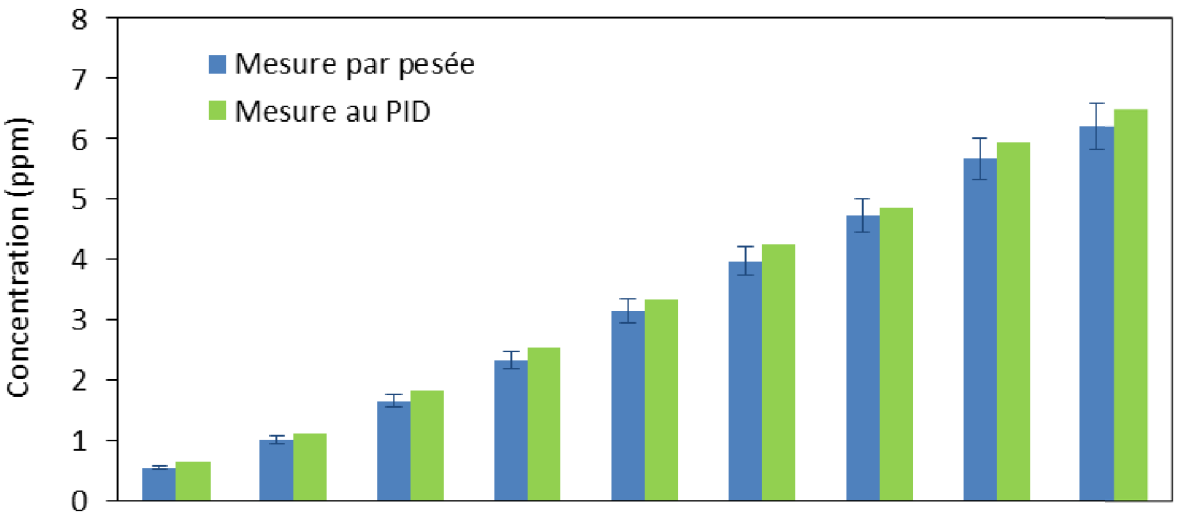


Figure 2.48 - Concentrations du composé 4-nitrotoluène mesurées par pesée (bleu) et par PID commercial (vert)

2.5 Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre, tous les protocoles d'expérimentations utilisés au cours de cette étude pour la caractérisation physico-chimique des transducteurs MEMS ; de la fabrication des transducteurs SAW et microleviers en diamant aux méthodes envisagées pour l'immobilisation de protéines LBP sur diamant préalablement fonctionnalisé par des terminaisons chimiques. La méthode 1 de greffage de l'acide aminocaproïque sur diamant est un choix de fonctionnalisation qui a été motivé par le fait que cette méthode avait déjà été validée précédemment par différentes études [9, 18, 17]. La méthode 2 est une technique particulièrement innovante de fonctionnalisation sur diamant, qui sera par la suite étudiée et comparée avec la méthode 1 notamment pour l'évaluation des performances des capteurs fonctionnalisés aux LBP. Ceci sera détaillé dans le chapitre 3 afin de valider les 2 méthodes de greffage par diverses techniques de caractérisations tout en les comparant pour privilégier une méthode par rapport à une autre. Le chapitre 3 détaillera les résultats de détection de différents composés organiques obtenus avec des microleviers en diamant fonctionnalisés par des protéines LBP en milieu liquide.

Bibliographie du chapitre 2

[1] Tard. B. (2013). Etudes des interactions gaz-surfaces diamant par gravimétrie sur résonateur à onde acoustique. Thèse. Université Pierre et Marie Curie.
[2] Vanhove, E., de Sanoit, J., Arnault, J. C., Saada, S., Mer, C., Mailley, P., Nesladek, M. (2007): Stability of H-terminated BDD electrodes: an insight into the influence of the surface preparation. Physica Status Solidi (a), 204(9), 2931–2939.
[3] Vanhove, E., de Sanoit, J., Mailley, P., Pinault, M., Jomard, F., & Bergonzo, P. (2009). High reactivity and stability of diamond electrodes: The influence of the B-doping concentration. Physica Status Solidi (a), 206(9), 2063–2069.
[4] Kiran, R., Rousseau, L., Lissorgues, G., Scorsone, E., Bongrain, A., Yvert, B., Bergonzo, P. (2012). Multichannel boron doped nanocrystalline diamond ultramicroelectrode arrays: design, fabrication and characterization. Sensors (Basel, Switzerland), 12(6), 7669–81.
[5] Y. Fu, J. Luo, X. Du, a.J. Flewitt, Y. Li, G. Markx, a.J. Walton, and W. Milne, (2010) "Recent developments on ZnO films for acoustic wave based bio-sensing and microfluidic applications : a review," Sensors and Actuators B : Chemical, vol. 143, pp. 606–619,.
[6] V. Tolstoy, I. Chernyshova, and V. Skryshevsky, (2003) Handbook of Infrared Spectroscopy of Ultrathin Films. Wiley-VCH.
[7] Chevallier, E., Scorsone, E., Girard, H. a., Pichot, V., Spitzer, D., & Bergonzo, P. (2010). Metalloporphyrin-functionalised diamond nano-particles as sensitive layer for nitroaromatic vapours detection at room-temperature. Sensors and Actuators B: Chemical, 151(1), 191–197.
[8] S. Saada, S. Pochet, L. Rocha, J. C. Arnault, and P. Bergonzo. (2009) : Real time investigation of diamond nucleation by laser scattering. Diamond and related materials, 18(5-8) :707–712.
[9] Bongrain. A. (2011). Nouvelles technologies de capteurs MEMS en diamant pour applications de transduction. Thèse. Université Paris Est.
[10] Bongrain, A., Scorsone, E., Rousseau, L., Lissorgues, G., Gesset, C., Saada, S., & Bergonzo, P. (2009). Selective nucleation in silicon moulds for diamond MEMS fabrication. Journal of Micromechanics and Microengineering, 19(7), 074015.
[11] Scorsone, E., Saada, S., Arnault, J. C., & Bergonzo, P. (2009). Enhanced control of diamond nanoparticle seeding using a polymer matrix. Journal of Applied Physics, 106(1), 014908.
[12] Tard, B., Trouvé, A., Scorsone, E., Voigt, A., Rapp, M., & Bergonzo, P. (2012). Warfare Gas Detection at Trace Level Using a Multiple SAW Sensor Approach Based on Functionalized Nanodiamond Coatings, 481–484.
[13] O. Shenderova, V. Zhirnov, and D. Brenner, (2006) "Carbon Nanostructures," Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences, vol. 27, pp. 227–356.
[14] Scorsone, E., Saada, S., Arnault, J. C., & Bergonzo, P. (2009). Enhanced control of diamond nanoparticle seeding using a polymer matrix. Journal of Applied Physics, 106(1), 014908.
[15] F. Bender, K. Länge, A. Voigt, and M. Rapp, (2004) "Improvement of surface acoustic wave gas and biosensor response characteristics using a capacitive coupling technique.," Analytical chemistry, vol. 76, pp. 3837–40.
[16] Agnès, C., Ruffinatto, S., Delbarre, E., Roget, A., Arnault, J.-C., Omnès, F., & Mailley, P. (2010). New one step functionalization of polycrystalline diamond films using amine derivatives. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 16, 012001.
[17] Ruffinato. S. (2012). Le diamant pour la bioélectronique : De la fonctionnalisation chimique à la modification physique par des nanotubes de carbone. Thèse. Université de Grenoble
[18] Bongrain, A., Agnès, C., Rousseau, L., Scorsone, E., Arnault, J.-C., Ruffinatto, S., Bergonzo, P. (2011). High sensitivity of diamond resonant microcantilevers for direct detection in liquids as probed by molecular electrostatic surface interactions. Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids, 27(19), 12226–34.

[19] Grabarek, Z. and Gergely, J. (1990). Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. Anal Biochem 185:131-5.
[20] http://www.piercenet.com/product/nhs-sulfo-nhs
[21] Fischer, M. J. E. (2010). Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach Source : Methods in molecular biology. Surface Plasmon Resonance. 627, 55 -73.
[22] Crowe, J. , Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stiiber, D., Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA Chromatography as a Superior Technique in Recombinant Protein Expression/Purification. Protocols for Gene Analysis. Methods in Molecular Biology. 31, 371-387
[23] Dumbrepatil, A. B., Lee, S.-G., Chung, S. J., Lee, M. G., Park, B. C., Kim, T. J., & Woo, E.-J. (2010). Development of a nanoparticle-based FRET sensor for ultrasensitive detection of phytoestrogen compounds. The Analyst, 135(11), 2879–86.
[24] Maly, J., Di Meo, C., De Francesco, M., Masci, A., Masojidek, J., Sugiura, M., Pilloton, R. (2004). Reversible immobilization of engineered molecules by Ni-NTA chelators. Bioelectrochemistry, 63(1), 271–275.
[25] Goldsmith, B. R., Mitala, J. J., Josue, J., Castro, A., Lerner, M. B., Bayburt, T. H., Johnson, a T. C. (2011). Biomimetic chemical sensors using nanoelectronic readout of olfactory receptor proteins. ACS Nano, 5(7), 5408–16.
[26] Blankespoor, R., Limoges, B., Schöllhorn, B., Syssa-Magalé, J.-L., & Yazidi, D. (2005). Dense monolayers of metal-chelating ligands covalently attached to carbon electrodes electrochemically and their useful application in affinity binding of histidine-tagged proteins. Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids, 21(8), 3362–75.
[27] Crowe, J., Steude B., Ribbe J. (1995). One-Step Purification of Recombinant Proteins with the 6xHis Tag and Ni-NTA Resin; Molecular biotechnology, 4 (3), 247 -258
[28] Lindeberg G1, Bennich H, Engström A. (1991 Sep) Purification of synthetic peptides. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Int J Pept Protein Res.;38(3):253-9.
[29] Porath, J. (n.d.). trends IMAC –(1994 Jun) Immobilized metal ion affinity based chromatographv, 7, 254–259.
[30] Lindgren GE. Immobilized metal affinity chromatography (IMAC). Am Biotechnol Lab. n;12(7):36.
[31] Hayden, C. C., Hwang, J. S., Abate, E. a, Kent, M. S., & Sasaki, D. Y. (2009). Directed formation of lipid membrane microdomains as high affinity sites for His-tagged proteins. Journal of the American Chemical Society, 131(25), 8728–9.
[32] http://biochimiedesproteines.espaceweb.usherbrooke.ca/5e1.html
[33] Singh, A., Patra, S., Lee, J.-A., Park, K. H., & Yang, H. (2011). An artificial enzyme-based assay: DNA detection using a peroxidase-like copper-creatinine complex. Biosensors & Bioelectronics, 26(12), 4798–803.
[34] Glatz, R., & Bailey-Hill, K. (2011). Mimicking nature's noses: from receptor deorphaning to olfactory biosensing. Progress in Neurobiology, 93(2), 270–96.
[35] Sankaran, S., Khot, L. R., & Panigrahi, S. (2012). Biology and applications of olfactory sensing system: A review. Sensors and Actuators B: Chemical, 171-172, 1–17.
[36] Pevsner, J., Sklar, P. B., & Snyder, S. H. (1986). Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 83(13), 4942–6.
[37] Marabotti, A., Scire, A., Staiano, M., Crescenzo, R., Aurilia, V., Tanfani, F., & Auria, S. D. (2008). Wild-Type and Mutant Bovine Odorant-Binding Proteins To Probe the Role of the Quaternary Structure Organization in the Protein Thermal Stability research articles, 5221–5229.
[38] Gromiha, M. M., Harini, K., Sowdhamini, R., & Fukui, K. (2012). Relationship between amino acid properties and functional parameters in olfactory receptors and discrimination of mutants with enhanced specificity. BMC Bioinformatics, 13(Suppl 7), S1.
[39] http://www.wwpdb.org/
[40] Di Pietrantonio, F., Cannatà, D., Benetti, M., Verona, E., Varriale, a, Staiano, M., & D'Auria, S. (2013). Detection of odorant molecules via surface acoustic wave biosensor array based on odorant-binding proteins. Biosensors & Bioelectronics, 41, 328–34.

[41] Tegoni, M., Campanacci, V., & Cambillau, C. (2004). Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. Trends in Biochemical Sciences, 29(5), 257–64.
[42] Bonnot, K., Cuesta-Soto, F., Rodrigo, M., Varriale, A., Sanchez, N., D'Auria, S., Lopez-Royo, F. (2014). Biophotonic ring resonator for ultrasensitive detection of DMMP as a simulant for organophosphorus agents. Analytical Chemistry, 86(10), 5125–30.
[43] Dal Monte, M., Andreini, I., Revoltella, R., & Pelosi, P. (1991). Purification and characterization of two odorant-binding proteins from nasal tissue of rabbit and pig. Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry, 99(2), 445–51.
[44] Vincent, F., Spinelli, S., Ramoni, R., Grolli, S., Pelosi, P., Cambillau, C., & Tegoni, M. (2000). Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes. Journal of Molecular Biology, 300(1), 127–39.
[45] Burova, T. V, Choiset, Y., Jankowski, C. K., & Haertlé, T. (1999). Conformational stability and binding properties of porcine odorant binding protein. Biochemistry, 38(45), 15043–51.
[46] Spinelli, S., Ramoni, R., Grolli, S., Bonicel, J., Cambillau, C., Tegoni, M., Taglio, V. (1998). The Structure of the Monomeric Porcine Odorant Binding Protein Sheds Light on the Domain Swapping Mechanism, 2960(98), 7913–7918.
[47] Vincent, F., Spinelli, S., Ramoni, R., Grolli, S., Pelosi, P., Cambillau, C., & Tegoni, M. (2000). Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes. Journal of Molecular Biology, 300(1), 127–39.
[48] Stepanenko, O., Fonin, A., Stepanenko, O., Kuznetsova, I., & Turoverov, K. (2012). Ligand-Binding Proteins : Structure , Stability and Practical Application.
[49] Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., Cambillau, C. (2000). Mammalian odorant binding proteins. Biochimica et Biophysica Acta, 1482(1-2), 229–40.
[50] Persaud, K. C. (2013). Biomimetic Olfactory Sensors, 12(11), 3108–3112.
[51] Pevsner, J., Hou, V., Snowman, A. M., Snowman, M., & Snyder, H. (1990). Odorant-binding Protein characterization of ligand binding. J. Biol. Chem. 1990, 265:6118-6125.
[52] Calvello M, Guerra N, Brandazza A, D'Ambrosio C, Scaloni A, et al. (2003) Soluble proteins of chemical communication in the social wasp Polistes dominulus. Cell Mol Life Sci 60: 1933–1943.
[53] Pelosi, P. (2001). The role of perireceptor events in vertebrate olfaction, Cellular and Molecular Life Sciences 58, 503–509.
[54] Lartigue, A., Gruez, A., Briand, L., Blon, F., Bezirard, V., Walsh, M., Pernollet, J. C., Tegoni, M., and Cambillau, C. (2004) Sulfur single-wavelength anomalous diffraction crystal structure of a pheromone-binding protein from the honeybee Apis mellifera L, J. Biol. Chem. 279, 4459-4464.
[55] Pes, D., & Pelosi, P. (1995). Odorant-binding proteins of the mouse. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology, 112(3), 471–9.
[56] Pertinhez, T. a, Ferrari, E., Casali, E., Patel, J. a, Spisni, A., & Smith, L. J. (2009). The binding cavity of mouse major urinary protein is optimised for a variety of ligand binding modes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 390(4), 1266–71.
[57] Novotny, M. V, Ma, W., Wiesler, D., & Zídek, L. (1999). Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein. Proceedings. Biological Sciences. The Royal Society, 266(1432), 2017–22.
[58] Ferrari, E., Lodi, T., Sorbi, R., Tirindelli, R., Cavaggioni, a, & Spisni, a. (1997). Expression of a lipocalin in Pichia pastoris: secretion, purification and binding activity of a recombinant mouse major urinary protein. FEBS Letters, 401(1), 73–77.
[59] Pajot-Augy, E. (2007). Nanobiosensors based on individual olfactory receptors, 2nd IEEE International Workshop on Advances in Sensors and Interface, 25–27.
[60] Li, J., Haddad, R., Chen, S., Santos, V., & Luetje, C. W. (2012). A broadly tuned mouse odorant receptor that detects nitrotoluenes. Journal of Neurochemistry, 121(6), 881–90.
[61] Bozza, T., Feinstein, P., Zheng, C. and Mombaerts, P. (2002) Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. J. Neurosci., 22, 3033–3043.
[62] Marchese, S., Pes, D., Scaloni, a, Carbone, V., & Pelosi, P. (1998). Lipocalins of boar salivary glands binding odours and pheromones. European Journal of Biochemistry, 252(3), 563–8.

[63] Vidic, J. M., Grosclaude, J., Persuy, M.-A., Aioun, J., Salesse, R., & Pajot-Augy, E. (2006). Quantitative assessment of olfactory receptors activity in immobilized nanosomes: a novel concept for bioelectronic nose. Lab on a Chip, 6(8), 1026–32.
[64] Souto, R. (1995) Data analysis in EIS: Case of diffusion-controlled adsorption of organic molecules. Bulletin of Electrochemistry. 11, (12), 578 -583
[65] Kiran. R (2012). Thèse. Electrodes en diamant pour la fabrication de microsystèmes électrochimiques pour applications biologiques. Université de Grenoble
[66] A. Zell, "Stuttgart Neural Network Simulator."

Chapitre 3

Caractérisations des greffages chimiques et détections de molécules organiques en milieu liquide

Sommaire

3.1 Introduction 125

3.2 Caractérisations des greffages chimiques 125

3.2.1 Caractérisation par imagerie MEB 125

3.2.2 Caractérisation par imagerie AFM 128

3.2.3 Caractérisation par spectroscopie de fluorescence 129

3.2.4 Caractérisation chimique par spectroscopie XPS 132

3.2.5 Caractérisation électrochimique par EIS 134

3.2.5.a Immobilisation d'OBP sur diamant fonctionnalisé 134

3.2.5.b Immobilisation de MUP sur diamant fonctionnalisé 138

3.2.5.c Cinétique d'immobilisation d'OBP 139

3.2.5.d Effet de l'imidazole et de l'EDTA sur l'immobilisation d'OBP 140

3.2.5.e Adsorption non spécifique d'OBP sur diamant 142

3.2.5.f Effet du pH sur l'immobilisation des OBP 144

3.2.5.g Immobilisation des OR sur diamant fonctionnalisé 145

3.2.6 Suivi des greffages sur microleviers par vibrométrie laser 147

3.2.6.a Greffage de l'acide aminocaproïque 147

3.2.6.b Couplage EDC/NHS 148

3.2.6.c Immobilisation d'OBP 150

3.2.6.d Immobilisation d'OBP à différentes concentrations 152

3.3 Détections de composés chimiques en milieu liquide 154

3.3.1 Détection de l'IBMP, du 2,4-DNT et du 4-NT 154

3.3.1.a Performances des capteurs 154

3.3.1.b Comparaison entre différents OBP et MUP 160

3.3.1.c Stabilité des capteurs au cours du temps 163

3.3.1.d Phénomène de dissociation 165

3.3.2 Détection de composés organiques grâce aux microleviers fonctionnalisés avec des OR 166

3.4 Conclusion 169

Bibliographie du chapitre 3 171

3.1 Introduction

Le chapitre 2 a présenté les différentes techniques d'immobilisation de protéines LBP sur surface diamant fonctionnalisé par la méthode 1 et 2. L'objectif de ce chapitre est de caractériser ces fonctionnalisations biochimiques.

La première partie de ce chapitre traite des 2 méthodes envisagées pour l'immobilisation de protéines LBP sur diamant préalablement fonctionnalisé par des terminaisons chimiques. La méthode 1 de greffage de l'acide aminocaproïque sur diamant suivi du couplage classique EDC/NHS est un choix de fonctionnalisation qui a été motivé par le fait que cette méthode avait déjà été validée par différentes études. La méthode 2 (NTA-Ni) est une technique innovante de fonctionnalisation sur diamant, qu'on essaiera de comparer avec la méthode 1. Cette partie permettra donc de valider les 2 méthodes de greffage par diverses techniques de caractérisation tout en les comparant afin de privilégier une méthode par rapport à l'autre.

La meilleure technique de greffage retenue sera utilisée pour immobiliser les LBP sur des transducteurs en diamant. La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à la caractérisation des capteurs ainsi réalisés. Elle détaillera les résultats de détection en milieu liquide de différents composés organiques tels que la détection de composés explosifs obtenus avec des microleviers en diamants fonctionnalisés de protéines LBP. Les performances de ces capteurs en termes de sensibilité, de limite de détection ou encore de temps de réponse seront étudiées.

3.2 Caractérisations des greffages chimiques

L'immobilisation des LBP sur surface diamant a été particulièrement caractérisée au cours de cette étude : aucun travail de recherche antérieur relatant l'immobilisation de LBP sur des transducteurs en diamant n'existait auparavant. Plusieurs techniques de caractérisation de surface ont été employées.

3.2.1 Caractérisation par imagerie MEB

Une solution aqueuse d'OBP de porc a été déposée sur une surface en diamant préléablement hydrogénée pour tenter d'évaluer qualitativement l'adsorption des OBP sur une surface diamant : après exposition à un plasma hydrogène (dans le réacteur THOR), un échantillon en diamant a été immergé dans une solution d'OBP de porc de concentration 1mg/mL pendant deux heures. L'échantillon a été, ensuite, rincé

vigoureusement à l'eau DI avant d'être séché sous flux d'azote sec. Le dépôt est, comme on peut le voir sur la Figure 3.1 ci-dessous, très hétérogène.

L'imagerie MEB revèle la présence de multiples taches sombres sur la surface de diamant attribuées très probablement à la présence d'agrégats de protéines OBP. La quantitié importante d'agrégats laisse suggérer une relativement grande affinité de l'OBP avec la surface.

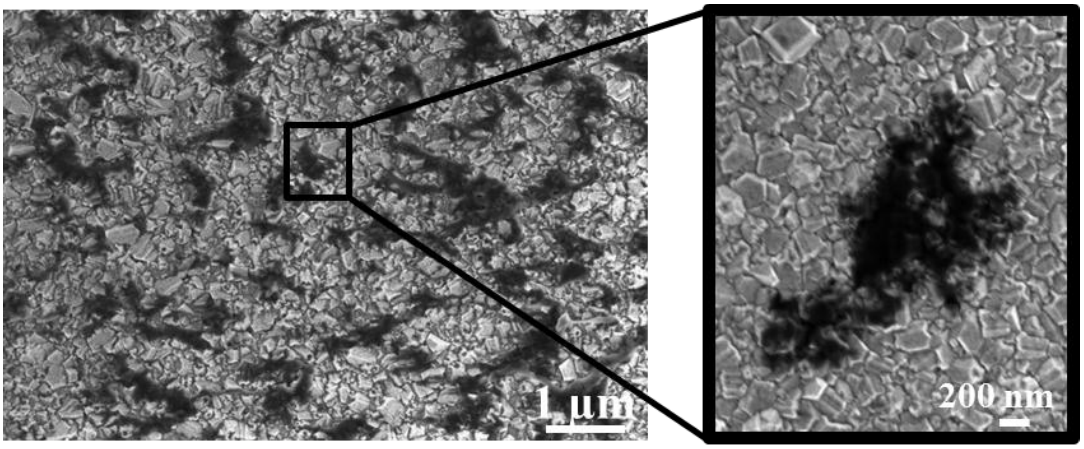


Figure 3.1 - Images MEB d'OBP adsorbés sur une surface en diamant exposant des agrégats d'OBP (zoom)

Le diamant hydrogéné possède une surface conductrice émettrice d'électrons secondaires qui présente un fort contraste de luminosité par imagerie MEB par rapport à des zones moins conductrices. Ici, aucune différence de contraste ne semble visible sur les zones sans agrégats par rapport à un film de diamant non exposé à la solution d'OBP, ce qui laisse suggérer que les OBP ne sont présents sur la surface diamant hydrogéné que sous forme d'agrégats.

La Figure 3.2 présente un substrat diamant hydrogéné, préléablement hydrogéné et fonctionnalisé en utilisant la méthode 1, consistant à greffer l'acide aminocaproïque suivi du couplage classique EDC/NHS. Le film de diamant apparait, cette fois-ci, beaucoup plus sombre (Figure 3.2) laissant suggérer l'immobilisation d'une couche organique relativement homogène en épaisseur sur la surface. On observe, par ailleurs, une diminution conséquente du nombre d'agrégats d'OBP sur la surface en diamant fonctionnalisé.

La variation de contraste est mise en évidence en rayant mécaniquement la surface à l'aide d'une pointe métallique : une démarcation nette permet de visualiser la surface contenant encore des OBP et celle n'en contenant quasiment plus.

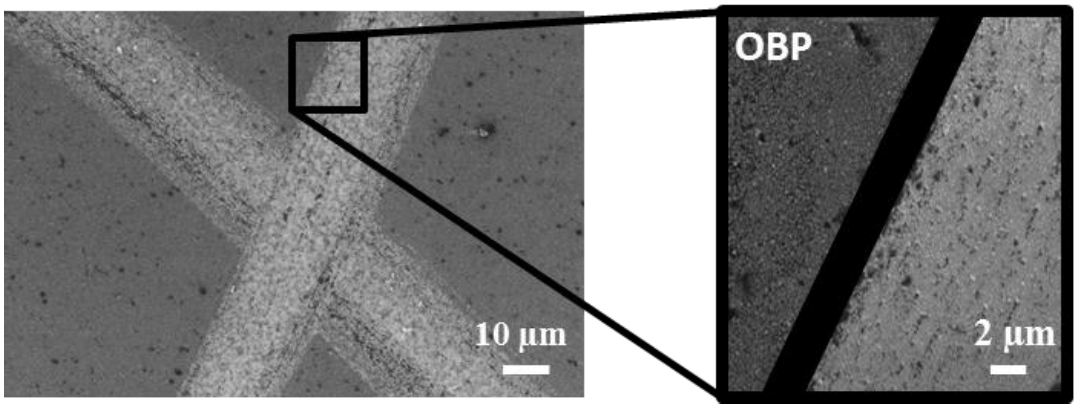


Figure 3.2 - Images MEB d'immobilisation d'OBP sur une surface en diamant fonctionnalisé par la méthode 1 dont le centre a été rayé à l'aide d'une pointe métallique (zoom)

En oxydant la surface en diamant avant greffage de l'acide aminocaproïque puis en immobilisant des OBP, on remarque sur la Figure 3.3 qu'un contraste important est observé entre la zone préalablement oxydée et la zone préalablement hydrogénée, ce qui vient confirmer les résultats précédents. La zone oxydée est une surface de contrôle où l'acide aminocaproïque ne peut pas se greffer selon la méthode 1. Il en résulte que l'OBP n'est pas greffé non plus (surface claire), contrairement à la zone hydrogénée qui apparait plus sombre. Aussi, sur la zone oxydée, on trouve moins d'agrégats d'OBP qu'observés précédemment (Figure 3.1). Deux explications sont possibles ici : soit que la plupart des OBP sont greffés sur la zone hydrogénée, soit l'affinité de l'OBP avec le diamant oxydé est moins importante que pour le diamant hydrogéné.

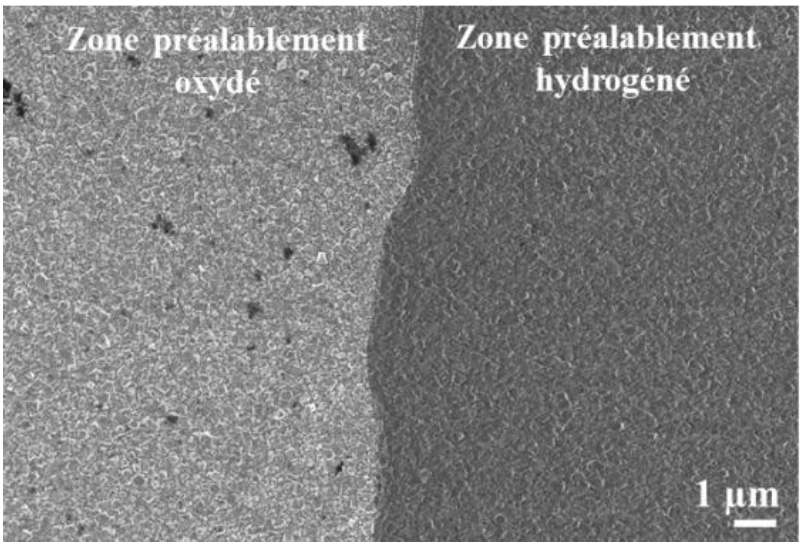


Figure 3.3 - Images MEB d'une surface diamant prise après d'immobilisation d'OBP sur une surface hydrogénée et fonctionnalisée par la méthode 1 (à droite) et sur une surface oxydée (à gauche)

3.2.2 Caractérisation par imagerie AFM

Le microscope AFM a été utilisé dans cette étude pour vérifier l'immobilisation des OBP sur diamant fonctionnalisé et pour estimer la rugosité de la surface après 2h d'immobilisation d'OBP. Les Figure 3.4 (a) et (b), ci-dessous, illustrent les différences de topographie de surface et de rugosité avant et après immobilisation d'OBP sur une surface de diamant monocristallin fonctionnalisé par la méthode 1. Le diamant monocristallin utilisé ici sert à minimiser la rugosité initiale du substrat de diamant. Sur l'image AFM de gauche (Figure 3.4 (a)), on aperçoit les stries de polissage du diamant non fonctionnalisé avec une rugosité inférieure à 10 nm. Après fonctionnalisation du diamant hydrogéné avec la méthode 1, la rugosité de la surface augmente à environ 50 nm après le greffage par l'acide aminocaproïque (données non présentées). Sur l'image AFM de droite (Figure 3.4 (b)), prise après immobilisation d'OBP pendant 2 h, ainsi que sur le profil de la Figure 3.4c, un recouvrement total de la surface de diamant, l'absence de stries, et une rugosité largement augmentée (autour de 355 nm), sont respectivement observés. Un profil de la surface a été effectué comme on peut l'apercevoir sur la Figure 3.4 (c) confirmant cette rugosité.

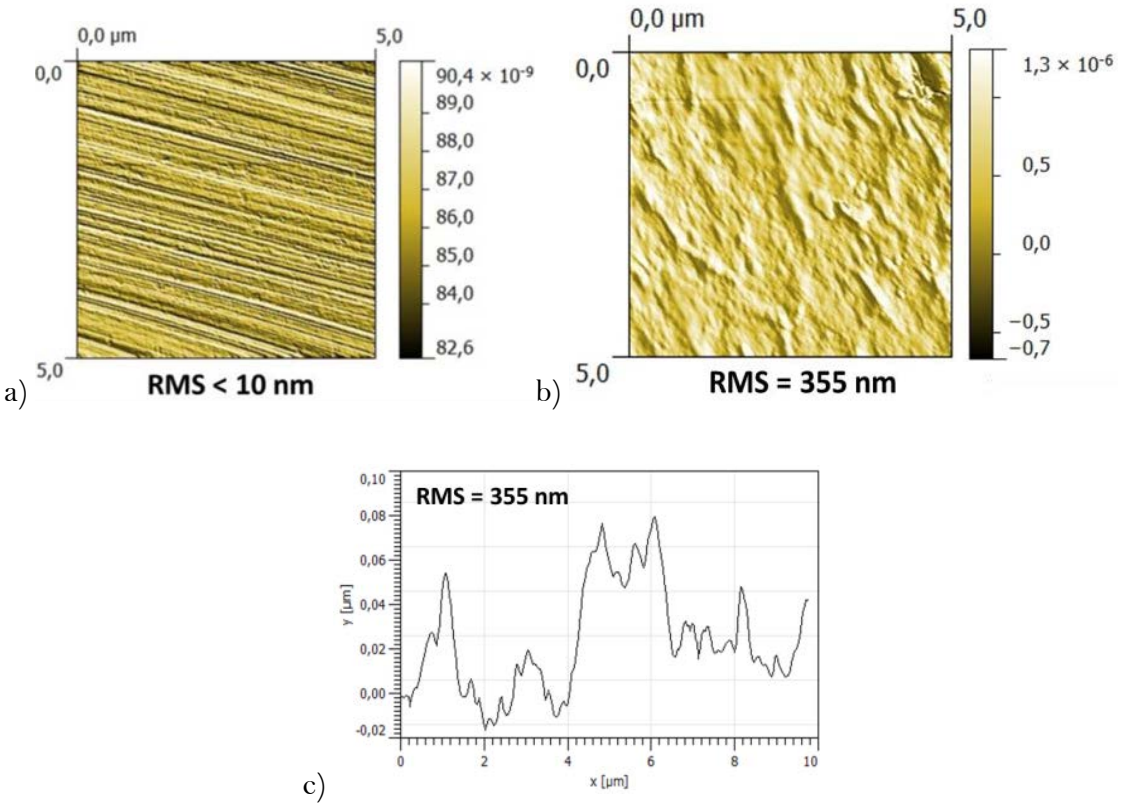


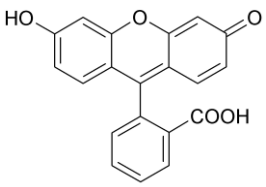
Figure 3.4 - Images AFM : a) Diamant monocristallin ; b) Diamant monocristallin fonctionnalisé par la méthode 1 suivi de l'immobilisation d'OBP de porc ; c) Profil de la surface du diamant monocristallin fonctionnalisé par la méthode 1 suivi de l'immobilisation d'OBP de porc

3.2.3 Caractérisation par spectroscopie de fluorescence

Afin de confirmer les premières observations faites au MEB, des contrôles par imagerie de fluorescence ont été effectués. Nous avons à nouveau vérifié que les LBP s'immobilisaient uniquement sur des surfaces de diamant hydrogénées, dans les conditions de greffage décrites dans la section 2.3.1 et 2.3.2, et non pas sur des surfaces de diamant oxydées (surface de contrôle). Comme précédemment décrit dans le chapitre 1, le greffage n'est théoriquement possible que sur une surface hydrogénée. De plus, cette expérience permet de mettre en évidence que l'OBP peut, éventuellement, s'adsorber sur les zones oxydées.

Pour cela, une surface de diamant hydrogénée est soumise à un processus de photolithographie déjà décrit dans la littérature [1]. En bref, cette technique consiste à déposer une résine photosensible sur du diamant préalablement hydrogéné. Le motif de masque utilisé dans cette étude est un ensemble de plusieurs carrés de 50 x 50 µm². Une fois le processus de photolithographie effectué, l'échantillon est exposé à un plasma d'oxygène (2 mbar d'oxygène, à une puissance de 50 W pendant 30 secondes) dans un équipement de gravure RIE (pour « reactive ion etching »). Les régions du substrat non protégées par la résine (surfaces entourant les carrés) sont ainsi oxydées tandis que celles protégées par résine (les carrés) restent hydrogénées (voir Figure 3.6.a). Enfin, la résine a été enlevée pour pouvoir fonctionnaliser la totalité du substrat avec les méthodes 1 et 2.

Ainsi l'OBP de porc (wtOBPpig), la P. domin OBP, la Amel OBP14 et le rMUP, tous de type « sauvage », ont été greffés par la méthode 1. La méthode 2 de fonctionnalisation (décrite dans la section 2.3.2) a permis l'immobilisation d'OBP de porc mutant (m6hisOBP pig) et de 6hisMUP20 tous deux taggués 6 histidines. Après la dernière étape d'immobilisation de ces LBP (tant OBP que MUP), le substrat a été immergé dans une solution de fluorescéine puis rincé vigoureusement avec de l'eau DI. La fluorescéine (Figure 3.5) est une protéine fluorescente ayant la capacité à se lier à la cage réceptrice d'odeurs de l'OBP, ce qui permet de visualiser sous UV la présence d'OBP.

a) 

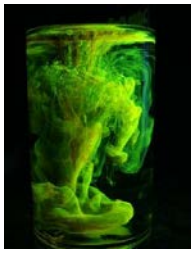
b) 

Figure 3.5 - a) Structure de la fluoroscéine ; b) Fluoroscéine sous illumination UV

La Figure 3.6(b), montre un exemple de surface sur laquelle ont été immobilisés des OBP mutants de porc (m6hisOBP pig). Nous pouvons vérifier ici que les zones de fluorescence se situent uniquement aux endroits où la surface de diamant a été préalablement hydrogénée (carrés). L'absence de tout signe de fluorescence sur les régions oxydées suggère, donc, qu'aucune adsorption non spécifique et significative d'OBP n'a lieu sur celles-ci. Les résultats tendent, donc, à confirmer que l'immobilisation des protéines est bien faite par greffage chimique, tel que décrit précédemment, et observé par imagerie MEB.

Le même substrat a été observé à nouveau 2 mois plus tard. Les mêmes figures de fluorescence sont toujours observables (Figure 3.6.c), ce qui laisse suggérer que l'OBP est toujours présent sur la surface après 2 mois de stockage dans des conditions ambiantes.

L'imagerie par fluorescence a également été utilisée pour vérifier la présence d'OBP immobilisés sur microleviers en diamant après l'étape d'immobilisation de ceux-ci sur la surface du transducteur et après plusieurs étapes de détection de composés organiques en milieu liquide (Figure 3.6.d). La fluorescéine peut ainsi rentrer en compétition avec les ligands déjà liés à l'OBP pour se lier elle-même à l'OBP en surface.

Cette même expérience menée avec la méthode 2 de fonctionnalisation et d'autres OBP et MUP, a mené aux mêmes résultats. Cette méthode a donc confirmé l'absence d'immobilisation de LBP sur diamant oxydé. Cela nous permet de conclure sur la validité de ces méthodes de greffage de LBP et sur la nécessité de présence d'une terminaison hydrogène sur diamant.

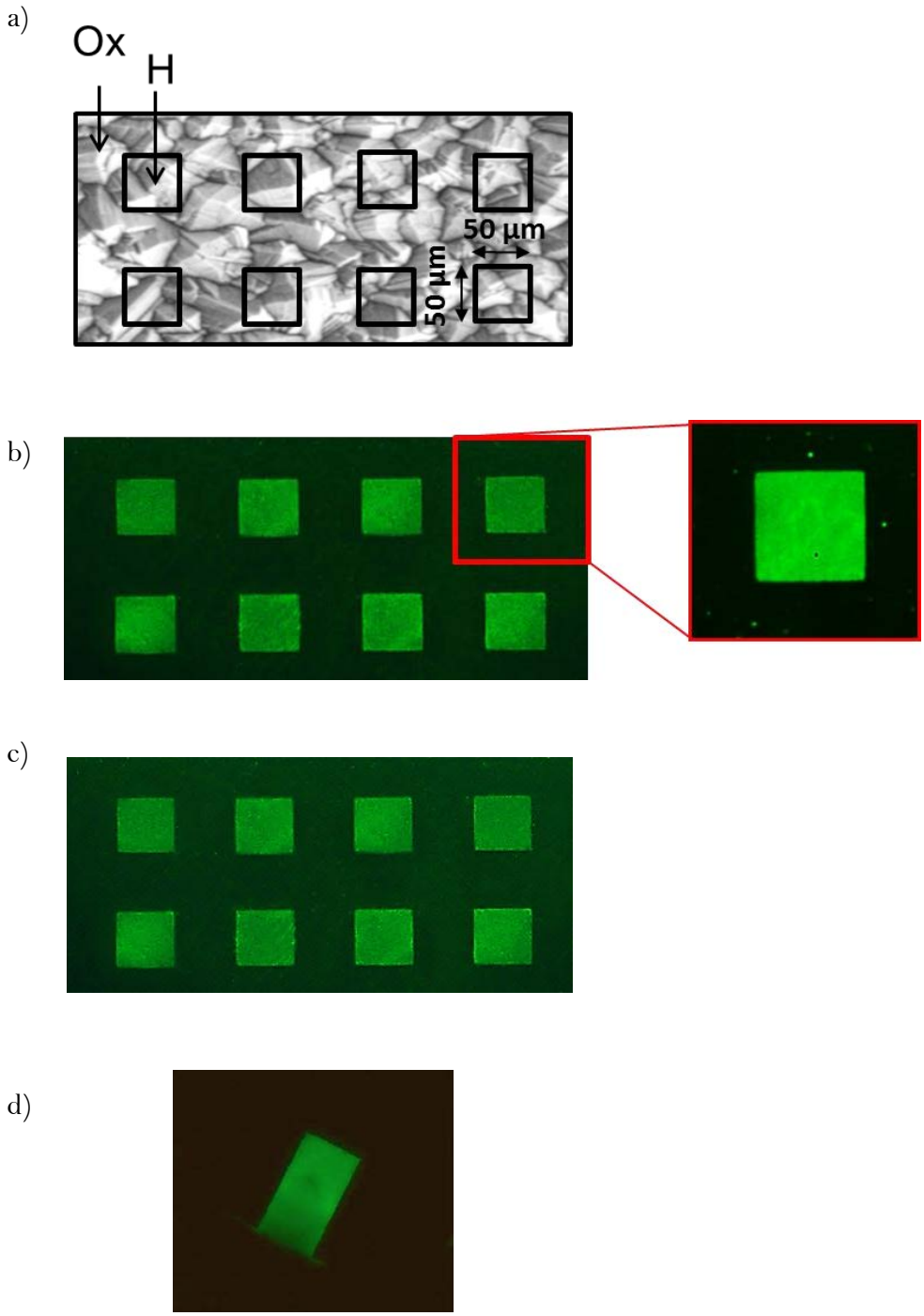


Figure 3.6 - a) Schéma illustrant le substrat en diamant hydrogéné (H) /oxydé (Ox) après photolithographie et oxydation de l'échantillon ; b) Image prise par spectroscopie de fluorescence à λ_{exc}=550 nm et λ_{em}=570 nm du diamant après photolithographie, oxydation, fonctionnalisation par la méthode 2, immobilisation de m6hisOBP pig et immersion dans une solution de fluorescéine ; c) Image du même substrat de la Figure 3.6 .b. prise après 2 mois de stockage et d) Image d'un microlevier après fonctionnalisation par la méthode 2, immobilisation de m6hisOBP pig, détection de composés organiques et immersion dans une solution de fluorescéine

3.2.4 Caractérisation chimique par spectroscopie XPS

L'analyse XPS permet de caractériser les groupements présents sur la surface du diamant [2]. Celle-ci est utilisée pour analyser les étapes du greffage NTA-Ni (méthode 2). Les spectres de 2 échantillons de diamant, le premier hydrogéné et le deuxième hydrogéné puis greffé par du NTA en utilisant la méthode 1, ont tout d'abord été enregistrés. Le spectre du deuxième échantillon est présenté sur la Figure 3.7.a. Ce spectre est très similaire à celui du diamant hydrogéné seul (non présenté ici). La seule différence observable est que la composante oxygène O 1s est plus importante sur l'échantillon greffé. Il semble donc ici que soit la méthode n'est pas suffisamment sensible, soit la quantité de NTA greffée est très faible. L'analyse est par ailleurs rendue plus difficile par le fait que le substrat soit essentiellement composé de carbone en surface.

C'est en complexant le NTA avec le Nickel (Ni) pendant 2h que les analyses XPS ont été plus conclusives. Elles ont été réalisées pour connaitre le niveau de liaison du Nickel (Ni) sur une surface en diamant après modification de la surface avec le complexe NTA-Ni. En se basant sur le spectre XPS obtenu (Figure 3.7.b), la présence de nickel sur le substrat fonctionnalisé par la méthode 2 est confirmée. Nous pouvons, en effet, déduire de ce spectre que la concentration atomique de nickel est de 2,7 at.%. La Figure 3.7.c montre bien la double composante du Ni $2p_{3/2}$ et Ni $2p_{1/2}$ localisé respectivement à 856.8 eV (Ni $2p_{3/2}$) and 874.6 eV (Ni $2p_{1/2}$). Les énergies de liaison du Ni 2p sont très proches de celles reportées dans la littérature pour le composé Ni_2O_3 (Ni $2p_{3/2}$ at 857.0 eV) [3] alors que le Ni $2p_{3/2}$ est plutôt situé vers 853.7 eV pour NiO [4].

Ces analyses XPS confirment, donc, la nature covalente du greffage du Nickel sur diamant hydrogéné par le greffage 2.

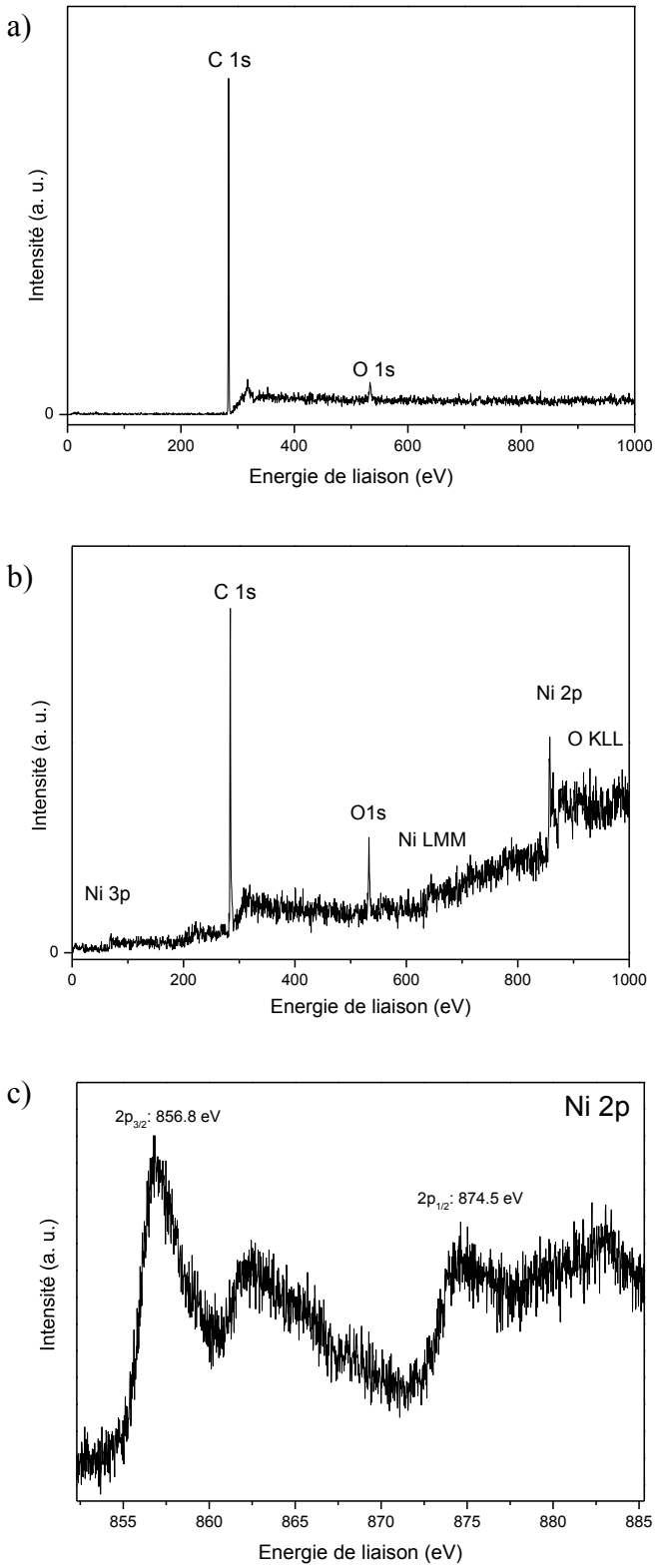


Figure 3.7 - a) Spectre XPS global d'une surface diamant hydrogénée fonctionnalisé avec du NTA ; b) Spectre XPS global d'une surface diamant hydrogénée fonctionnalisée par la méthode 2 (NTA-Ni) et c) Spectre XPS focalisé sur le niveau de corps Ni 2p de la surface (b)

3.2.5 Caractérisation électrochimique par EIS

Des électrodes en diamant dopé au bore ont été préparées selon la technique de fabrication détaillée dans le chapitre 2 pour réaliser des mesures d'impédance électrochimique.

Les caractérisations électrochimiques ont permis dans cette étude de caractériser et de comparer le recouvrement des LBP immobilisés sur la surface de diamant selon plusieurs paramètres tels que le temps d'immobilisation, le type de LBP utilisé, la méthode de greffage (1 ou 2) utilisée, le pH, etc.

La résistante de transfert (Rt) a été déterminée expérimentalement avant et après chaque étape de greffage. Les mesures d'impédances sont, dans ce cas d'étude, analysées en fittant les spectres d'impédance obtenus suivant le modèle correspondant au circuit équivalent de Randles [5]. La résistance de transfert Rt peut être corrélée à la présence d'espèces organiques sur la surface de l'électrode. En effet, la présence de composés organiques peut réduire l'accessibilité de la surface de l'électrode aux espèces cibles rédox présentes en solution (le couple ferro/ferricyanide dans notre cas), ce qui va ainsi réduire les possibilités de transfert d'électrons et donc augmenter Rt.

La surface d'une électrode en diamant hydrogéné sera communément appelée « H-diamant » et la surface d'une électrode en diamant oxydé sera appelée « Ox-diamant » pour des raisons pratiques d'écriture. Après l'étape de greffage de l'acide aminocaproïque puis couplage EDC/NHS ou du NTA-Ni, les OBP et MUP sont immobilisés pendant 2h sur chaque surface de diamant sauf mention contraire.

3.2.5.a Immobilisation d'OBP sur diamant fonctionnalisé

Dans les conditions expérimentales décrites dans la section 2.3.1, le radical de l'acide hexanoïque greffé à partir de l'acide aminocaproïque ne peut être attaché qu'au diamant hydrogéné [6]. La surface de diamant oxydé peut donc théoriquement agir comme un échantillon de contrôle où typiquement aucun greffage ni immobilisation covalente n'est théoriquement possible.

Ainsi, une surface d'électrode en diamant hydrogéné nu (H-diamant) et une autre en diamant oxydé (Ox-diamant) sont greffées avec l'acide aminocaproïque par la méthode 1. La Figure 3.8 représente le spectre de Nyquist d'une électrode en diamant après chaque étape de greffage de la méthode 1 avec finalement l'immobilisation du wtOBPpig pendant 2 heures pour le cas de l'électrode H-Diamant et la Figure 3.9 les mêmes spectres pour l'électrode Ox-diamant. La Figure 3.8 montre bien une évolution des spectres d'impédance avec une augmentation Rt d'environ 200 Ω entre la surface

de l'électrode en diamant hydrogéné nu et celle greffée avec l'acide aminocaproïque (nommé H-diamant-aca). Par contraste, aucune différence significative de Rt n'est observée sur la Figure 3.9 illustrant la même expérience effectuée sur une surface en diamant oxydé. Ce qui souligne bien le fait que l'acide aminocaproïque n'est greffé que sur la surface hydrogénée.

Ensuite, un essai d'immobilisation d'OBP (wtOBPpig) sur ces 2 surfaces en diamant, hydrogéné et oxydé, a été effectué après le couplage EDC/NHS. La Figure 3.8 montre alors une augmentation importante de Rt dans le cas de la surface hydrogénée où le greffage de l'acide aminocaproïque a bien eu lieu, contrairement à la surface oxydée où aucune augmentation significative de Rt n'est observée sur la surface oxydée. Dans le cas de la surface de diamant hydrogéné, Rt augmente ainsi de typiquement 78 Ω pour le H-diamant et de 896 Ω pour l'immobilisation de wtOBPpig.

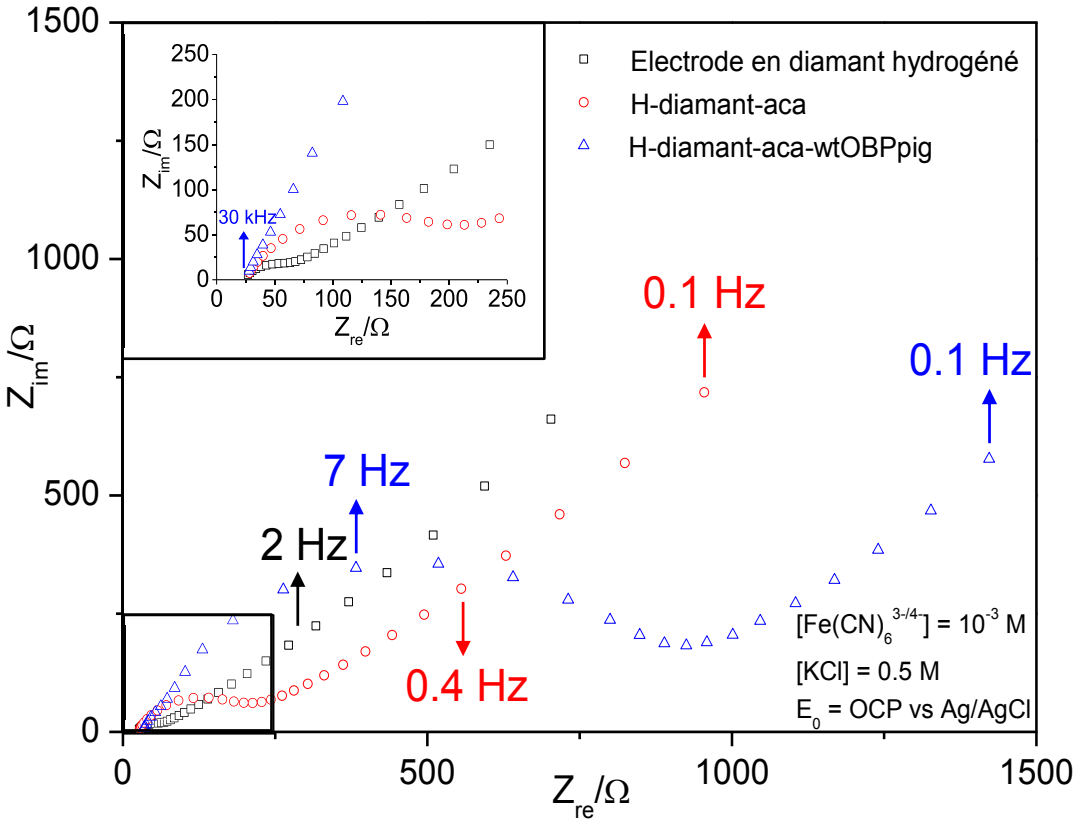


Figure 3.8 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivi d'un greffage du radical de l'acide aminocaproïque (rouge) et suivi du couplage EDC/NHS et de 2h d'immobilisation de wtOBPpig (bleu)

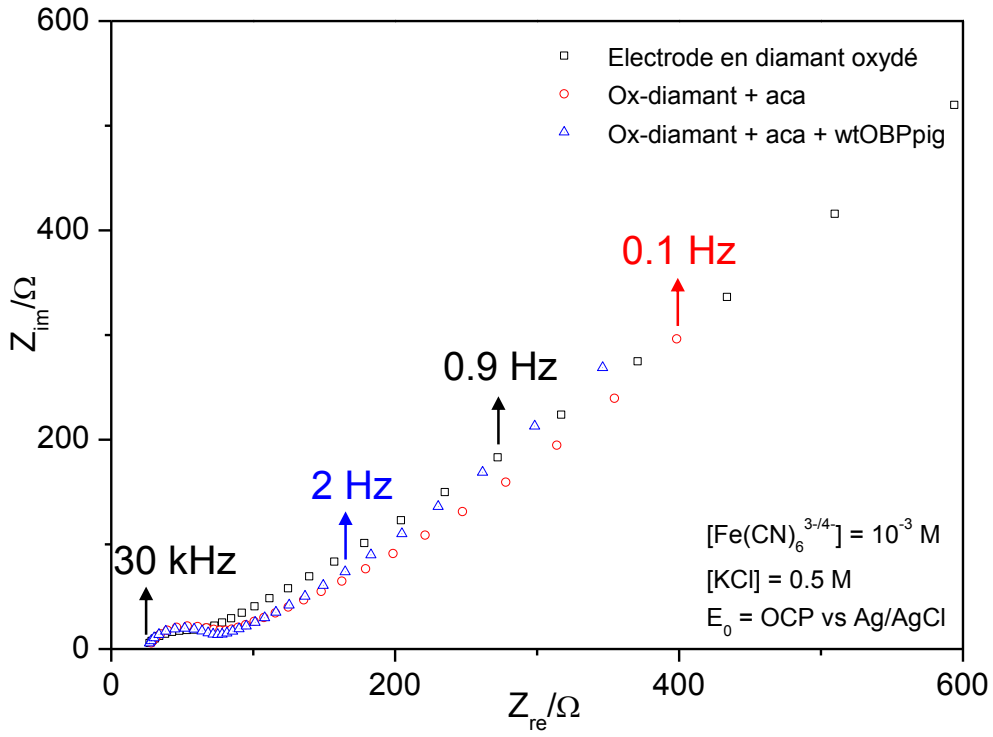


Figure 3.9 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode de diamant oxydé (noir), suivi d'un essai de greffage de l'acide aminocaproïque (rouge) et suivi d'un essai d'immobilisation de wtOBPpig (bleu)

Ce premier résultat confirme bien que les OBP ne s'immobilisent que sur des surfaces hydrogénées greffées ici, au préalable par la méthode 1, et non pas sur les surfaces oxydées, comme déjà observé par les méthodes de caractérisation précédentes.

La méthode 2 a également été caractérisée par spectroscopie d'impédance (Figure 3.10). Comme précisé dans la section 2.3.2, le greffage du NTA utilise le même processus de fonctionnalisation que l' aminocaproïque [6]. Le nickel et le NTA forment un complexe NTA-Ni ayant la capacité de se lier aux groupements histidines. Des OBP ayant un groupement 6 histidines (m6hisOBPpig et 6hisOBP 1Pd) ont été immobilisés avec la méthode 2 de greffage sur des électrodes en diamant pendant 2 h. La localisation des groupes histidines sur les protéines étant contrôlée, nous pouvons supposer qu'une fois les OBP immobilisés sur la surface via le groupe 6his, l'orientation des protéines est elle aussi contrôlée.

Dans le cas de la méthode 2 (Figure 3.10), des résultats très similaires à ceux obtenus sur la méthode 1 ont été observés : une augmentation de Rt lors du greffage du complexe NTA-Ni sur H-diamant ainsi d'une forte augmentation de Rt (passant de 72 Ω à 1630 Ω) en immobilisant l'OBP m6hisOBPpig.

De même que précédemment, lorsque cette manipulation a été reproduite sur Ox-diamant, aucune augmentation significative de Rt sur Ox-diamant n'est observable.

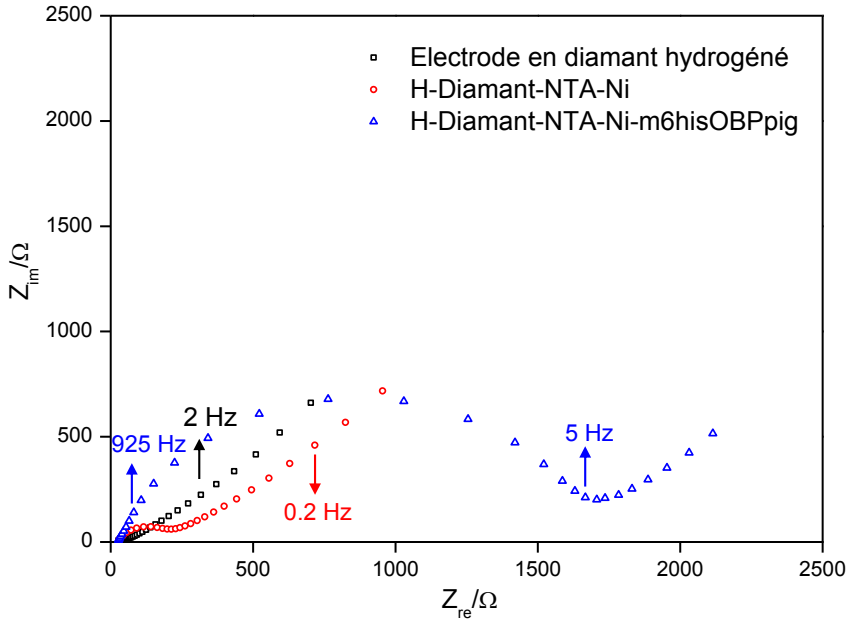


Figure 3.10 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivie d'un greffage du complexe NTA-Ni (rouge) et suivie de 2h d'immobilisation de m6hisOBPpig (bleu)

Pour résumer, les valeurs de Rt de toutes les mesures d'EIS précédentes sont résumées dans la Figure 3.11 où l'évolution de la résistance de transfert est indiquée après chaque étape de greffage sur surfaces hydrogénées et oxydées en utilisant les méthodes 1 et 2 de greffage.

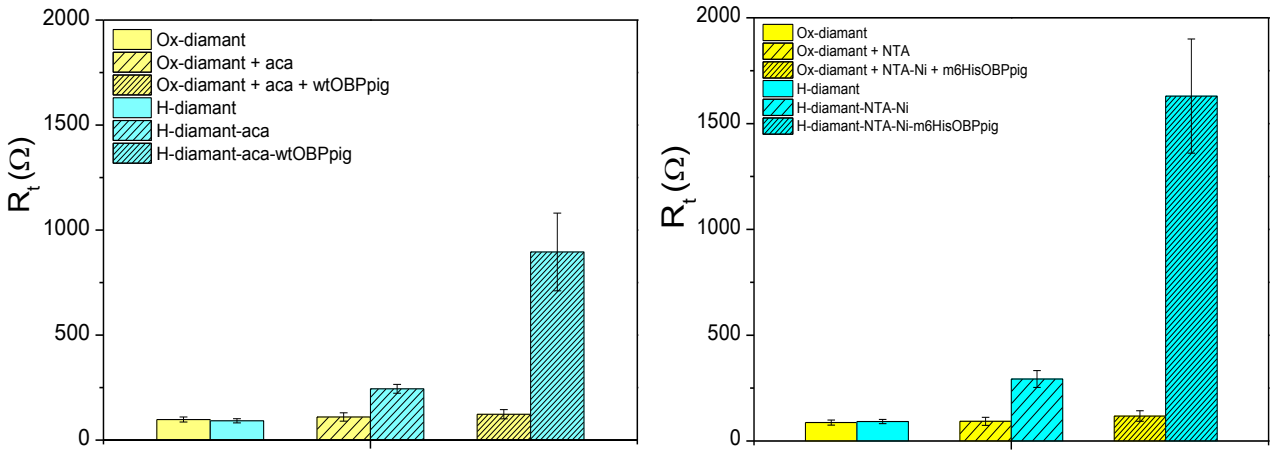


Figure 3.11 - Evolution de la résistance de transfert d'électrodes en diamant oxydée (jaune), hydrogénée (bleu) mesurée après chaque étape de greffage de la méthode 1 (à gauche) et de la méthode 2 (à droite) et après immobilisation de m6hisOBPpig et de wtOBPpig.

La valeur de Rt est plus importante lors de l'immobilisation d'OBP via la méthode 2 de fonctionnalisation de surface. Ceci nous indique que le greffage NTA-Ni est plus efficace avec davantage d'OBP immobilisés.

3.2.5.b Immobilisation de MUP sur diamant fonctionnalisé

Ces mêmes expériences, dans les mêmes conditions de greffage, ont été répétées pour l'immobilisation de MUP (rMUP et 6hisMUP20) et montrent encore une fois des résultats similaires (Figure 3.12). La résistance Rt de la surface diamant fonctionnalisée par la méthode 1 suivie par 2h d'immobilisation de rMUP (H-diamant-ha-rMUP) est de 986 Ω et celle de la surface diamant fonctionnalisée par la méthode 2 suivie par 2h d'immobilisation de 6hisMUP20 (H-diamant-NTA-Ni-6hisMUP20) est de 1434 Ω. Ici aussi la méthode 2 semble donner un meilleur rendement de greffage.

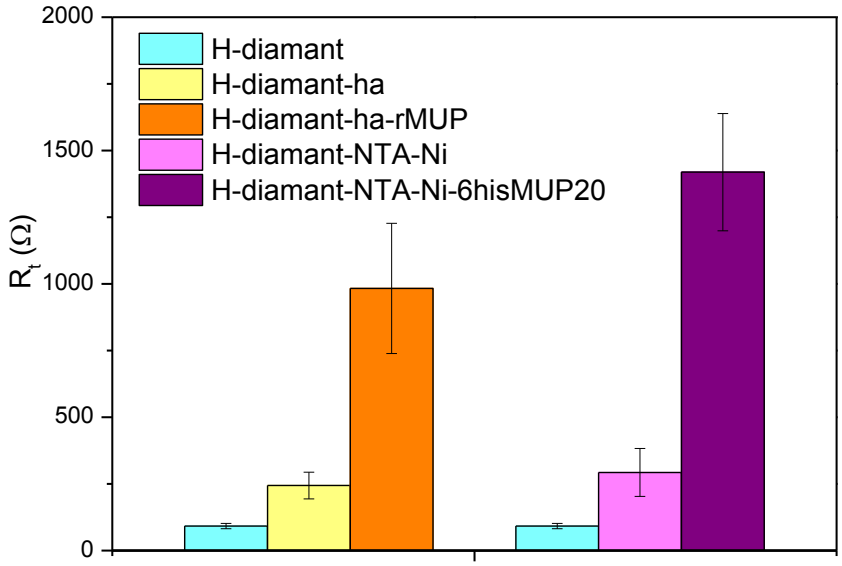


Figure 3.12 - Evolution de la résistance de transfert des 2 électrodes en diamant hydrogéné, mesurée après chaque étape de greffage de la méthode 1 et 2 suivies d'immobilisation de rMUP et 6hisMUP20 (au même temps de greffage t=2 h)

3.2.5.c Cinétique d'immobilisation d'OBP

L'augmentation de Rt lors de l'immobilisation de l'OBP dépend du facteur temps. Ainsi, en immobilisant m6hisOBPpig sur une surface H-diamant fonctionnalisée NTA-Ni pendant 3 temps différents (20, 40 et 220 min), on remarque sur la Figure 3.13 que les valeurs de Rt augmentent de façon importante : 570 Ω, 1264 Ω, et 1923 Ω, respectivement.

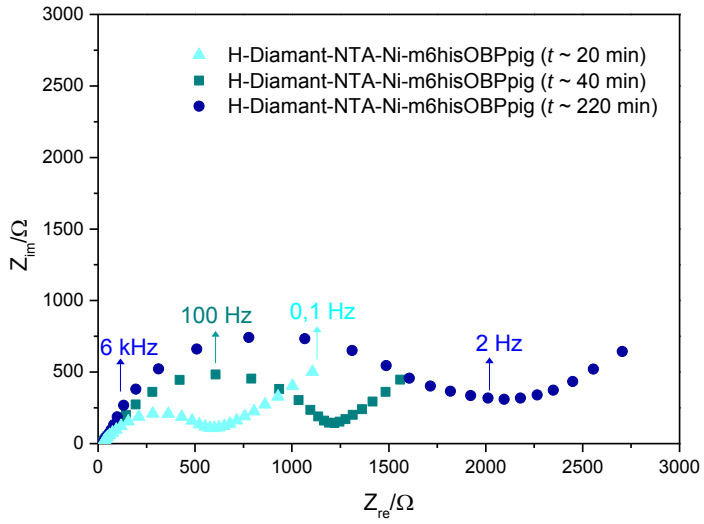


Figure 3.13 - Spectre d'impédance d'une surface diamant hydrogéné fonctionnalisée par la méthode 2 (NTA-Ni) après immobilisation de m6HisOBPpig pendant 20 min, 40 min et 220 min

Pour connaitre la cinétique d'immobilisation des OBP sur la surface H-diamant-NTA-Ni, un suivi de l'évolution de Rt au cours du temps a donc été effectué en enregistrant un spectre d'impédance toutes les 2 minutes à partir du début de l'exposition de l'électrode à l'OBP. La Figure 3.14 montre la cinétique d'immobilisation d'OBP, obtenue en mesurant l'évolution de Rt au cours du temps d'une surface diamant NTA-Ni sous exposition à une solution de m6hisOBPpig concentrée à 1 mg/mL à pH 8. La cinétique d'immobilisation d'OBP, obtenue en spectroscopie d'impédance, est de type exponentiel. La courbe atteint un plateau à environ 200 minutes ($T_{90\%}$ =140 min) correspondant à l'état d'équilibre à partir duquel le greffage de nouveaux OBP n'a plus lieu. Ce résultat sera confirmé par la suite par les caractérisations en vibrométrie laser lors de l'immobilisation d'OBP sur microlevier en diamant.

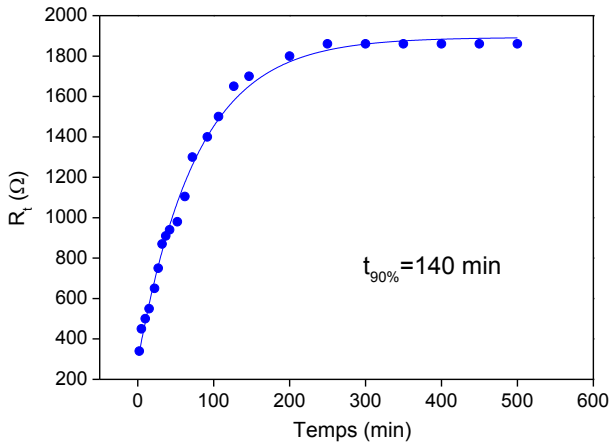


Figure 3.14 - Cinétique d'immobilisation du m6hisOBPpig sur diamant hydrogéné fonctionnalisé NTA-Ni (méthode 2)

3.2.5.d Effet de l'imidazole et de l'EDTA sur l'immobilisation d'OBP

Après immobilisation d'OBP sur la surface en diamant hydrogéné et fonctionnalisé par la méthode 2, la surface est exposée à de l'imidazole (en solution, 200 mM PBS à pH 7,4 pendant 1 h). Comme précisé dans la section 2.3.2, l'imidazole a la capacité à se lier compétitivement au Ni à l'encontre des histidines, ce qui a pour effet d'éliminer la présence d'OBP attachés au complexe NTA-Ni. La Figure 3.15 montre bien l'importante réduction de Rt après l'ajout d'imidazole sur la surface qui passe typiquement de 1677 Ω à 394 Ω, relatif au décrochage de l'OBP du Nickel. Ceci renforce bien le fait que les OBP s'attachent bien à la surface de diamant fonctionnalisé via le complexe de Ni.

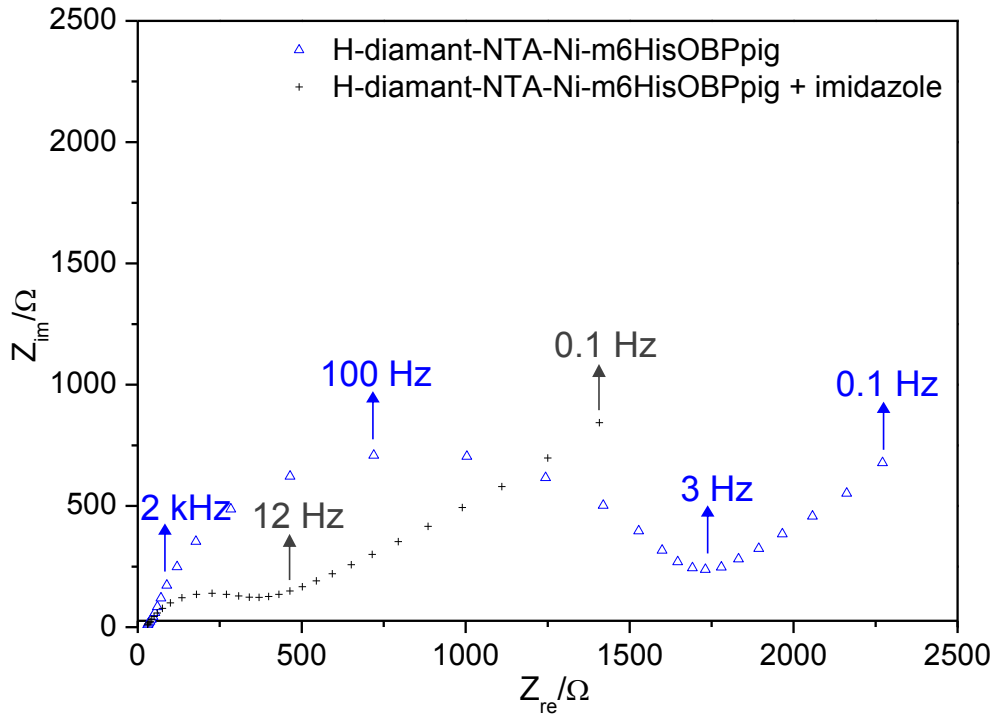


Figure 3.15 - Spectre d'impédance d'une surface hydrogénée fonctionnalisée par la méthode 2 (NTA-Ni) après immobilisation de m6HisOBPpig (bleu) et après un traitement de la surface par imidazole (noir)

Le même type d'expérience a été réalisé avec de l'EDTA pendant 1 h. Ainsi après immobilisation d'OBP sur la surface hydrogénée et fonctionnalisée par la méthode 2, la surface est exposée à de l'EDTA en solution et une importante diminution de Rt est observée. Cela est dû au fait que l'EDTA peut chélater le nickel afin qu'il se détache du NTA. Rt décroît ici typiquement de 1680 Ω à 178 Ω.

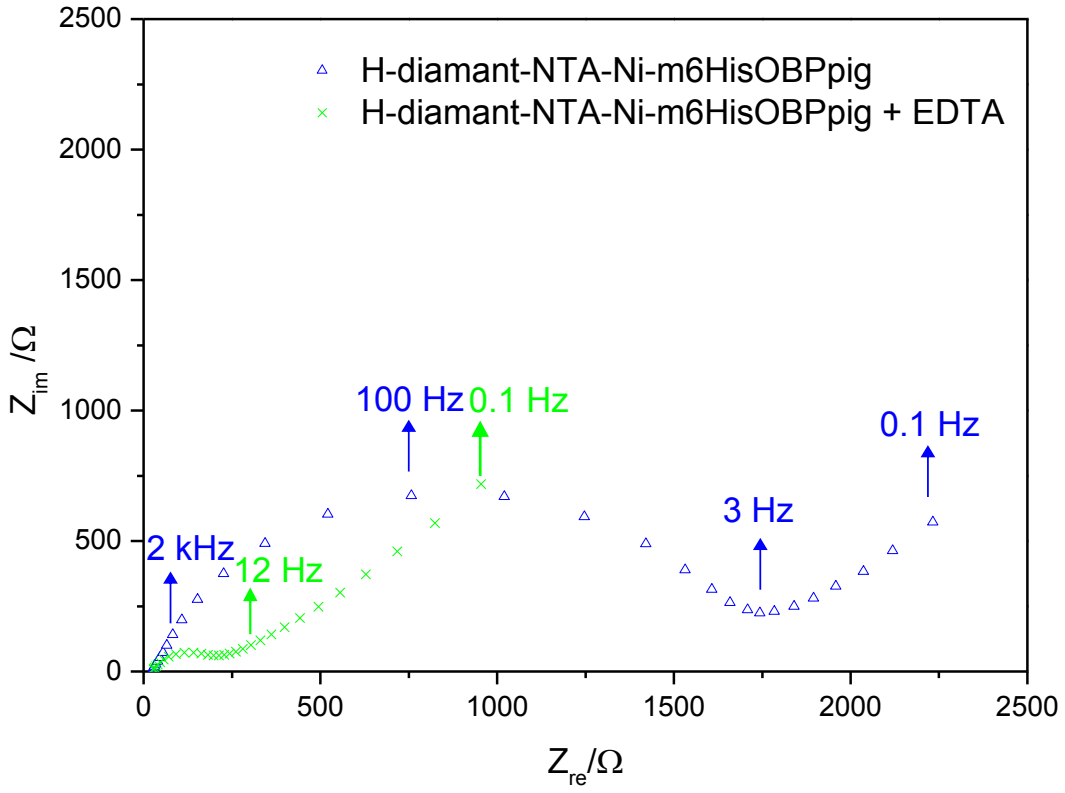


Figure 3.16 - Spectre d'impédance d'une surface diamant hydrogénée et fonctionnalisée par la méthode 2 (NTA-Ni) après immobilisation de m6HisOBPpig (bleu) et après un traitement de la surface par EDTA (vert)

3.2.5.e Adsorption non spécifique d'OBP sur diamant

Après greffage du complexe NTA-Ni sur surface hydrogénée, on a comparé l'immobilisation sur cette surface d'un OBP de type « sauvage » (wtOBPpig) ne contenant pas de groupement histidine dans sa structure avec l'immobilisation du m6hisOBPpig sur la Figure 3.17. Ces expériences ont été réalisées avec le même temps de greffage (t=2h).

Normalement et particulièrement dans ce cas, l'absence de groupement histidine devrait théoriquement prévenir l'immobilisation de ce type d'OBP. On remarque, tout de même, une augmentation de Rt (jusqu'à 560 Ω) dans le cas de l'immobilisation du wtOBPpig sur la surface de diamant greffée NTA-Ni, probablement due à l'adsorption non spécifique. Cette augmentation n'est, certes, pas aussi importante que celle observée pour l'immobilisation du m6hisOBPpig (1680 Ω), ce qui confirme que l'immobilisation se fait bien majoritairement grâce au complexe NTA-Ni.

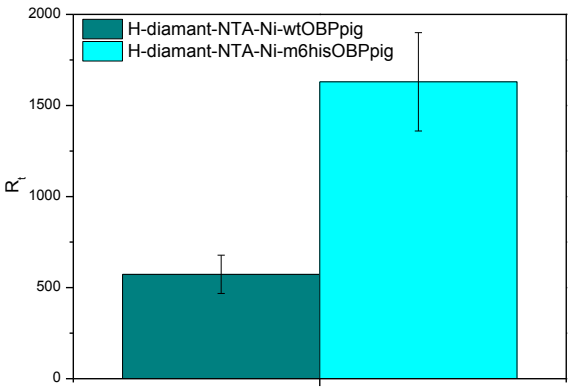


Figure 3.17 - Comparaison de la résistance de transfert d'électrodes en H-diamant fonctionnalisées par la méthode 2 (NTA-Ni) : après immobilisation de m6hisOBPpig et après adsorption de wtOBPpig

L'augmentation de Rt jusqu'à environ 650 Ω dans le cas du wtOBPpig pourrait s'expliquer aussi par l'adsorption de certains OBP directement sur la surface en diamant hydrogéné car, comme observé précédemment par imagerie MEB (Figure.3.1), les OBP semblent avoir une affinité importante avec les surfaces hydrogénées. Cela est d'autant plus possible que la densité de NTA-Ni greffée est faible, comme le suggère l'analyse XPS. En déposant des OBP directement sur une électrode diamant non fonctionnalisée, on remarque que Rt a tendance à augmenter jusqu'à 500 Ω. (Figure 3.18)

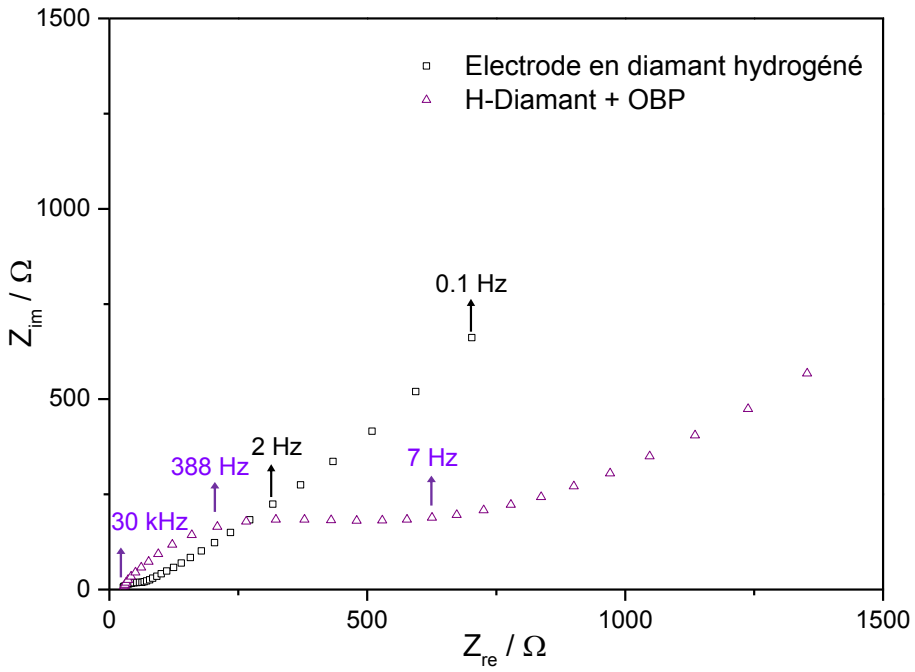


Figure 3.18 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivie d'une adsorption d'OBP (violet)

3.2.5.f Effet du pH sur l'immobilisation des OBP

En modifiant le pH de la solution d'OBP, la variation de Rt due à l'immobilisation des OBP sur diamant fonctionnalisé par la méthode 2 semble varier. Ces expériences ont été réalisées avec le même temps de greffage (t=2h).

Comme on peut le voir sur la Figure 3.19, à pH 5, très peu d'immobilisation d'OBP se produit sur la surface de diamant avec une Rt d'environ 356 Ω. Comme évoqué dans le chapitre 1, à pH inférieur à 6, les résidus histidines des protéines OBP commenceront à être réduits et ne pourront plus lier le nickel. C'est pourquoi Rt est, dans ce cas précis, très faible comparé aux autres immobilisations réalisées à pH plus importants. Rt augmente lorsque le pH de la solution d'immobilisation augmente. A pH 7, Rt est de 1241 Ω, à pH 8, Rt est de 1680 Ω et à pH 10, Rt est de 2134 Ω. Il semble qu'à pH 10, l'immobilisation d'OBP soit plus importante. Au-dessus de pH 10, le risque de dénaturer la protéine deviendrait certainement important. Cette même expérience a été réalisée à pH 12 et comme attendu, les OBP semblent moins s'immobiliser sur la surface avec une baisse de Rt d'environ 600 Ω comparée à celle mesurée à pH 10.

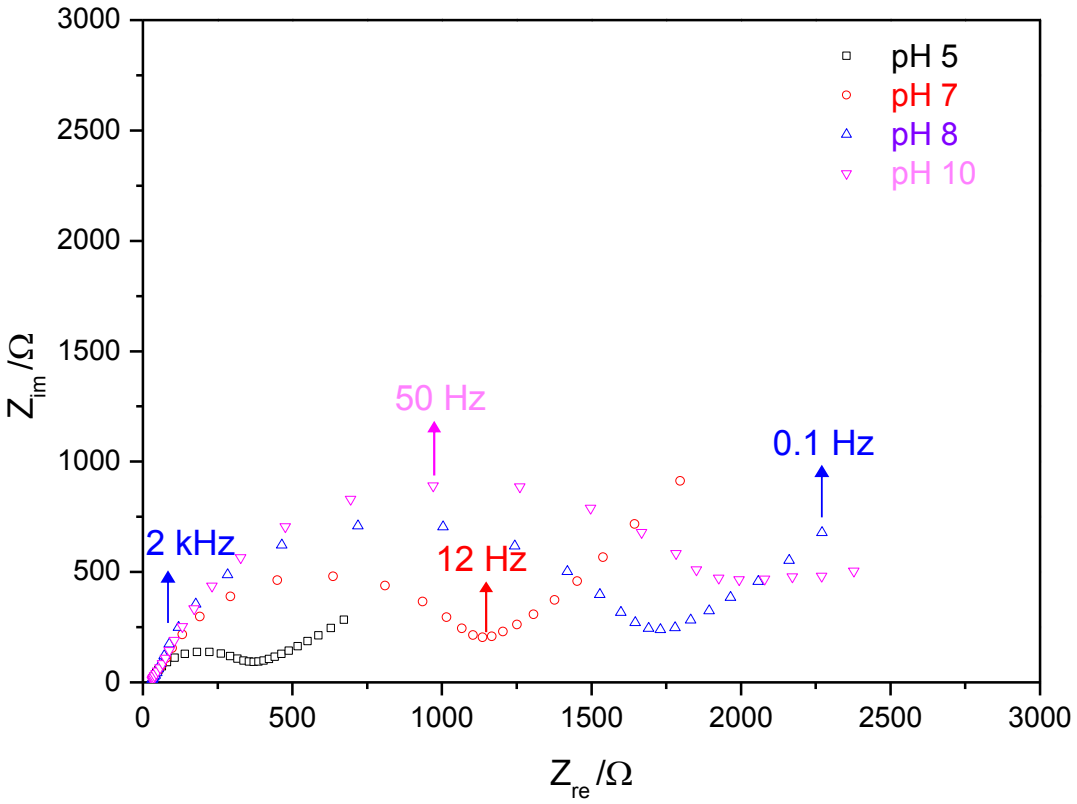


Figure 3.19 - Spectre d'impédance d'une surface hydrogénée fonctionnalisée par la méthode 2 (NTA-Ni) après immobilisation de m6HisOBPpig à pH 5 (noir), à pH 7 (rouge) à pH 8 (bleu) et à pH 10 (rose)

3.2.5.g Immobilisation des OR sur diamant fonctionnalisé

Dans un autre contexte, nous avons collaboré dans le cadre d'un échange avec l'unité NOeMi de l'INRA de Jouy en Josas pour l'utilisation d'OR dans la fabrication de biocapteurs. Le but ici est de concevoir des détecteurs de composés organiques grâce à des microleviers fonctionnalisés par des OR.

Etant donné que les OR évoluent dans un environnement membranaire biologiquement différent et plus complexe que celui des OBP et des MUP et qu'il n'existe à ce jour aucun travail relatant l'immobilisation d'OR sur des transducteurs en diamant, nous avons voulu confirmer, par spectroscopie d'impédance, qu'une immobilisation de ces récepteurs sur diamant, en utilisant la méthode 1 et 2 de fonctionnalisation, était possible.

En utilisant les mêmes conditions de greffage de la méthode 1 et 2, l'immobilisation de 3 OR a été menée : OR M71, OR1740, OR7D4. L'OR M71 est le seul récepteur taggué 6his, il a donc été greffé grâce à la méthode 2 de fonctionnalisation. Ces 3 OR nous ont été fournis par NOeMi dans le but d'avoir une étude plus approfondie sur ces trois récepteurs.

En immobilisant les OR dans les conditions recommandées par l'équipe de l'INRA (pH 7 et 1h d'immobilisation), la résistance de transfert ne dépasse pas 600 Ω après immobilisation. Pour le cas de l'immobilisation des OBP sur surface diamant fonctionnalisé, on a observé que l'immobilisation dépendait du pH et aussi du temps d'immobilisation. Ainsi, pour que les OR s'immobilisent de manière plus conséquente, le temps d'immobilisation d'OR sur la surface fonctionnalisée a été doublé et passé de 1h à 2h puis à 4 h. La Figure 3.20 illustre les spectres d'impédance obtenus pour l'immobilisation OR7D4 en fonction du pH et du temps d'immobilisation. En immobilisant pendant 2h l'OR7D4, une augmentation importante de Rt, est ainsi remarquée atteignant environ 1500 Ω. En augmentant à nouveau le temps d'immobilisation de 2 h, aucun changement significatif ne semble se produire. La valeur de Rt pour une immobilisation de l'OR7D4 de 4h à pH 7 est toujours d'environ 1500 Ω. Il semble que la cinétique d'immobilisation des OR sur surface diamant fonctionnalisé est plus longue que celle des OBP.

On remarque aussi qu'en augmentant le pH de la solution d'immobilisation des OR à pH 10, Rt augmente de manière conséquente pour atteindre la valeur de 2334 Ω pour une immobilisation de 2h et de 3113 Ω pour une immobilisation de 4 h. En bref, l'immobilisation des OR7D4 semble augmenter avec l'augmentation du pH et avec le temps d'immobilisation. Les conditions optimales d'immobilisation semblent être à pH 10 pendant 4 h. Au-dessus de pH 10, le risque de dénaturer la protéine deviendrait certainement important.

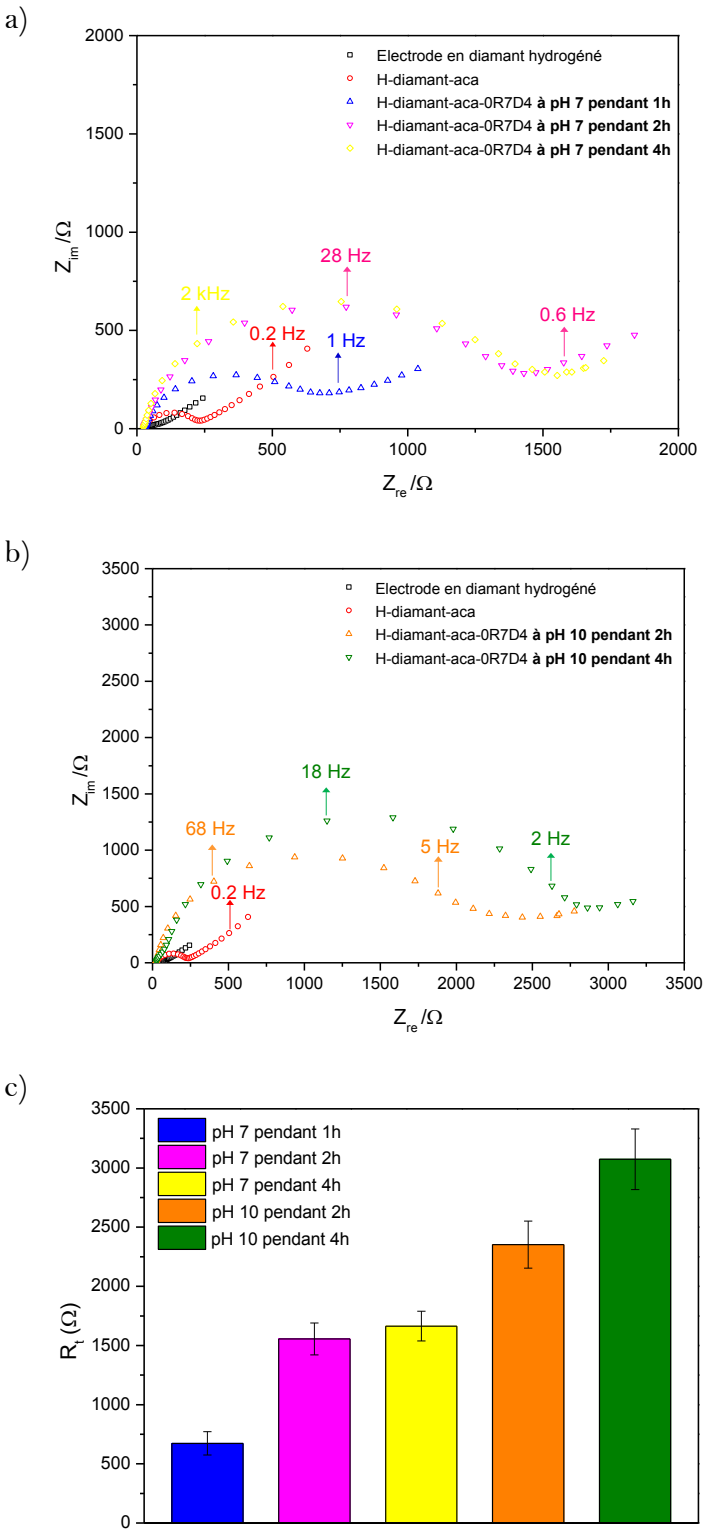


Figure 3.20 - (a) Spectres d'impédances typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivi d'un greffage de l'acide aminocaproïque (rouge) et suivi du couplage EDC/NHS et d'une immobilisation du récepteur olfactif OR7D4 à pH 7 pendant 1h (bleu), 2h (rose) et 4h (jaune) ; (b) à pH 10 pendant 2h (orange) et 4h (vert) et c) Evolutions de la résistance de transfert mesurée en fonction du pH et du temps d'immobilisation des OR7D4

Les mêmes types d'expériences ont été menés pour les récepteurs OR M71 et OR1740. Des résultats similaires ont été obtenus, c'est-à-dire une augmentation de Rt en augmentant le pH et le temps d'immobilisation. Les immobilisations de ces récepteurs dans les conditions optimales trouvées sont illustrées dans les figures ci-dessous. La Figure 3.21 illustre (a) l'immobilisation de l'OR 1740 pendant 4 heures à pH 10 avec l'évolution de Rt qui augmente jusqu'à 1663 Ω après immobilisation et (b) celle de l'OR M71 pendant 4 heures à pH 10 avec l'évolution de Rt qui augmente jusqu'à 778 Ω. En faisant l'hypothèse que Rt est proportionnelle à la densité de greffage et en comparant les immobilisations de ces 3 récepteurs, il apparaît que le récepteur OR7D4 semble s'immobiliser de façon plus conséquente que les 2 autres récepteurs. Le récepteur OR M71 semble le moins immobilisé sur la surface malgré l'utilisation de la méthode de fonctionnalisation 2 utilisée qui semblait apporter une immobilisation plus importante pour les OBP en comparaison à la méthode 1 employée ici pour l'OR7D4.

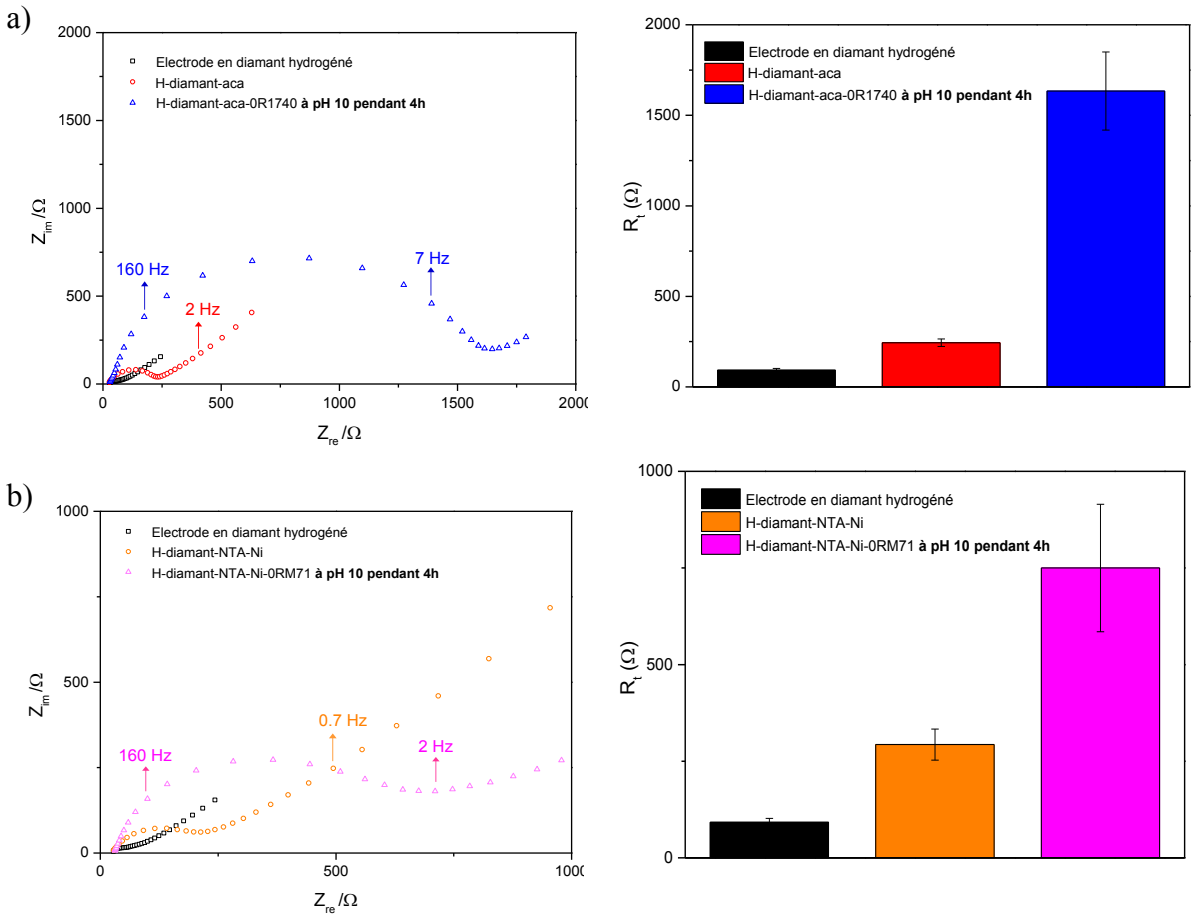


Figure 3.21 - (a) Spectres d'impédances typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivi d'un greffage de l'acide aminocaproïque (rouge) et suivi du couplage EDC/NHS et d'une immobilisation du récepteur olfactif OR1740 à pH 10 pendant 4h (bleu) avec l'évolution de Rt; (b) Spectres d'impédances typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivi d'un greffage du NTA-Ni (orange) suivi d'une immobilisation du récepteur olfactif OR M71 à pH 10 pendant 4h (rose) avec l'évolution de Rt

3.2.6 Suivi des greffages sur microleviers par vibrométrie laser

Comme nous l'avons vu dans les sections précédentes, plusieurs techniques de caractérisation de surface ont été employées pour confirmer les greffages chimiques de même que l'immobilisation des LBP sur une surface diamant. Ici une technique originale s'appuyant sur la mesure de la fréquence de résonance d'un microlevier par vibrométrie laser, comme détaillé dans la section 2.4.1.b, est utilisée afin de corréler les principaux résultats trouvés dans les sections précédentes. Ce dispositif permet de mesurer les déplacements de fréquence des microleviers par interrogation optique en réponse à l'immobilisation d'espèces chimiques sur leur surface.

Dans la section 1.2.5.b.ii, nous avons vu que, généralement, la présence d'espèces cibles sur la surface du microlevier contribue à l'augmentation de la masse effective du microlevier. Elle induit aussi une modification de sa rigidité due à de possibles interactions moléculaires telles que des répulsions électrostatiques, des obstructions stériques, les interactions de Van der Walls, etc. Ainsi, en régime dynamique, les microleviers sont sensibles aux variations de masse et de contraintes de surface induites par les interactions avec les espèces chimiques cibles. Cependant il est supposé qu'en milieu liquide, les microleviers sont majoritairement sensibles aux variations de contraintes surfaciques. En effet, la sensibilité à la masse y est largement réduite du fait de l'amortissement.

3.2.6.a Greffage de l'acide aminocaproïque

Nous avons vu dans la section 1.3.2.g que Bongrain et al. ont réussi à suivre l'évolution de la fréquence de résonance d'un microlevier au cours de l'étape de fonctionnalisation du diamant hydrogénée avec de l'acide aminocaproïque (Figure 1.14). Il a été observé, comme attendu, que la cinétique d'augmentation des fréquences de résonance est liée à la concentration d'acide aminocaproïque dans la solution de greffage. Le fait d'observer une augmentation de fréquence de résonance plutôt qu'une diminution a confirmé, par ailleurs, que ce déplacement en fréquence est lié à un changement d'élasticité plutôt qu'à une masse induite par l'immobilisation de l'acide aminocaproïque sur la surface du microlevier. Cette même expérience de greffage d'acide aminocaproïque a été reproduite dans les mêmes conditions de greffage, dans notre cas d'étude, et des résultats strictement similaires ont été observés.

La Figure 3.22 montre l'évolution typique de la fréquence de résonance d'une poutre avant et après la procédure de fonctionnalisation. Les variations de fréquences sont données par rapport à la fréquence de résonance initiale (lorsque la cellule liquide est remplie par la solution de tampon phosphate de rinçage).

Les deux étapes de rinçage B et B' correspondent aux fréquences de résonance après stabilisation de la fréquence de résonance, la fréquence de l'étape C a été mesurée après l'exposition d'une minute de la poutre à la solution de greffage (solution de 800 µM d'acide aminocaproïque dans ce cas présent) et finalement, les deux autres étapes de rinçage D et D' correspondent à la stabilisation de la réponse de la poutre après greffage. Cela permet de contrôler la stabilité de la ligne de base après exposition de la poutre à l'acide aminocaproïque et avant d'entamer la prochaine fonctionnalisation de surface par le couple EDC/NHS.

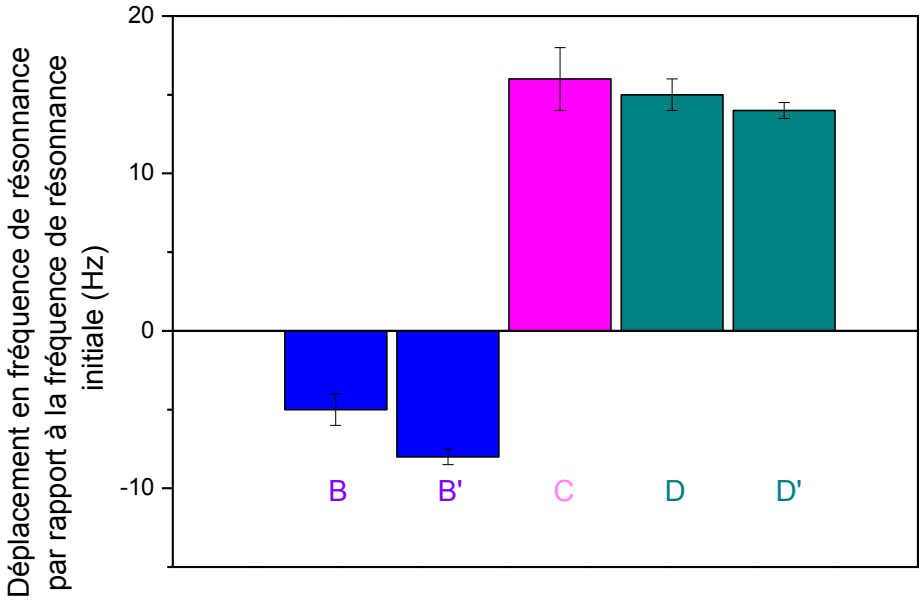


Figure 3.22 - Evolution de la fréquence de résonance, par rapport à la fréquence de résonance initiale, d'une poutre en diamant à la fin de chaque étape de la procédure de fonctionnalisation : étapes de rinçage B et B' ; étape C de greffage de l'acide aminocaproïque (1 min à 800 µM) et étapes de rinçage D et D' après greffage.

Globalement, les mêmes résultats observés précédemment par Bongrain et al. ont été obtenus ici. En comparaison avec les tests obtenus en caractérisation électrochimiques, l'absence de greffages chimiques par la méthode 1 et 2 sur diamant oxydé a aussi été prouvée par mesure optique en essayant un greffage sur microlevier oxydé. En effet, aucun déplacement de fréquence significatif n'a été observé lors de l'exposition d'acide aminocaproïque ou de NTA sur un microlevier en diamant oxydé.

3.2.6.b Couplage EDC/NHS

La Figure 3.23, montre l'évolution de la fréquence de résonance du microlevier en diamant, préalablement fonctionnalisé par l'acide aminocaproïque, lors du couplage EDC/NHS (30 mM/60 mM) pendant plus de 3 h, lorsque cette expérience est reproduite 3 fois avec 3 microleviers identiques distincts.

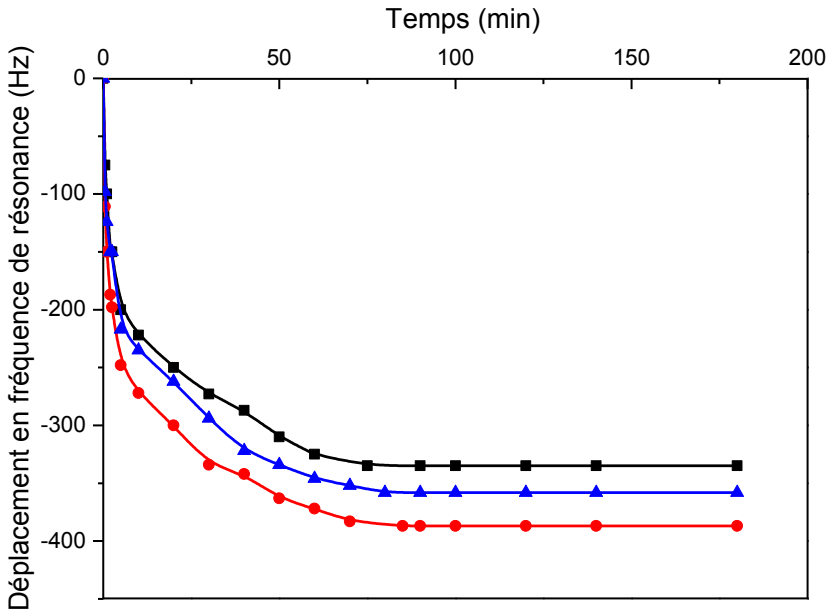


Figure 3.23 - Evolution de la fréquence de résonance de trois microleviers, préalablement fonctionnalisés par l'acide amino caproïque, lors du couplage EDC/NHS

Nous observons une réponse de la poutre qui se traduit par une diminution de sa fréquence de résonance durant le couplage EDC/NHS contrairement au phénomène observé pour l'immobilisation de l'acide aminocaproïque. Le déplacement de fréquence est d'environ 350 Hz. La cinétique de la réponse est d'environ 60 min avant d'atteindre un plateau de stabilisation. Cette variation négative de fréquence pourrait être expliquée par l'augmentation de masse sur la poutre, mais cette hypothèse est peu probable étant donné que l'on a vu qu'en milieu liquide les changements de fréquence de résonance étaient très peu sensibles à la masse. La variation observée est probablement liée à d'autres phénomènes tels que les effets hydrodynamiques liés à la forte électronégativité du groupement sulfo-NHS. Ceux-ci peuvent attirer des ions positifs de la solution à proximité de la surface du microlevier et ainsi accroitre localement la densité du fluide. On peut émettre également l'autre hypothèse qu'avant le couplage EDC/NHS il y avait de fortes interactions entre les terminaisons COO^- voisins de l'acide aminocaproïque greffées sur le diamant hydrogéné, ce qui rendait la surface du microlevier très contrainte électrostatiquement. Lors de la modification de surface grâce au couple EDC/NHS, les contraintes de surfaces sont libérées. Les contraintes sont donc réduites d'où une baisse de la fréquence de résonance.

3.2.6.c Immobilisation d'OBP

Après stabilisation dans une solution tampon, et après l'étape EDC/NHS, nous avons suivi l'évolution de l'immobilisation de l'OBP de porc (solution de wtOBPpig à une concentration de 1 mg/mL) sur le microlevier fonctionnalisé pendant plus de 3 h. Cette évolution est représentée sur la Figure 3.24 pour 3 microleviers identiques distincts. De telles variations de fréquence de résonance au cours de l'immobilisation de molécules d'OBP sur un microlevier paraissent surprenantes et n'ont jamais, à notre connaissance, été décrites dans la littérature. L'allure de la courbe d'immobilisation d'OBP observée montre une relativement bonne reproductibilité sur plusieurs microleviers fonctionnalisés dans les mêmes conditions. Pour chacun, on observe la même tendance d'évolution de la fréquence de résonance, avec (i) une augmentation rapide suivie d'une diminution rapide, (ii) une lente et progressive augmentation, (iii) la baisse de fréquence jusqu'à un pseudo pallier, puis (iv) le retour progressif à des valeurs proches des valeurs initiales jusqu'à un plateau final.

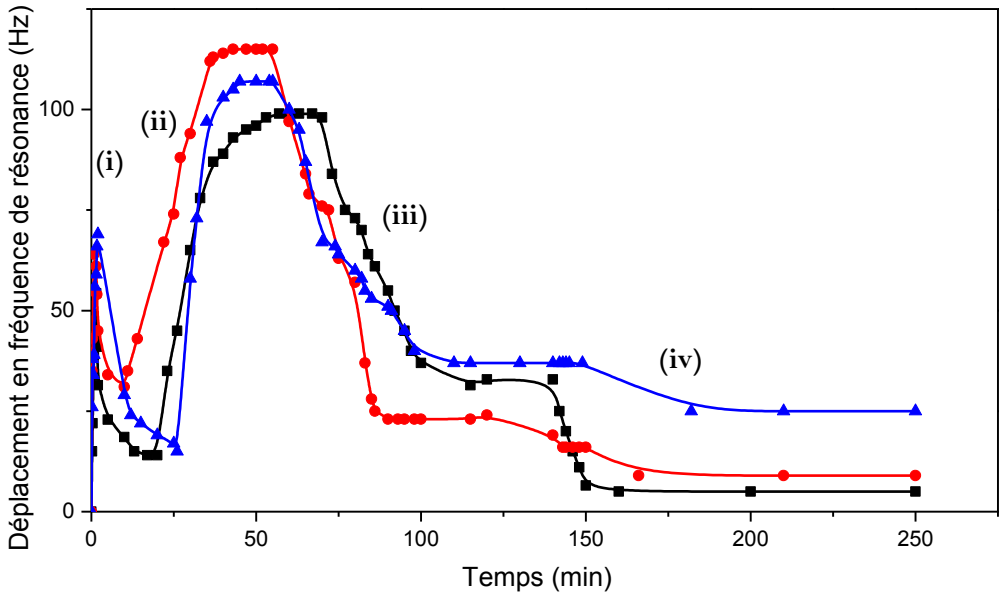


Figure 3.24 - Evolution de la fréquence de résonance de trois microleviers en diamant, préalablement fonctionnalisés par l'acide aminocaproïque suivi du couplage EDC/NHS, lors de l'immobilisation de wtOBPpig

Ce plateau de stabilisation final est atteint après environ 160 minutes. On peut alors supposer que ce temps correspond à l'équilibre à partir duquel le greffage de l'OBP est terminé. Cette valeur peut être corrélée à la valeur obtenue en spectroscopie d'impédance lors du suivi d'immobilisation sur électrode en diamant fonctionnalisé qui était d'environ 170 min en moyenne (figure 3.14).

La cinétique de greffage mesurée par impédance semblait suivre une croissance exponentielle classique. Il est probable que les déplacements en fréquence positifs et négatifs observés ici par vibrométrie laser, ne soient pas uniquement liés à la cinétique de greffage mais sûrement à des changements de régimes d'interactions tels que des contraintes électrostatiques, ou des effets stériques dus aux encombrements des OBP déposés sur la surface.

En reprenant les étapes de la figure 3.24, nous observons une évolution complexe, et notamment bien plus irrégulière que dans le cas du greffage de l'acide aminocaproïque. Nous devons considérer le fait que l'acide aminocaproïque est une molécule relativement simple par rapport à l'OBP. Aussi, les interactions intermoléculaires possibles qui intervenaient sur l'acide aminocaproïque avaient-elles été probablement bien identifiées. En revanche, dans le cas de l'OBP, qui est une molécule plus grande et plus complexe, d'autres paramètres peuvent intervenir et potentiellement induire ces changements de tendances de variation dans la fréquence de résonance. Le premier facteur pouvant intervenir au cours de l'immobilisation de l'OBP est la masse ajoutée en cas de déplacement en fréquence négatif. Cependant, nous avons vu que même si les OBP ont des masses molaires assez élevées, cet effet est probablement négligeable en liquide en raison du fort amortissement dans le liquide. Les autres effets possibles sont alors des variations de contraintes de surface dues à l'encombrement stérique des OBPs, ou à un changement de conformation éventuel des protéines durant le greffage. Les effets hydrodynamiques (interactions avec les ions en solutions) sont aussi possibles. Tous ces phénomènes évoluent de façon cumulée au cours du temps et rendent l'allure de la courbe de fréquence de résonance de l'immobilisation d'OBP complexe à interpréter.

Nous avions vu dans le chapitre 1 dans le cas du greffage de l'acide aminocaproïque, qu'une augmentation de densité de charges à la surface des poutres contribuait à augmenter la fréquence de résonance des microleviers. Ceci avait été associé aux contraintes électrostatiques liées au groupement acide. L'augmentation initiale brutale de la fréquence de résonance observée ici, dans le cas de l'immobilisation d'OBP, pourrait donc être en partie liée à l'augmentation de la densité de charges due à la présence des molécules d'OBP. Cette hypothèse semble peu plausible étant donné la nature des OBP et l'absence de groupements ioniques réguliers.

De plus, la vitesse de montée (i) étant particulièrement rapide, cela suggère plutôt un changement physique rapide de la solution, probablement à associer à la variation des propriétés physiques de la solution d'immobilisation et notamment de sa viscosité.

La deuxième phase montante (ii) peut, elle, être associée au greffage de l'OBP. Lorsque la couche d'OBP immobilisés devient trop compacte, l'élasticité de la poutre peut être modifiée de manière significative, ce qui explique la décroissance (iii) de la fréquence de résonance observée à partir d'une certaine densité de greffage critique. Comme évoqué précédemment le plateau (iv) correspond certainement à une saturation de la surface. Le Tableau 3.1 résume les valeurs de variation de fréquence de résonance observée dans le cas d'étude de la méthode de greffage 1.

Tableau 3.1 - Résumé des variations de fréquence de résonance mesurées au cours de la méthode de greffage 1 (les moyennes sont établies à partir des valeurs mesurées sur 5 poutres)

	Suivi en temps réel			
	Δf (Hz)	± Ecart type (Hz)	Durée de stabilisation (min)	± Ecart type (min)
Greffage acide aminocaproïque	+ 20	± 6	8	1
Couplage EDC/NHS	- 350	± 52	60	7
Immobilisation OBP (*) *(*) pris à t = 150 min*	+ 10	± 29	150	16

3.2.6.d Immobilisation d'OBP à différentes concentrations

Nous avons discuté ci-dessus des différents facteurs qui pourraient expliquer les variations de fréquences observées par vibrométrie laser lors de l'immobilisation des OBP. Les effets sont à associer aux propriétés physiques de la solution, mais aussi aux différents régimes d'interactions qui peuvent exister entre les OBP et la surface du microlevier fonctionnalisé. Dans l'hypothèse où le changement de sens de variation de fréquence de résonance observé au cours du greffage est bien lié à un changement de régimes d'interactions entre les OBP et la surface, il devient intéressant d'étudier la réponse des poutres au greffage des OBPs lorsque les concentrations d'OBP varient. La Figure 3.25 compare ainsi la réponse pour 3 concentrations : la concentration initiale (1 mg/mL), une concentration de 0,5 mg/mL soit une solution d'OBP deux fois moins concentrée, et une concentration de 0,1 mg/mL soit une solution dix fois moins concentrée.

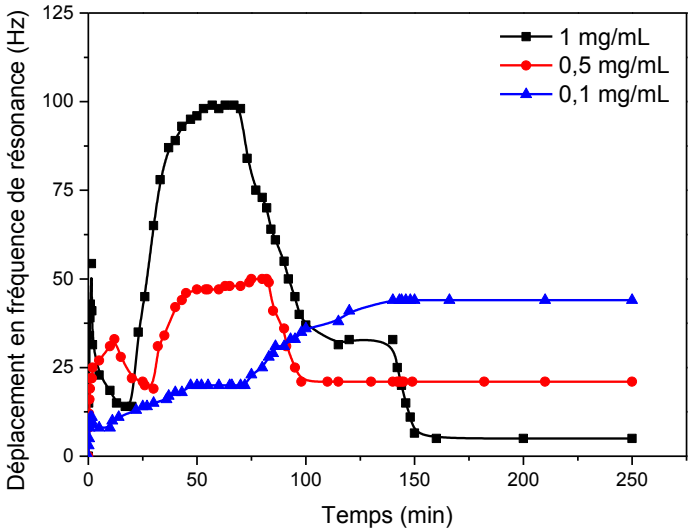


Figure 3.25 - Evolution de la fréquence de résonance de trois microleviers en diamant, préalablement fonctionnalisé par l'acide amino caproïque suivi du couplage EDC/NHS, lors de l'immobilisation de wtOBPpig à une concentration de 1 mg/mL (noir), à une concentration de 0,5 mg/mL (rouge) et à une concentration de 0,1 mg/mL (bleu)

De même, en diluant davantage la solution de wtOBPpig jusqu'à 50 fois par rapport à la concentration de départ, soit une valeur de 0,02 mg/mL, nous avons tracé sur la Figure 3.26 la cinétique d'immobilisation d'OBP sur microlevier.

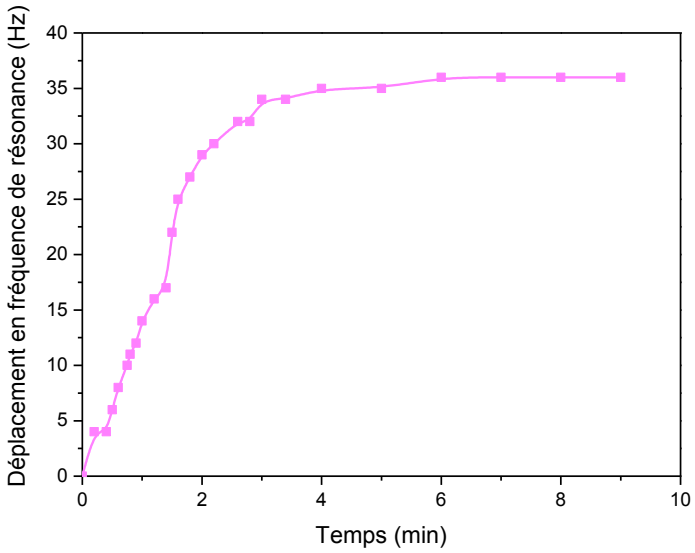


Figure 3.26 - Evolution de la fréquence de résonance de trois microleviers en diamant, préalablement fonctionnalisés par l'acide amino caproïque suivi du couplage EDC/NHS, lors de l'immobilisation de wtOBPpig à une concentration de 0,02 mg/mL

On remarque dans ce dernier essai que la tendance de la courbe est bien différente de celle observée précédemment et se rapproche plus d'une croissance exponentielle classique, avec une croissance monotone de la fréquence de résonance d'une trentaine de Hz avec une cinétique d'immobilisation d'environ 3 min. On peut alors supposer ici que les molécules d'OBP immobilisés à la surface sont trop éloignées pour interagir entre elles, et que les interactions prédominantes sont celles des OBP avec les ions en solution.

3.3 Détections de composés chimiques en milieu liquide

3.3.1 Détection de l'IBMP, du 2,4-DNT et du 4-NT

3.3.1.a Performances des capteurs

L'évolution du déplacement en fréquence de résonance a aussi été utilisée pour suivre la détection de composés organiques chimiques sur des microleviers fonctionnalisés LBP par les méthodes 1 ou 2.

Afin de se rapprocher des besoins du projet SNIFFER et de la détection d'explosifs, nous avons étudié des molécules cibles proches de composés explosifs et notamment le 2,4-DNT et le 4-Nitrotoluène (4-NT). En particulier, le 2,4-DNT est un analogue de structure proche de celle du trinitrotoluène (TNT).

En parallèle, le 2-isobutyl-3-méthoxypyrazine (IBMP) a aussi été utilisé car il s'agit d'un des principaux ligands utilisés dans la littérature pour caractériser des OBP. En effet, cette molécule odorante est souvent considérée comme une référence de détection comme évoqué dans les chapitres 1 et 2.

La détection de l'IBMP, du 2,4-DNT et du 4-NT ont été réalisées avec des microleviers en diamant fonctionnalisés dans un premier temps par des OBP, puis dans un second temps par des MUP.

La Figure 3.27 montre la réponse caractéristique à une exposition de 1,2 mM d'IBMP pour 2 capteurs fonctionnalisés avec aca-m6hisOBPpig par la méthode 1 et par NTA-Ni-m6hisOBPpig par la méthode 2. Les réponses semblent suivre ici une croissance exponentielle avec un plateau atteint dans ce cas au bout de typiquement 10 min. Différentes expositions aux différents composés cibles à des concentrations différentes, dans la gamme 60 µM à 1,32 mM, ont ensuite été testées sur ces microleviers fonctionnalisés par wtOBPpig ou m6hisOBPpig..

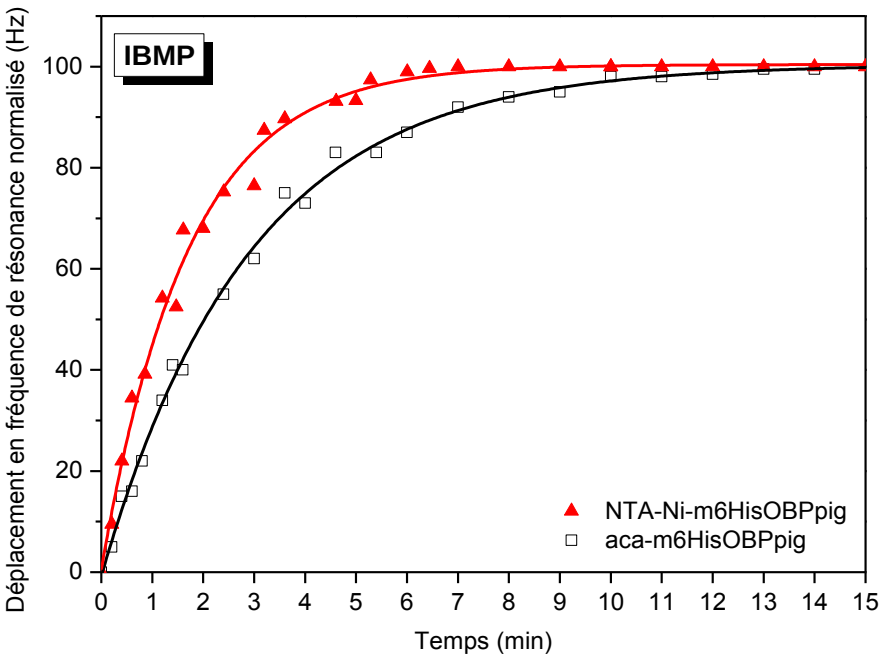


Figure 3.27 - Courbes typiques de détection de l'IBMP à une concentration spécifique de 1,2 mM de deux microleviers de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig

Les courbes de calibration pour différentes concentrations d'IBMP, du 2,4-DNT, 4-NT pour des microleviers de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig, en prenant pour valeurs les valeurs de fréquences mesurées au plateau, sont respectivement illustrées dans la Figure 3.28, la Figure 3.29 et la Figure 3.30. Chaque déplacement en fréquence illustré dans ces figures est la moyenne des valeurs obtenues pour les déplacements en fréquence de 5 microleviers différents fonctionnalisés dans les mêmes conditions et exposés aux mêmes gammes de concentrations en composés à détecter.

Le Tableau 3.1 résume pour chaque capteur les valeurs de sensibilité correspondant à la pente des droites de calibration, ainsi que les vitesses de détection représentées ici par les constantes de temps données à différentes concentrations. Le RSD (relative standard deviation) est défini comme étant la valeur absolue de l'écart type (également nommé écart type relatif) et est souvent exprimé en pourcentage.

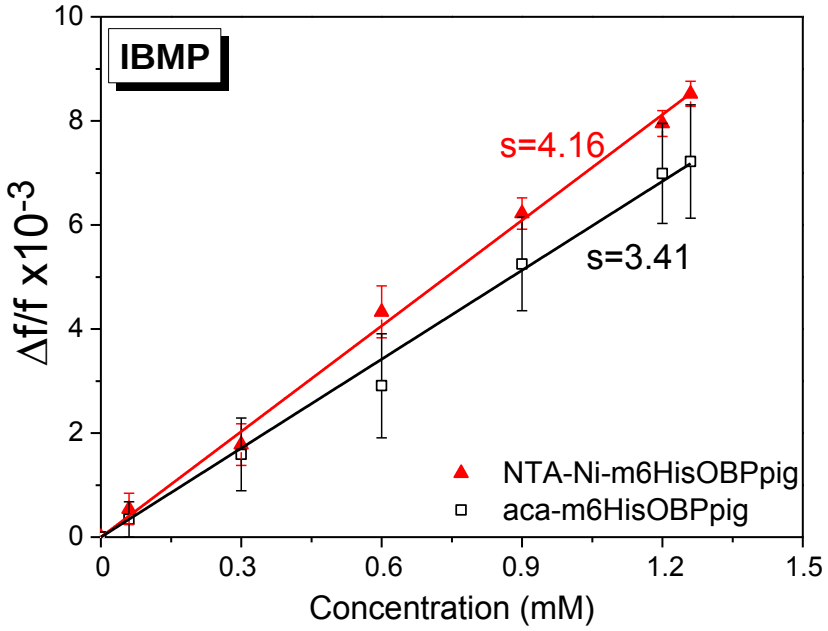


Figure 3.28 - Courbes de calibration de détection pour différentes concentrations d'IBMP pour des microleviers sur lesquels sont immobilisées des OBP de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig

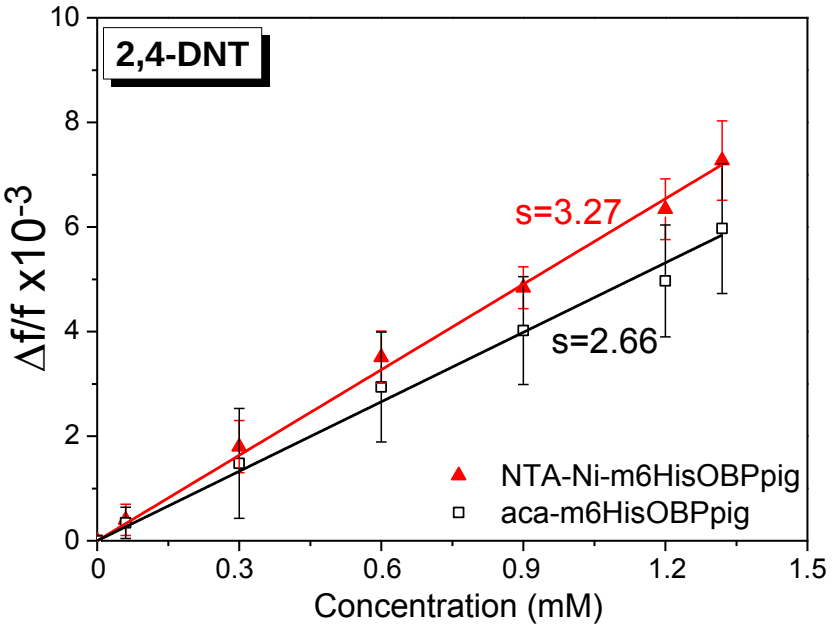


Figure 3.29 - Courbes de calibration de détection pour différentes concentrations du 2,4-DNT pour des microleviers sur lesquels sont immobilisées des OBP de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig

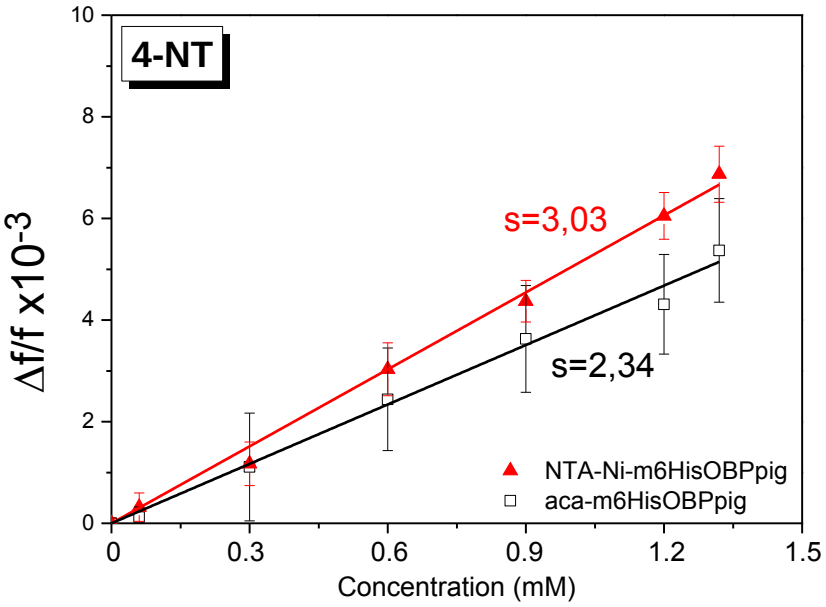


Figure 3.30 - Courbes de calibration de détection pour différentes concentrations du 4-NT pour des microleviers sur lesquels sont immobilisées des OBP de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig

Tableau 3.2 - Comparaison de la sensibilité s et de la constante de temps τ pour des détections de l'IBMP et du 2,4-DNT pour des microleviers de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig

	IBMP				2,4-DNT			
	Méthode de greffage							
	NTA-Ni-m6hisOBPpig		aca-m6hisOBPpig		NTA-Ni-m6hisOBPpig		aca-m6hisOBPpig	
Sensibilité s (*10^{-3})	4,16		3,41		3,27		2,66	
		RSD %		RSD %		RSD %		RSD %
τ (min) à [1,2 mM]	1,54 ± 0,1	6,5	2,23 ± 0,7	31,39	2,71 ± 0,3	11,67	3,42 ± 1,5	43,86
τ (min) à [0,6 mM]	4,22 ± 0,2	4,74	5,59 ± 1,0	17,89	7,72 ± 0,3	3,89	11,22 ± 3,1	27,63
τ (min) à [0,3 mM]	10,87 ± 0,5	4,6	11,09 ± 1,3	11,72	12,38 ± 0,7	5,65	15,05 ± 3,4	22,59

Comme expliqué dans le chapitre 1, l'adsorption des molécules sur la surface d'un microlevier en milieu gaz conduit généralement à une augmentation de la masse effective, ce qui se traduit généralement par une diminution de la fréquence de résonance. Cependant, nous avons vu qu'en milieu liquide, la sensibilité à la masse est réduite due aux effets d'amortissement. Dans ce cas, la fréquence de résonance peut alors être influencée par les interactions hydrodynamiques et/ou par des variations de contraintes de surface.

Etant donné que les molécules odorantes, dans notre cas d'étude, ne sont pas impliquées dans des transferts de charge avec l'OBP, on suppose alors que la charge de la surface greffée du microlevier ne sera pas suffisamment affectée lors de la présence de composés organiques à détecter. La réponse des capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig et aca-m6hisOBPpig aux composés étant positive, nous pouvons alors supposer que la réponse de détection provient, probablement et principalement, de variation des contraintes de surface.

On peut noter qu'une réponse positive pourrait être liée à une perte de masse attribuée à un détachement des OBPs lors des changements de conformation. Cette hypothèse semble peu probable étant donné que les réponses sont complétement réversibles et cela même après plusieurs cycles de détection/dissociation. De plus, les images obtenues en fluorescence montrent que, même après plusieurs étapes de détection, la présence d'OBP à la surface du microlevier restait confirmée.

La réponse des microleviers peut être principalement due à des variations de stress de surface provoqués par des changements de conformation des protéines lors de la liaison avec les ligands. Même si ces changements de conformation sont connus pour être assez faibles chez l'OBP de porc, une sensibilité significative a été observée ainsi qu'une relation linéaire entre la concentration des ligands et les variations de fréquence de résonance. Il a été montré, dans la littérature, que la liaison avec une molécule odorante pouvait induire un changement de conformation dans la cavité de l'OBP. Ces changements de conformation et de structures peuvent modifier les propriétés spectrales des protéines. Ils sont généralement étudiés par spectroscopie UV ou FTIR (infra-rouge à transformée de Fourier). Ces changements de conformation dépendent du type d'OBP et de type de la molécule odorante ainsi que la conformation du ligand à l'intérieur de la cavité de l'OBP [7]. Les structures cristallographiques des OBP de porc complexées à des molécules odorantes ont, d'ailleurs, montré que différents types de molécules pouvaient interagir dans leur cavité avec des conformations alternatives. Ceci confirme bien que les OBP de porc peuvent se lier à de nombreuses molécules appartenant à différentes classes chimiques. Ces changements de conformation et les variations de contraintes de surface qui en résultent, peuvent ainsi, au moins partiellement, expliquer la réponse des microleviers. Le fait que l'OBP de porc peut se lier à plusieurs molécules justifie sûrement les différences relativement faibles entre les sensibilités des composés IBMP et 2,4-DNT.

Le déplacement en fréquence le plus important observé a été de 300 Hz pour le cas d'un capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig lors d'une exposition d'IBMP à une concentration proche de 1,32 mM. L'évolution de la fréquence de résonance en milieu liquide est décrite par l'équation 1.11 détaillées dans la section 1.2.5.b.ii. La variation d'élasticité obtenue dans ces conditions et calculée à partir de l'équation 1.13 est d'environ 1,7 $N.m^{-1}$.

Etant donné que le coefficient d'élasticité effectif est important, approximativement k=100, cela correspond alors à une variation d'élasticité d'environ 1,7%.

Cette variation reste, cependant, faible en comparaison à la sensibilité de microleviers en diamant greffés avec des groupements acide carboxyliques qui présentaient un Δk important à hauteur de 6% lors de la déprotonation de l'acide à la surface du microlevier [2]. Ceci semble confirmer, donc, que de faibles changements de conformation des OBP peuvent avoir lieu à la surface. Par exemple, la sensibilité correspondante de l'IBMP à travers les variations d'élasticité est de 0,163 $Hz.mN^{-1}.m$ pour le capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig et de 0,161 $Hz.mN^{-1}.m$ pour le capteur aca-Ni-m6hisOBPpig. Cette sensibilité est très faible lorsqu'elle est comparée à la réponse de sensibilité des capteurs en diamants face à de l'ADN (hybridation de 32 bases) [8]. Dans ce dernier cas, la sensibilité est importante à cause des effets stériques importants dus à l'augmentation de la densité des brins d'ADN et de la charge sur la surface. Cependant, la sensibilité des microleviers en diamant est suffisamment conséquente pour nous permettre de suivre le ligand se lier aux OBP dans l'ordre du µM.

Comme observé dans le tableau ci-dessus, les capteurs (tous confondus) ont une sensibilité plus grande et un temps de réponse plus rapide pour l'IBMP comparé au 2,4-DNT. Cela peut être corrélé avec le fait que l'OBP de porc a une constante d'affinité très forte pour ce composé [9, 10, 11] ($Ka=4,6\ M^{-1}$) comme précisé dans le chapitre 2. Cet OBP présente 1 Ka de 1,1 pour le 2,4-DNT, cela explique probablement pourquoi la sensibilité à ce composé est faible que celle à l'IBMP.
La sensibilité des capteurs au 2,4-DNT reste tout de même importante, ce qui confirme que les OBP de porc sont sensibles aux composés aromatiques comme décrit dans la littérature [11]. Cet OBP a une Ka de 1,6 M^{-1} pour le 4-NT, supérieure à celle trouvée pour le 2,4-DNT. Or dans notre cas, la sensibilité au 4-NT semble plus faible alors que l'on s'attendrait à avoir une plus forte sensibilité étant donné la constante d'affinité plus importante pour le 4-NT. La cinétique de réponse semble plus lente aussi dans le cas du 4-NT. Dans tous les cas de détection, nous pouvons souligner que les sensibilités restent assez proches, ce qui peut être justifié par le fait que l'OBP de porc est connu pour sa capacité à se lier à un large panel de composés organiques (non-spécificité).

Comme observé aussi dans le Tableau 3.2, dans cette étude, tous les capteurs fonctionnalisés avec la méthode 2, NTA-Ni-m6hisOBPpig, sont significativement plus sensibles que les capteurs fonctionnalisés avec la méthode 1, aca-m6hisOBPpig à tous les composés à détecter. Ils sont typiquement 20% plus sensibles. Ceci pourrait être expliqué par un meilleur accès aux sites actifs de la protéine pour les molécules odorantes car, comme évoqué dans le chapitre 1 et 2, le tag 6his est situé à l'opposé de la cage réceptrice d'odeurs de l'OBP.

On suppose donc que la méthode 2 de fonctionnalisation (NTA-Ni) permet une immobilisation orientée des OBP avec la cage plus ouverte vers l'extérieur et donc plus disponible à capturer les molécules organiques. Une autre explication de cette sensibilité plus importante peut être liée au fait que l'immobilisation de protéines est plus importante en utilisant la méthode 2 comme cela a pu être observé par les caractérisations électrochimiques (Figure 3.11) avec une augmentation plus importante de Rt dans le cas d'immobilisation d'OBP taggué 6his. Un greffage NTA-Ni plus conséquent sur la surface, comparé au greffage de l'acide aminocaproïque, permet aussi une immobilisation d'OBP plus importante. Ainsi, la présence plus importante d'OBP sur le microlevier permet, comme nous pouvons l'estimer, une détection plus importante de composés organiques.

Les capteurs fonctionnalisés avec la méthode 2 se sont avérés généralement plus reproductibles que ceux fonctionnalisés avec la méthode 1. En effet, ce phénomène est facilement observable avec les écarts type plus faibles pour les capteurs de type NTA-Ni-m6hisOBPpig par exemple. Cette meilleure reproductibilité pourrait être expliquée par le fait qu'avec la méthode 1, les OBP s'immobilisent de façon aléatoire sur la surface, et que les nombres de sites actifs accessibles varient aléatoirement d'un capteur à l'autre, étant donné que la densité de greffage d'OBP est variable dans ce cas. Ceci peut produire un écart significatif dans les réponses de détection et les écarts type associés. A contrario, les capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig offrent une orientation plus contrôlée pour tous les OBP en surface et offrent le même nombre de sites actif de liaison lors de chaque greffage, ce qui conduit à des réponses de détection plus reproductibles en apportant a priori une densité d'immobilisation d'OBP constante d'un capteur à l'autre. Une autre hypothèse, bien sûr, serait que le greffage par la méthode 1 est moins reproductible en termes de rendement de greffage des LBP.

3.3.1.b Comparaison entre différents OBP et MUP

Plusieurs OBP et MUP ont été étudiés en termes de sensibilité aux composés IBMP et 2,4-DNT et aussi en termes de vitesse de détection. Les expériences ont été menées dans les mêmes conditions c'est-à-dire avec les mêmes concentrations et temps de greffage (méthode 1 ou 2, t=2 h), avec les mêmes concentrations d'LBP (1 mg/mL) et dans les mêmes gammes de concentrations pour la détections de ces 2 composés (entre 60 µM et 1,32 mM).

La Figure 3.31 résume les différentes sensibilités des OBP et des MUP envers l'IBMP et la Figure 3.33 envers le 2,4-DNT. La Figure 3.32 résume les différentes constantes de temps des OBP et des MUP envers l'IBMP et la Figure 3.34 envers le 2,4-DNT.

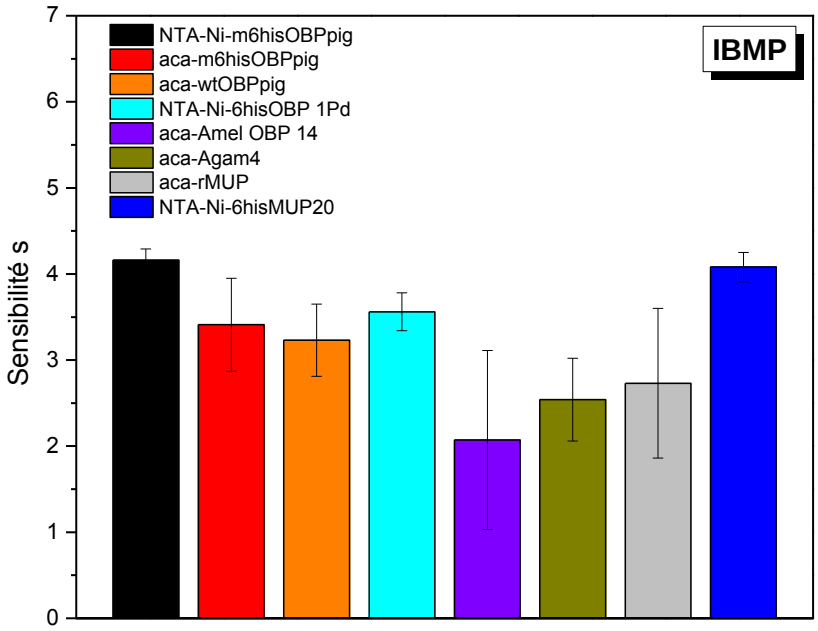


Figure 3.31 - Comparaison de la sensibilité s pour une détection de l'IBMP pour des microleviers avec différents types d'OBP et de MUP

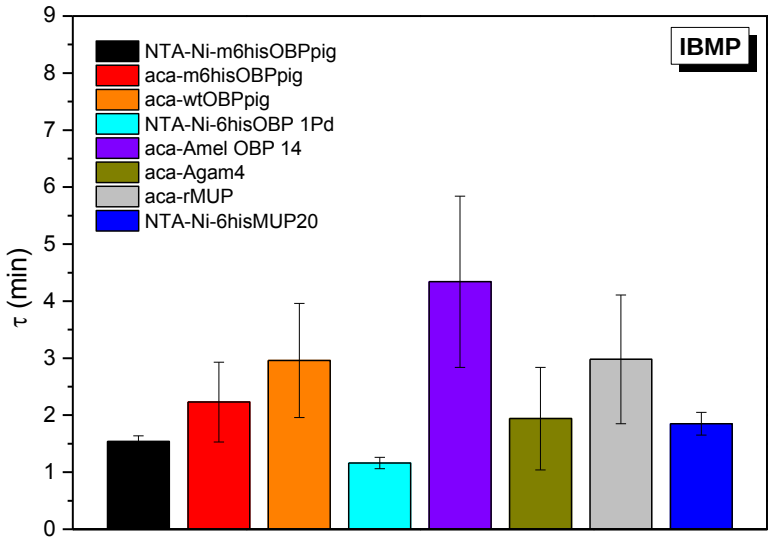


Figure 3.32 - Comparaison de la vitesse de détection grâce à la constante de temps τ pour une détection de l'IBMP pour des microleviers avec différents types d'OBP et de MUP

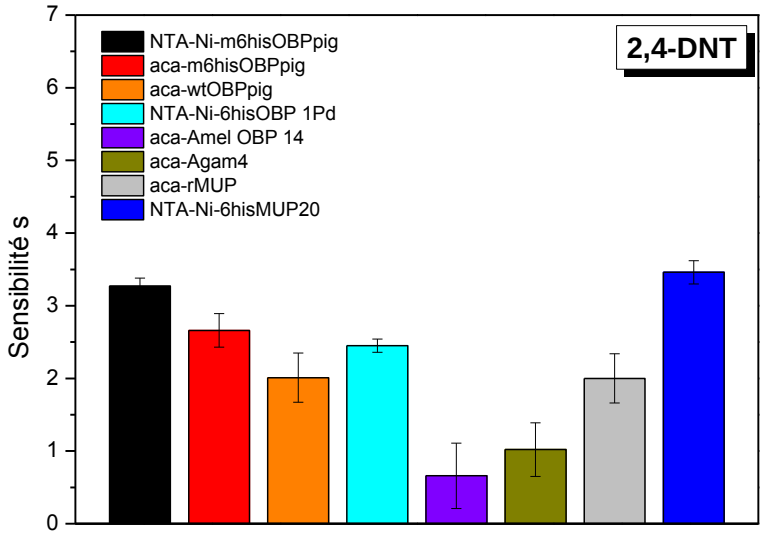


Figure 3.33 - Comparaison de la sensibilité s pour une détection du 2,4-DNT pour des microleviers avec différents types d'OBP et de MUP

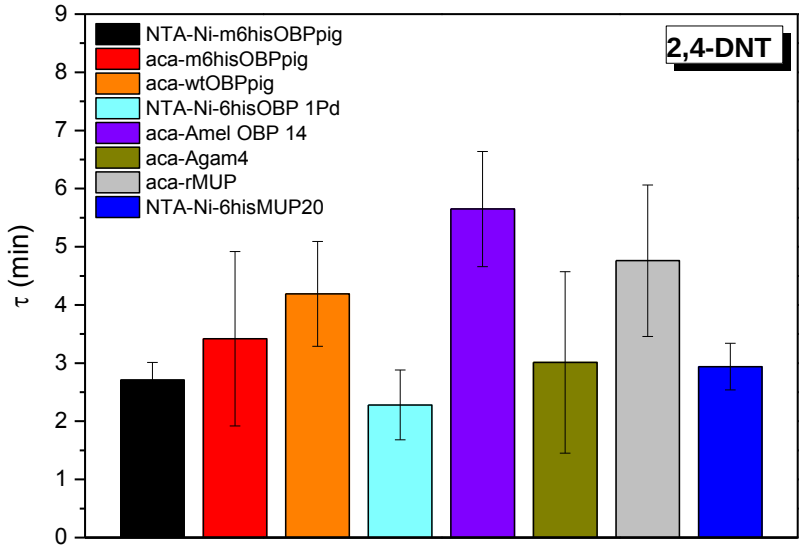


Figure 3.34 - Comparaison de la vitesse de détection grâce à la constante de temps τ pour une détection du 2,4-DNT pour des microleviers avec différents types d'OBP et de MUP

On remarque que, globalement la sensibilité est relativement proche selon l'OBP utilisé, ce qui confirme la non-sélectivité des protéines olfactives de type LBP. Les fonctionnalités m6hisOBPpig, 6hisOBP1Pd et 6hisMUP20 semblent être les LBP les plus sensibles à l'IBMP et au 2,4-DNT et les plus rapides à détecter. L'OBP 6hisAmel14 et le MUP rMUP semblent les moins performants en termes de sensibilité et de temps de réponse. Ces résultats peuvent être corrélés à ceux observés par l'équipe de l'université de Manchester et celle de Padova qui ont étudié les constantes d'association et de dissociation de ces LBP envers les composés explosifs et dérivés d'explosifs tels que le 2,4-DNT par exemple. Certains des résultats observés dans notre étude semblent confirmer les affinités trouvées dans les études précédentes. L'OBP de porc mutant, m6hisOBPpig, a une constante d'affinité Ka d'environ 1,4 M^{-1} envers le 2,4-DNT et pour l'OBP sauvage wt6hisOBPpig, Ka=0,4 M^{-1}. Selon nos résultats, l'OBP m6hisOBPpig semble être plus spécifique au 2,4-DNT. Comme attendu, il est bien l'OBP le plus sensible au 2,4-DNT, avec une vitesse de détection la plus rapide du panel d'OBP. Le 6hisMUP20 (Ka=0,7 M^{-1}) est aussi très sensible à ce composé, en comparaison à la forme sauvage de rMUP (Ka=0,5 M^{-1}). Cet aspect a bien été souligné dans les études d'affinité effectuées par l'université de Padova. On peut aussi souligner le fait que l'OBP d'abeille Amel OBP 14 (Ka=0,2 M^{-1}) possède peu d'affinité avec le DNT, ce qui a été mis en évidence à de nombreuses reprises dans le chapitre 2. D'après les résultats de l'équipe de Manchester, nous aurions dû nous attendre à une meilleure sensibilité pour l'OBP de moustique Agam4 (Ka=1,0 M^{-1}) envers le 2,4-DNT. Il est possible qu'en utilisant la méthode 1 de greffage, la sensibilité de cet OBP soit moindre que celle attendue. Nous aurions, aussi, dû nous attendre à une sensibilité plus faible pour l'OBP de guêpe 6hisOBP1Pd (Ka=0,3 M^{-1}) envers le 2,4-DNT. Des études, menées par l'université de Manchester, ont montré que la constante d'association du m6hisOBPpig envers l'IBMP est d'environ 4,6 M^{-1} et que la Ka du P.domin OBP est de 0,25 M^{-1}.

3.3.1.c Stabilité des capteurs au cours du temps

Une étude non exhaustive de la stabilité des OBP et des MUP a aussi été menée. Des expériences de détection ont été réalisées avec un même microlevier fonctionnalisé, 2 mois après une première mesure de détection avec peu de changement significatif au niveau de la sensibilité du capteur. L'exemple du capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig est illustré sur la Figure 3.35. La détection de l'IBMP à une concentration de 1,2 mM par ce même capteur 2 mois après l'immobilisation d'OBP a montré une diminution des déplacements en fréquence de plus 10% par rapport à la réponse du même capteur fraichement préparé. Dans le cas du capteur NTA-Ni-6hisMUP20 exploité 2 mois plus tard pour une détection de l'IBMP à une concentration spécifique de 1,2 mM, une diminution des déplacements en fréquence de moins de 5% est observée, ce qui peut laisser suggérer que ce type de capteurs est plus stable au cours du temps (Figure 3.36).

Ce phénomène peut être lié au fait que les MUP sont des protéines plus stables dans la nature et dans l'air étant donné qu'elles sont présentes majoritairement dans les urines et permettent par exemple le marquage d'un territoire par une espèce animale pendant un temps relativement long dans l'air ambiant.

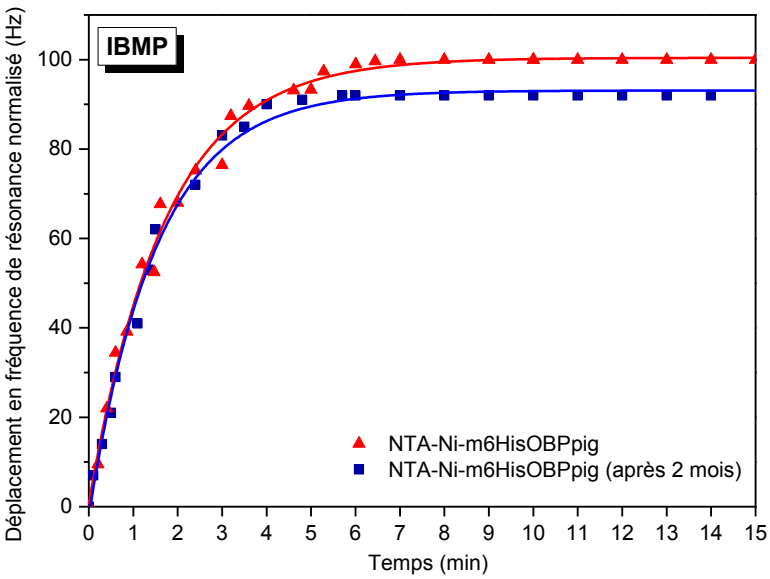


Figure 3.35 - Courbes de détection de l'IBMP à une concentration spécifique de 1,2 mM d'un microlevier de type NTA-Ni-m6hisOBPpig 2 mois après l'immobilisation d'OBP

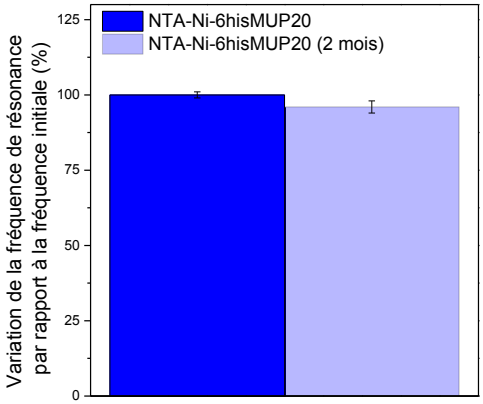
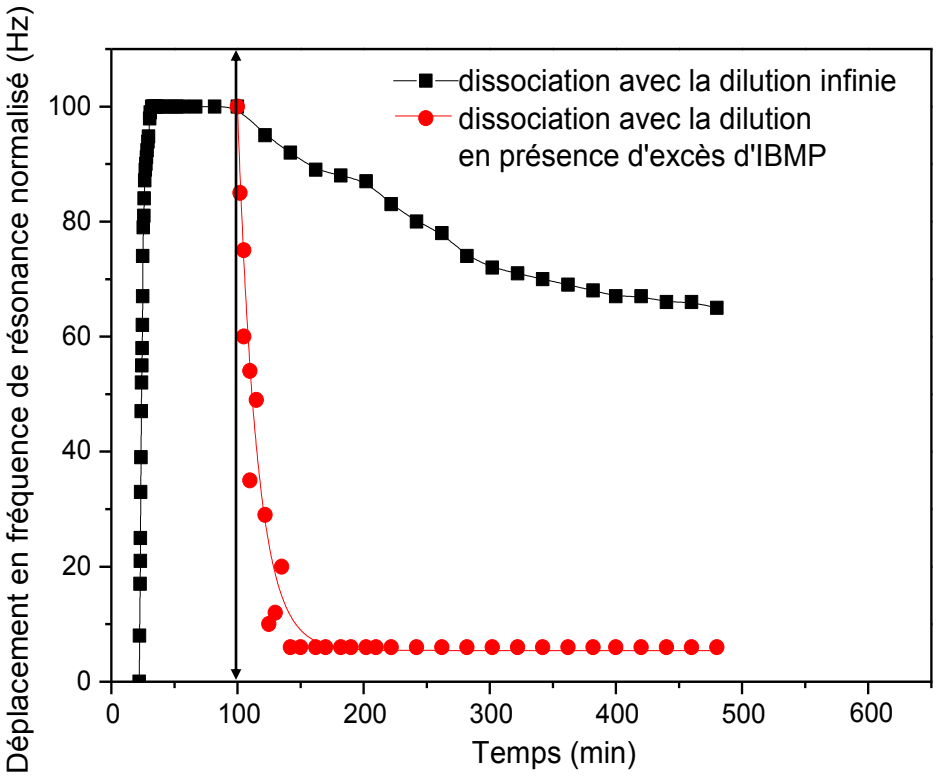


Figure 3.36 - Comparaison de la variation relative de fréquence de résonance entre la poutre initiale NTA-Ni-6hisMUP20 et cette même poutre lors d'une mesure de détection de l'IBMP à une concentration spécifique de 1,2 mM, 2 mois après l'immobilisation du MUP

3.3.1.d Phénomène de dissociation

Après ces étapes de détection, un microlevier NTA-Ni-m6hisOBPpig est placé dans la cellule en milieu liquide et rincé vigoureusement avec une solution tampon à pH 8 durant plusieurs minutes. Une diminution de la fréquence de résonance est alors observable, illustrant la dissociation des molécules odorantes et des OBP. Cela confirme bien que les OBP se lient avec les ligands de manière réversible car les OBP relarguent les odeurs après un certain moment. La dissociation de l'IBMP des m6hisOBPpig a été examinée sous 2 conditions différentes : la "dilution infinie" [12, 13, 14] soit une dilution d'un facteur 50, et la 2ème condition en présence d'excès de ligand.



37 - Courbes de dissocation de l'IBMP en utilisant 2 conditions de dilution différentes pour un capteur m6hisOBPpig

Le déplacement de fréquence a alors été mesuré (la dilution commence à t=100 min) visible sur la Figure 3.37. En utilisant la condition d'une dilution infinie, on observe une diminution de la fréquence de résonance mais celle-ci reste faible à moins de 20% de signal perdu après 1h et moins de 35% du signal en moins après 6h. Elle est modérée et lente, comparée à la dilution en présence d'excès de ligand.

Selon Delean et al., il a été prouvé que la dissociation de ligand était bien plus rapide en présence d'excès de ligand, car le relargage en présence de compétiteurs est plus rapide. Dans cette étude, nous trouvons une constante temps, liée à la dissociation infinie d'environ 223 min, alors qu'elle n'est que de 15 min pour une dilution en présence d'excès de ligand. Selon Weiland et al., après le début de la dissociation, si l'expérience est effectuée de façon correcte et pendant un temps suffisamment longtemps, toute liaison entre le ligand et OBP est censée être atténuée puis disparaitre. Ce qui confirme le comportement « normal » de l'OBP et le fait que celui-ci soit bien opérationnel lorsqu'il est immobilisé sur le microlevier en diamant. En effet, un OBP doit être capable de capturer une molécule odorante à un instant précis puis de la relarguer après un certain temps pour pouvoir être à nouveau capable de piéger d'autres molécules odorantes environnantes et ainsi de suite.

3.3.2 Détection de composés organiques grâce aux microleviers fonctionnalisés avec des OR

Après avoir optimisé l'immobilisation des récepteurs olfactifs sur surface diamant par spectroscopie d'impédance, la détection de certains composés organiques a aussi été réalisée avec les OR immobilisés sur des microleviers préalablement fonctionnalisés avec la méthode 1 ou 2. Ici, on a suivi l'évolution des fréquences de résonance lors d'exposition à différentes concentrations des composés suivants : acétophénone, 2-octanone, hélional et androsténone pour des capteurs NTA-Ni-ORM71, aca-OR7D4 et aca-OR1740. Ces composés spécifiques ont été choisis suivant les conseils de nos partenaires de l'équipe NOeMi (INRA) car ils sont connus pour être de bons contrôles positifs et négatifs pour ces récepteurs olfactifs. En effet, d'après plusieurs publications précédentes de leurs travaux et de résultats observés en SPR, on peut souligner le fait que l'OR M71 se lie fortement à l'acétophénone et que le contrôle négatif de l'OR M71 est le 2-octanone [15]. L'OR1740 se lie fortement à l'hélional. Le cmyc OR7D4 se lie fortement à l'androsténone et très peu à l'hélional. La Figure 3.38 illustre les courbes typiques de détection de l'acétophénone et du 2-octanone à une concentration spécifique de 10 µM pour deux microleviers de type NTA-Ni-ORM71. On observe une importante différence dans le déplacement en fréquence, qui est environ 6 fois plus grand dans le cas de détection de l'acétophénone comparé au 2-octanone.

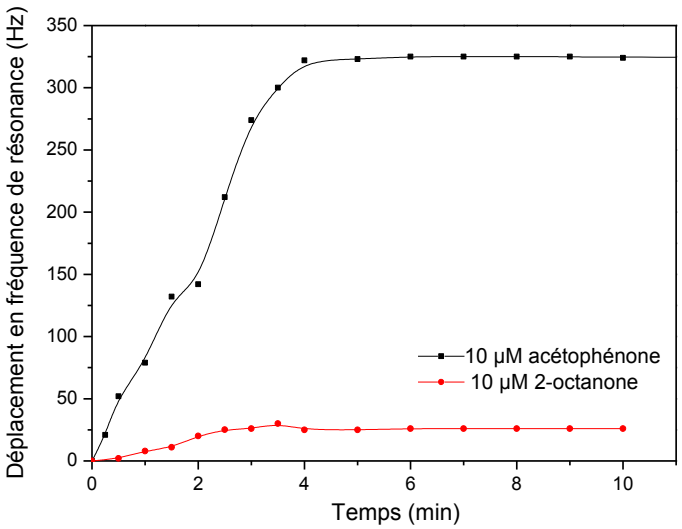


Figure 3.38 - Courbes typiques de détection de l'acétophénone et du 2-octanone à une concentration spécifique de 10 µM de deux microleviers de type NTA-Ni-ORM71

L'expérience a été renouvelée pour une concentration de 1 µM en acétophénone et en 2-octanone. La Figure 3.39 résume les déplacements en fréquence des microleviers NTA-Ni-ORM71 lors d'une exposition d'acétophénone et de 2-octanone à 10 µM et 1 µM. La détection du 2-octanone à 1 µM est très faible puisqu'elle est seulement de 5 Hz au-dessus du bruit, alors que le niveau de bruit ici est estimé à environ 7 Hz.

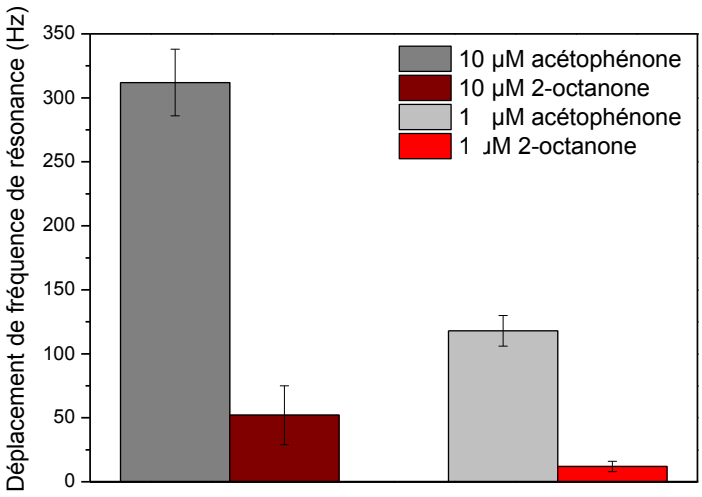


Figure 3.39 - Déplacement en fréquence d'un capteur NTA-Ni-ORM71 lors d'une l'exposition d'acétophénone et de 2-octanone à 10 µM et à 1 µM

Nous pouvons souligner que le récepteur ORM71 semble spécifique à l'acétophénone, avec beaucoup moins d'affinité avec le 2–octanone, ce qui confirme les observations passées pour ce récepteur olfactif [15]. Pour vérifier que la spécificité du capteur NTA-Ni-ORM71 envers le composé acétophénone provient bien de l'ORM71 immobilisé sur le capteur en diamant, nous avons comparé, comme illustré sur la Figure 3.40, les déplacements en fréquence des capteurs NTA-Ni-ORM71 et des capteurs NTA-Ni sans aucun ORM71 immobilisé à la surface, lors d'expositions à l'acétophénone et au 2-octanone à une concentration de 1 µM.

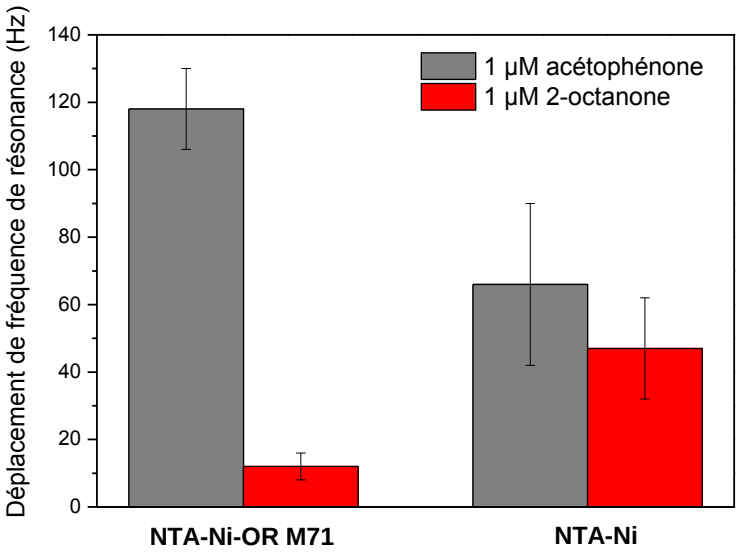


Figure 3.40 - Comparaison des déplacements en fréquence d'un capteur NTA-Ni-ORM71 et d'un capteur NTA-Ni (sans ORM71) lors d'une l'exposition d'acétophénone et de 2-octanone à 1 µM

On observe bien que la spécificité envers le composé acétophénone est bien due à la présence du récepteur olfactif ORM71 car lorsqu'il n'est pas présent la variation de fréquence est moindre. L'immobilisation d'ORM71 sur la surface du microlevier semble, par ailleurs, limiter la détection du 2-octanone. En effet, lorsque l'ORM71 n'est pas immobilisé, le déplacement de fréquence est alors multiplié par 3. L'ORM71, ce qui semble, donc, inhiber sa détection. L'explication de cette inhibition reste toujours à trouver. Le 2-octanone peut servir de contrôle négatif pour l'ORM71 étant donné le fait qu'il ne répond pas favorablement à une détection du 2-octanone. Il est possible que les composés (acétophénone et 2-octanone) aient tendance à s'adsorber sur une surface NTA-Ni en l'absence de ORM71 de façon probablement non-spécifique.

La Figure 3.41 montre la détection de l'androsténone et de l'hélional à 10 µM et 1 µM avec un capteur aca-OR7D4. L'OR7D4 semble plus sensible ici à l'androsténone qu'à l'hélional. Ce résultat confirme la grande affinité de l'OR7D4 pour l'androsténone comme relevé dans la littérature [15].

Globalement ces expériences semblent démontrer que les OR greffés sont fonctionnels lorsque greffés sur les transducteurs diamant.

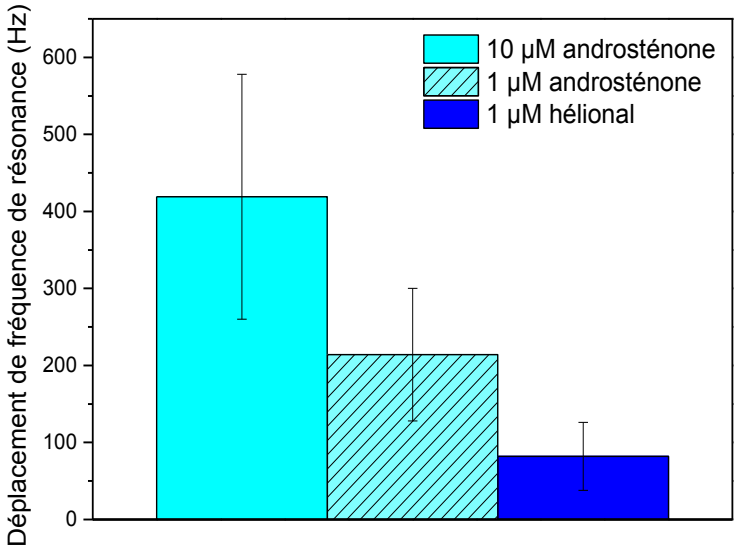


Figure 3.41 - Déplacement en fréquence d'un capteur aca-OR7D4 lors d'une l'exposition d'androsténone et d'hélional à 10 et 1 µM

3.4 Conclusion

Nous avons vu dans ce chapitre, deux différentes méthodes de greffage pour immobiliser les LBP sur des surfaces de microleviers en diamant. La méthode 1 résultant d'une immobilisation non orientée, à l'inverse de la méthode 2. L'immobilisation des protéines sur diamant hydrogéné et fonctionnalisé a été validée par diverses techniques de caractérisations telles que l'imagerie MEB, l'AFM, l'XPS la spectroscopie de fluorescence et la spectroscopie électrochimique d'impédance. En comparant les 2 méthodes de greffage, il s'est avéré que la méthode 2 (NTA-Ni) permettait une immobilisation de protéine sur surface diamant plus reproductible. De plus, il semble que la densité de LBP greffée soit plus importante dans ce cas.

Cette 2ème technique de greffage a permis d'obtenir des capteurs plus sensibles aux composés IBMP, 2,4-DNT et 4-NT en milieu liquide, que lors de l'utilisation de la méthode 1. Les résultats obtenus, par vibrométrie laser, suggèrent que l'orientation des protéines sur la surface grâce au greffage via le tag 6his a un effet significatif sur la sensibilité des capteurs. En effet, le site actif de la molécule cage (OBP) est ouvert vers l'extérieur et par conséquent, nous pouvons supposer que plus de molécules odorantes sont à même de se lier à ces récepteurs. Les capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig ont généralement une vitesse de détection plus rapide que ceux fonctionnalisés avec la méthode 1, ce qui vient à confirmer que le site actif des protéines est probablement plus accessible dans ce cas de greffage.

Une comparaison entre certains OBP et MUP a été aussi effectuée en termes de sensibilité envers les différents composés cibles. Le m6hisOBPpig et le m6hisMUP20 se sont avérés être les protéines les plus sensibles au 2,4-DNT, ce qui semble confirmer les résultats observés par l'équipe de l'Université de Manchester et celle de Padova qui ont largement étudié les constantes d'association de ces LBP envers les composés dérivés du TNT.

En travaillant avec les récepteurs olfactifs, nous avons remarqué, en ce qui concerne leur immobilisation sur diamant fonctionnalisé, qu'ils étaient plus sensibles au pH et au temps de greffage. Ainsi, nous avons pu observer que 4h d'immobilisation d'OR à pH élevé (pH=10) sur électrode diamant étaient nécessaires pour obtenir une augmentation significative de la résistance de transfert. Une fois ces conditions d'immobilisation optimales trouvées, la détection de plusieurs composés a été réalisée en fonctionnalisant plusieurs microleviers avec les 3 OR à disposition. Tous les résultats de détection, de spécificité, de contrôle positif et négatif envers chaque OR peuvent être corrélés aux affinités trouvées dans la littérature. Ces expériences semblent donc démontrer que les OR greffés sont fonctionnels lorsqu'ils sont greffés sur les transducteurs diamant.

Références du chapitre 3

[1] Härtl, A., Schmich, E., Garrido, J. a, Hernando, J., Catharino, S. C. R., Walter, S., Stutzmann, M. (2004). Protein-modified nanocrystalline diamond thin films for biosensor applications. Nature Materials, 3(10), 736–42.
[2] Bongrain, A., Agnès, C., Rousseau, L., Scorsone, E., Arnault, J.-C., Ruffinatto, S., Bergonzo, P. (2011). High sensitivity of diamond resonant microcantilevers for direct detection in liquids as probed by molecular electrostatic surface interactions. Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids, 27(19), 12226–34.
[3] Chien, F. S.-S., Wu, Y. T., Lai, G. L., & Lai, Y. H. (2011). Disproportionation and comproportionation reactions of resistive switching in polycrystalline NiO[sub x] films. Applied Physics Letters, 98(15), 153513.
[4] Biesinger, M. C., Payne, B. P., Lau, L. W. M., Gerson, A., & Smart, R. S. C. (2009). X-ray photoelectron spectroscopic chemical state quantification of mixed nickel metal, oxide and hydroxide systems. Surface and Interface Analysis, 41(4), 324–332.
[5] Wang, Q., Kromka, A., Houdkova, J., Babchenko, O., Rezek, B., Li, M., Szunerits, S. (2012). Nanomolar hydrogen peroxide detection using horseradish peroxidase covalently linked to undoped nanocrystalline diamond surfaces. Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids, 28(1), 587–92.
[6] Agnès, C., Ruffinatto, S., Delbarre, E., Roget, A., Arnault, J.-C., Omnès, F., & Mailley, P. (2010). New one step functionalization of polycrystalline diamond films using amine derivatives. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 16, 012001.
[7] Nespoulous, C. (2004). Odorant Binding and Conformational Changes of a Rat Odorant-binding Protein. Chemical Senses, 29(3), 189–198.
[8] Bongrain, a., Uetsuka, H., Rousseau, L., Valbin, L., Saada, S., Gesset, C., Bergonzo, P. (2010). Measurement of DNA denaturation on B-NCD coated diamond micro-cantilevers. Physica Status Solidi (a), 207(9), 2078–2083.
[9] Burova, T. V, Choiset, Y., Jankowski, C. K., & Haertlé, T. (1999). Conformational stability and binding properties of porcine odorant binding protein. Biochemistry, 38(45), 15043–51.
[10] Tegoni, M., Pelosi, P., Vincent, F., Spinelli, S., Campanacci, V., Grolli, S., Cambillau, C. (2000). Mammalian odorant binding proteins. Biochimica et Biophysica Acta, 1482(1-2), 229–40.
[11] Vincent, F., Spinelli, S., Ramoni, R., Grolli, S., Pelosi, P., Cambillau, C., & Tegoni, M. (2000). Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes. Journal of Molecular Biology, 300(1), 127–39.
[12] Weiland, G. A., and Molinoff, P. B. (1981) Life Sci. 29, 313-330
[13] Pevsner, J., Hou, V., Snowman, A. M., Snowman, M., & Snyder, H. (1990). Odorant-binding Protein characterization of ligand binding. J. Biol. Chem. 1990, 265:6118-6125.
[14] DeLean, A., and Rodbard, D. (1979) in The Receptors (O'Brien, R. D., ed) Vol. 1, pp. 143-192, Plenum Publishing Co., New York
[15] Glatz, R., & Bailey-Hill, K. (2011). Mimicking nature's noses: from receptor deorphaning to olfactory biosensing. Progress in Neurobiology, 93(2), 270–96.

Chapitre 4

Détection de composés volatils en milieu gazeux

Sommaire

4. Détection de composés volatils en milieu gazeux 173

4.1 Introduction 175

4.2 Evaluation dans des conditions contrôlées de laboratoire 175
4.2.1 Mise en évidence des greffages sur transducteurs SAW 176
4.2.2 Performances des capteurs SAW 181
4.2.2.a Répétabilité et reproductibilité 182
4.2.2.b Cinétique des protéines de liaison envers des ligands 184
4.2.2.c Cinétique de la réponse des capteurs 187
4.2.2.d Temps de réponse à 90% 194
4.2.2.e Durée de vie des capteurs 196
4.2.2.f Sensibilité 198
4.2.2.g Sensibilité et constantes d'associations K_a 206

4.3 Campagne de mesures sur composés réels : explosifs et drogues 209
4.3.1. Méthode d'entrainement de vapeur par aspiration 209
4.3.1.a Performance des capteurs 209
4.3.1.b Apprentissage neuronal 213
4.3.2 Utilisation du dispositif Sniffer développé au cours de l'étude 214

4.4 Conclusion 219

Bibliographie du chapitre 4 220

4.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'il était possible d'immobiliser de manière orientée des protéines LBP sur des surfaces de diamant, permettant d'utiliser leurs fonctions sur des transducteurs en diamant pour la détection de composés organiques en milieux liquide.

Comme présenté au chapitre 1, il n'existe que très peu de travaux de recherches tirant avantage des LBP pour l'élaboration de biocapteurs en milieu gazeux. C'est pour cette raison que notre étude s'oriente, dans ce chapitre, vers l'évaluation de cette approche pour la détection directe d'odeurs dans ce milieu. Les travaux ont essentiellement concerné l'utilisation de transducteurs SAW permettant d'évaluer les performances des LBP sur diamant comme couches sensibles. En parallèle, des développements importants ont également été menés sur les microleviers en diamant, dans le cadre de cette thèse, permettant d'envisager la transposition vers ce moyen de transduction dont les performances attendues sont plus élevées.

L'objectif primordial de ce chapitre 4 est de caractériser les propriétés de détection des transducteurs SAW pour chaque LBP immobilisé, en termes de sensibilité, de cinétique et de reproductibilité, et ce, par exposition à différents composés volatils. Les mêmes approches de greffage, identiques à celles employées pour immobiliser des LBP à la surface des microleviers (méthode 1 et 2) et présentées dans le chapitre 2, ont été utilisées sur transducteurs SAW recouverts de diamant. Les capteurs ainsi réalisés sont exposés à des vapeurs d'IBMP, de 2,4-DNT et 4-NT dans des conditions contrôlées de laboratoire.

La dernière partie de ce chapitre traite de la détection de composés explosifs de fabrication artisanale et de drogues de provenant de saisie judicaire, dans des conditions proches du terrain, à l'aide du prototype élaboré au cours du projet Sniffer. On a ainsi eu l'occasion de participer à plusieurs campagnes de mesures, menées dans le laboratoire du CREL, en utilisant des capteurs SAW fonctionnalisés par des LBP. Cette partie présente donc les performances des capteurs lors de ces mesures ainsi que les performances et les limites du dispositif utilisé.

4.2 Evaluation dans des conditions contrôlées de laboratoire

4.2.1 Mise en évidence des greffages sur transducteurs SAW

Pour rappel, avant leur utilisation, les SAW sont nettoyés puis recouverts de 3 couches de nanodiamants (ND) par une technique de *layer by layer* développée et optimisée au laboratoire LCD [1, 2, 3]. Afin de fixer les ND à la surface, une courte croissance d'une heure est effectuée à basse température (<550°C).

En fin de procédé, le film de diamant présente une surface en carbone majoritairement recouverte de terminaison hydrogène. Les mêmes techniques de greffage (méthodes 1 et 2), employées dans le chapitre 3 pour immobiliser des LBP à la surface des microleviers, ont été utilisées sur les SAW. Après les greffages, les SAW sont ensuite rincés vigoureusement à l'eau DI puis séchés sous diazote sec.

Comme décrit aux chapitres 1 et 2, l'ajout de masse à la surface des SAW affecte les caractéristiques acoustiques des transducteurs. En particulier, cela atténue le signal et produit un déplacement en fréquence qui peut être décrit selon les équations présentées dans le chapitre 1. Ces changements sont mesurables à l'analyseur de réseau. En effet, la Figure 4.1 montre l'évolution de la fréquence de résonance d'un transducteur SAW en diamant hydrogéné (H-diamant) après chaque étape de fonctionnalisation mesurée à l'analyseur de réseau, dans le cas de l'immobilisation de l'OBP m6hisOBPpig sur un SAW en diamant fonctionnalisé par la méthode 2 (NTA-Ni).

En greffant l'acide aminocaproïque, suivi d'un couplage EDC-NHS d'une part, ou le NTA-Ni d'autre part, sur la surface d'un SAW en diamant hydrogéné, un déplacement en fréquence de résonance est observé, de typiquement de quelques centaines de kHz, accompagné d'une baisse d'amplitude atténué d'environ -3 dB par rapport au SAW initial. Après le dépôt de LBP, la forme du signal en fréquence obtenue diffère, significativement, plus que lors du greffage aca ou NTA-Ni. L'ajout d'OBP sur le SAW engendre trois effets majeurs : une importante atténuation du pic de résonance (autour de -9 dB par rapport au SAW initial H-diamant), un important déplacement négatif de fréquence autour de plusieurs centaines de kHz et une diminution du facteur de qualité. Le facteur de qualité du SAW H-diamant après croissance est d'environ 3500 et diminue pour atteindre la valeur de 1750 après immobilisation des LBP.

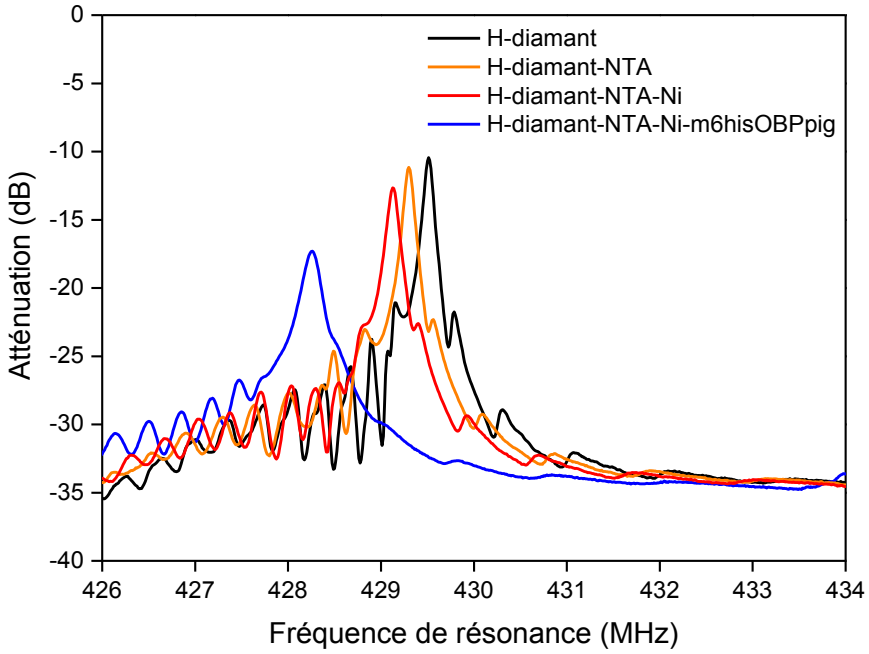


Figure 4.1 - Suivi de l'évolution de la fréquence de résonance d'un transducteur SAW après chaque étape de fonctionnalisation : après greffage du NTA (orange), du Ni (rouge) et après immobilisation du m6hisOBPpig (bleu)

En émettant l'hypothèse que les variations des propriétés de résonances sont uniquement dues à un apport massique sur le transducteur, la densité de surface des espèces greffées peut être calculée à partir de la sensibilité massique du SAW d'après l'équation 2.2 donnée dans le chapitre 2. Nous avons, ainsi, calculé ces densités pour les différentes espèces greffées lors du greffage de m6hisOBPpig par la méthode 2 et wtOBPpig par la méthode 1. Chaque greffage a été réalisé trois fois sur trois SAW différents. Les moyennes des déplacements en fréquence et en densité de greffage après chaque immobilisation sont résumées dans le Tableau 4.1 avec les écarts types associés (σ et RSD (relative standard deviation)).

Ainsi, pour le capteur SAW H-diamant-NTA, en considérant la masse molaire du NTA de 262,26 $g.mol^{-1}$ et en considérant un déplacement en fréquence d'environ 312 kHz par rapport au SAW H-diamant, la densité de surface obtenue par le calcul est de $1{,}45.10^{-5}$ kg/m^2, soit $3{,}34.10^7$ molécules/μm^2. De même, la densité de surface du Ni est de $3{,}22.10^{-6}$ kg/m^2, soit $4{,}95.10^7$ atomes/μm^2. La quantité de NTA et de Ni immobilisée sur la surface des SAW est du même ordre de grandeur (~10^7 molécules/μm^2), ce qui semble cohérent puisque la stœchiométrie est normalement de 1 pour 1. Ceci a, d'ailleurs, été confirmé dans le chapitre 2 par analyse XPS.

Cependant, nous remarquons tout de même une quantité de Ni immobilisée supérieure à celle des molécules NTA. Cette erreur pourrait provenir du fait que l'hypothèse initiale soit erronée. Les variations des propriétés de résonances ne sont probablement pas dues uniquement à un apport massique sur le transducteur mais également à des phénomènes de viscoélasticité. Une adsorption non spécifique des Ni sur la surface des SAW, bien que cela n'ait pas été confirmé par analyse XPS, pourrait également être observée. Nous pouvons enfin supposer que le recouvrement des molécules NTA ou Ni sur la surface du SAW n'est pas homogène sur toute la surface du SAW, ce qui pourrait induire une erreur sur le calcul moyen de densité de greffage.

Pour le capteur H-diamant-NTA-Ni-m6hisOBPpig, en considérant la masse moléculaire de l'OBP m6hisOBPpig à environ 29,70 kDa et un déplacement en fréquence d'environ 870 kHz par rapport au SAW H-diamant-NTA-Ni, la densité de surface de l'OBP obtenue par le calcul est de $4{,}05.10^{-5}$ kg/m², soit $8{,}22.10^{5}$ molécules/µm², soit environ 100 fois moins de molécules que le complexe NTA-Ni immobilisé. Ce résultat semble cohérent, étant donné la taille importante des OBP comparée à celle du Nickel ou du NTA : du fait, par exemple, de leur encombrement stérique, la densité d'OBP restera toujours bien plus faible que celle des NTA.

L'évolution des fréquences de résonance a aussi été mesurée en utilisant la méthode 1 de greffage pour le capteur H-diamant-aca-wtOBPpig. Ainsi, pour le capteur SAW H-diamant-aca, en considérant la masse molaire de l'aca à environ 131 g.mol^{-1} et en considérant un déplacement en fréquence d'environ 50 kHz par rapport au SAW H-diamant, la densité de surface obtenue par calcul est de $3{,}65.10^{-6}$ kg/m², soit $1{,}68.10^{7}$ molécules/µm².

La densité de surface après le couplage EDC/NHS est de $6{,}03.10^{-6}$ kg/m², soit $2{,}05.10^{7}$ molécules/µm², ce qui est légèrement plus important que la quantité de molécules d'acide aminocaproïque immobilisées en surface. On peut établir les mêmes hypothèses que précédemment sur cette différence de densité. Pour le capteur H-diamant-aca-wtOBPpig, en considérant la masse moléculaire de l'OBP wtOBPpig à environ 18,00 kDa et un déplacement en fréquence d'environ 300 kHz, la densité de surface obtenue par calcul est de $1{,}79.10^{-5}$ kg/m², soit $3{,}54.10^{5}$ molécules/µm², soit une quantité de molécules de même ordre de grandeur, quoique légèrement plus faible que celle obtenue lors de l'immobilisation du m6hisOBPpig en utilisant la méthode 2 de greffage.

Tableau 4.1 - Moyennes des déplacements en fréquence après chaque immobilisation

Composé greffé	Δf (kHz)	σ (kHz)	Densité moyenne de greffage (molécules/µm^2)	RSD densité (%)
NTA	312	± 87	$3{,}34.10^7$	27
Ni	131	± 49	$4{,}95.10^7$	38
m6hisOBPpig	939	± 226	$8{,}22.10^5$	23
6his-MUP20	644	± 109	$7{,}53.10^5$	17
aca	65	± 34	$1{,}68.10^7$	52
EDC/NHS	140	± 76	$2{,}05.10^7$	46
wtOBPpig	413	± 181	$3{,}54.10^5$	44
rMUP	346	± 142	$5{,}92.10^5$	39

Les résultats obtenus semblent confirmer ceux présentés au chapitre 3 : le NTA se greffe de façon plus dense sur un SAW en diamant hydrogéné que l'acide aminocaproïque, avec un déplacement en fréquence environ 2 fois plus important. Les écart-types importants peuvent être dus à un mauvais rinçage des SAW après chaque greffage, ou à une variation de rinçage d'un capteur à un autre. Il semble qu'en utilisant la méthode de greffage 2 (NTA-Ni), la densité de greffage de LBP reste généralement plus élevée. On remarque que la densité de greffage semble plus reproductible en utilisant la méthode 2 avec un RSD d'environ 20%. Le RSD pour la méthode 1 est 2 fois plus élevé c'est-à-dire d'environ 40%.

L'évolution des fréquences de résonance a également été mesurée pour calculer la densité d'immobilisation des différents OBP et MUP utilisés pour ces travaux sur transducteurs SAW en diamant (Tableau 4.2). Une réserve est néanmoins émise sur ces valeurs, données à titre indicatif, car elles n'ont été enregistrées qu'une seule fois sur un seul SAW pour chaque greffage. (à l'exception des valeurs pour les protéines m6hisOBPpig, 6hisMUP20, wtOBPpig et rMUP qui sont moyennées sur 3 SAW)

Tableau 4.2 - Exemples de densité de surface de différents OBP et MUP immobilisés sur SAW en diamant préalablement fonctionnalisé par la méthode 1 ou 2.

Nom	Type	Méthode de	Masse	Densité de greffage	
	(mammifère ou insecte)	greffage (1 ou 2)	(kDa)	(kg/m^2)	($molécules/\mu m^2$)
Amel OBP14	abeille (Apis Mellifera)	1	12,8	$0,47.10^{-5}$	$2,21.10^{5}$
Agam4	moustique (Anopheles gambiae)	1	16,7	$2,95.10^{-5}$	$1,06.10^{6}$
Agam47	moustique (Anopheles gambiae)	1	19,5	$3,03.10^{-5}$	$9,36.10^{5}$
P.domin OBP	guêpe (Polistes dominulus)	1	13,5	$1,99.10^{-5}$	$8,88.10^{5}$
6hisOBP-1Pd	guêpe (Polistes dominulus)	2	13,9	$2,39.10^{-5}$	$1,03.10^{6}$
wtOBPpig	porc	1	18	$1,79.10^{-5}$	$3,54.10^{5}$
wt6hisOBP pig	porc	2	19	$2,33.10^{-5}$	$7,38.10^{5}$
m6hisOBP pig	porc	2	29,7	$4,05.10^{-5}$	$8,20.10^{5}$
rMUP	**souris**	1	16,9	$1,65.10^{-5}$	$5,92.10^{5}$
6his-MUP3		2	21	$2,79.10^{-5}$	$8,00.10^{5}$
6his-MUP20		2	21,9	$2,73.10^{-5}$	$7,53.10^{5}$
6his-MUP20-Y103R		2	20,5	$2,86.10^{-5}$	$8,40.10^{5}$
6his-MUP20-Y103D		2	20,5	$2,85.10^{-5}$	$8,37.10^{5}$
6his-MUP20-L88Q		2	20,5	$2,73.10^{-5}$	$8,02.10^{5}$
6his-MUP20-L124V		2	20,5	$2,84.10^{-5}$	$8,34.10^{5}$

En comparaison, l'équipe de Di Pietrantonio et al. a déposé trois OBP provenant de différentes espèces (porc et bovin) sur des SAW recouverts d'or [4] avec pour résultat une densité d'OBP comprise entre $3,2.10^{4}$ et $4,0.10^{4}$ molécules/μm^2 selon l'OBP déposé. Il semble que nos résultats restent cohérents avec ces travaux, même s'ils présentent un meilleur recouvrement de la surface du SAW avec un recouvrement environ 10 fois plus élevé dans notre cas ($\sim 7.10^{5}$ molécules/μm^2 en moyenne). Cette différence de densité observée pourrait s'expliquer par la technique d'immobilisation d'OBP utilisée. L'équipe de Di Pietrantonio a greffé les OBP directement sur la surface en or. Il est alors possible que, dans ce cas, le rendement de greffage soit moins important que sur la surface diamant. Il est aussi possible que la porosité et la structure 3D de la surface du diamant puissent contribuer au rendement plus élevé que nous observons.

En essayant d'immobiliser des LBP sur des SAW en diamant oxydé, aucun déplacement en fréquence significatif n'a été observé. Il semble qu'aucune immobilisation de LBP sur diamant oxydé ne soit possible, en accord avec les observations décrites dans le chapitre 3 notamment par caractérisations électrochimiques (aucun changement significatif de Rt).

4.2.2 Performances des capteurs SAW

Dans cette section, des SAW fonctionnalisés par différents OBP et MUP sont exposés à des vapeurs d'IBMP, de 2,4-DNT et 4-NT dans des conditions contrôlées de laboratoire. Le Tableau 4.3 résume les principales propriétés de ces 3 composés avec leur masse molaire, leur température d'ébullition et leur pression de vapeur saturante. Les compositions et informations diverses sur ces composés sont aussi détaillées en annexes B.

Tableau 4.3 - Résumé des principales propriétés des composés IBMP, 2,4-DNT et 4-NT

Composés	Masse molaire	$P_{vapeur\ saturante}$ à 25°C	$T_{ébullition}$
IBMP	166,22 g/mol	36,4 Pa	245 °C
2,4-DNT	182,13 g/mol	0,015 Pa	(décomposition > 250 °C)
4-NT	137,12 g/mol	21,8 Pa	238 °C

Les capteurs sont évalués selon plusieurs critères et notamment leur sensibilité, leur reproductibilité, leurs temps de réponse et leur durée de vie.

Lorsque les capteurs SAW sont exposés plusieurs fois successivement, au même composé à la même concentration, la réponse à la première exposition diffère presque toujours des réponses suivantes en termes d'intensité et de cinétique. Ce phénomène avait, également, été observé par Benoit Tard lors de l'étude de capteurs SAW fonctionnalisés par des couches non biologiques. Ceci avait alors été attribué à une compétition entre des molécules d'eau présentes à l'équilibre sur la couche et les nouvelles molécules cibles (ici IBMP, etc.), venant ainsi perturber cet équilibre [1]. Pour cette raison, dans la suite de ces travaux, tous les résultats présentés feront omission du premier cycle d'exposition.

Les réponses de 3 différents capteurs ont été suivies lors d'expositions successives de 2,5 ppm d'IBMP, et notamment celles d'un capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig, d'un capteur en diamant hydrogéné avec de l'OBP déposé sur sa surface sans technique de greffage utilisée au préalable et d'un capteur en diamant oxydé avec de l'OBP adsorbé sur sa surface (Figure 4.2). Cette expérience a été réalisée à 5 reprises sur 4 différents capteurs de chaque catégorie. Pour la clarté du document, une seule courbe réponse pour chaque type de capteur est tracée sur le graphique de la Figure 4.2.

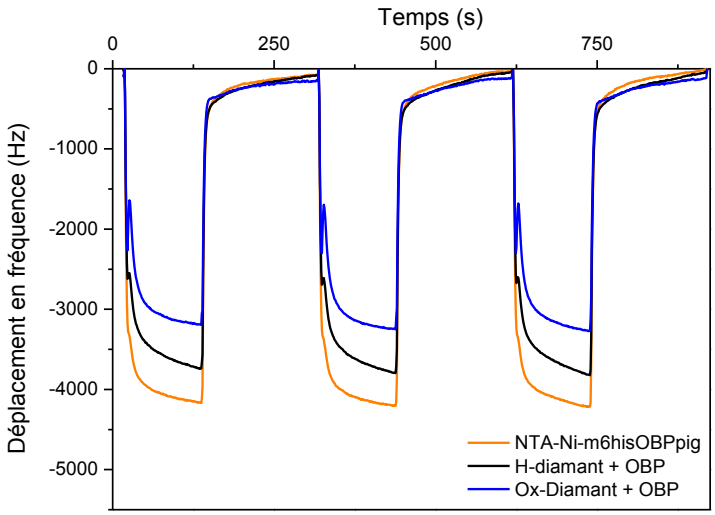


Figure 4.2 - Réponses à 3 expositions successives de 2,5 ppm d'IBMP sur 3 différents capteurs : NTA-Ni-m6hisOBPpig fonctionnalisés par la méthode 2 (orange), H-diamant + m6hisOBPpig (noir) et Ox-diamant-m6hisOBPpig (bleu)

Comme on peut le constater, les réponses les plus élevées sont celles du capteur fonctionnalisé avec de l'OBP par la méthode NTA-Ni. Certes, les 3 capteurs présentent des sensibilités importantes, probablement dues à la réactivité et à l'affinité de nombreux composés envers la surface diamant. Cependant, nous notons que le capteur sur lequel l'OBP est juste adsorbé et non greffé, H-diamant+m6hisOBPpig, présente une réponse moyenne environ 21% (± 6 %) plus basse que celle du capteur greffé NTA-Ni-m6hisOBPpig. Les capteurs Ox-diamant+m6hisOBPpig présentent les réponses les plus faibles, avec plus de 1203 Hz (± 358 Hz) de différence en fréquence, comparés au capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig. En bref, les SAW oxydés présentent une réponse moyenne environ 29% (± 3%) plus basse que celle du capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig. Cela a déjà été observé dans le chapitre 3, où l'on avait remarqué que sur la surface oxydée, l'immobilisation d'OBP était très faible voire inexistante et que, sous vibrométrie laser, il n'était pas possible de détecter de l'IBMP en milieu liquide avec un microlevier en diamant oxydé.

4.2.2.a Répétabilité et reproductibilité

Il est important de vérifier la répétabilité et la reproductibilité des capteurs fonctionnalisés pour pouvoir les comparer par la suite.

La Figure 4.3 présente les réponses de 3 capteurs de type aca-rMUP fonctionnalisés par la méthode 1 et de 3 capteurs de type NTA-Ni-6hisMUP20L88Q fonctionnalisés par la méthode 2 à 5 expositions successives de 8 ppm d'IBMP.

La réponse que l'on observe de chaque capteur aux différents cycles d'expositions, est relativement répétable et reproductible. En effet, l'intensité des signaux semble identique pour chaque capteur et aucune dérive apparente n'est observée sur la durée de la mesure.

En revanche, les capteurs aca-rMUP fonctionnalisés par la méthode 1 semblent sensiblement moins reproductibles en termes d'intensité de réponse par rapport aux capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q fonctionnalisés par la méthode 2. Ce même phénomène a été observé pour les réponses de détection des microleviers en milieu liquide. En effet, les capteurs fonctionnalisés avec la méthode 2 se sont avérés généralement plus reproductibles que ceux fonctionnalisés avec la méthode 1.

Cette meilleure reproductibilité pourrait être expliquée par le fait qu'avec la méthode 2, la densité d'immobilisation d'OBP semble moins disparate d'un capteur à l'autre, comme précédemment expliqué.

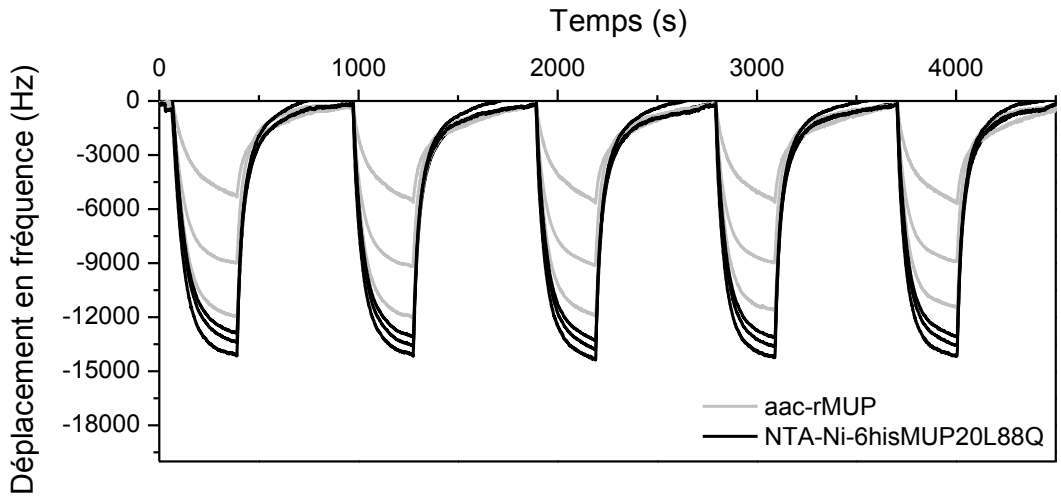


Figure 4.3 - Réponse à 5 expositions successives de 18 ppm d'IBMP sur 3 capteurs aca-rMUP fonctionnalisés par la méthode 1 (gris clair) et 3 capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q fonctionnalisés par la méthode 2 (noir)

La Figure 4.4 résume un exemple de dispersion des valeurs moyennes de déplacement en fréquence, à l'état le plus proche de l'équilibre, durant chaque exposition pour ces capteurs fonctionnalisés selon la méthode 1 de fonctionnalisation utilisée (aca-rMUP) ou selon la méthode 2 (NTA-Ni-6hisMUP20L88Q) pour 5 expositions successives de 18 ppm d'IBMP. Cette figure confirme bien la meilleure reproductibilité des capteurs fonctionnalisés par la méthode 2. L'écart type représente la répétabilité de chaque capteur dans les conditions expérimentales. Nous

remarquons, probablement aussi, une répétabilité sensiblement meilleure dans le cas des capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q (méthode 2).

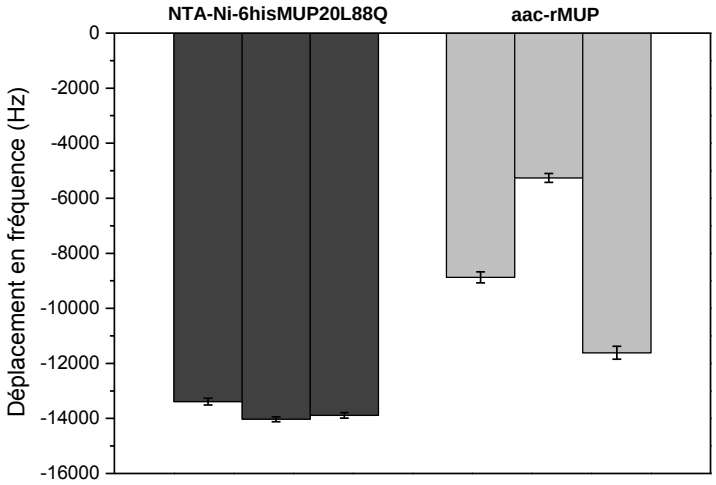


Figure 4.4 - Moyenne de 5 expositions successives de 18 ppm d'IBMP sur 3 capteurs aca-rMUP fonctionnalisés par la méthode 1 (gris clair) et 3 capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q fonctionnalisés par la méthode 2 (noir)

4.2.2.b Cinétique des protéines de liaison envers des ligands

La cinétique de liaison des protéines est gouvernée par la reconnaissance moléculaire entre un récepteur et un ligand qui peut être spécifique. Depuis des décennies, l'on cherche à décrire et caractériser de telles interactions. Pendant longtemps, l'étude des interactions ligand-récepteur se résumait, principalement, à l'étude de l'affinité et de la spécificité : il s'agissait de déterminer la force du lien entre récepteur et ligand (affinité) et de mesurer cette intensité pour des molécules de structures relativement proches (spécificité). Pour rendre compte de la « force » du lien ligand- récepteur, on s'attachait à évaluer les constantes thermodynamiques et cinétiques d'association et de dissociation, pour des molécules biologiques en solution [5 ,6]. Dans ce cadre, on définit simplement la réaction d'association entre un ligand L et un récepteur R (dans notre cas la protéine OBP ou MUP), donnant un complexe C (ou LR), par l'équilibre suivant:

$$L + R \underset{k_-}{\overset{k_+}{\rightleftharpoons}} C \qquad (4.1)$$

avec k_+ la constante cinétique d'association, k_- la constante cinétique de dissociation, qui sont reliées par la réaction à l'équilibre suivante :

$$k_+[L][R] = k_-[C] \tag{4.2}$$

Ces constantes peuvent être reliées à la vitesse de réaction v par :

$$v = \frac{d[C]}{dt} = k_+ [L][R] - k_-[C] \tag{4.3}$$

Les crochets font référence aux concentrations exprimées en mol.L^{-1}. Le système évolue vers un état d'équilibre, où les concentrations à l'équilibre vérifient :

$$\frac{[L]_{éq}[R]_{éq}}{[C]_{éq}} = \frac{k_-}{k_+} = K_d = \frac{1}{K_a} \tag{4.4}$$

où K_a est la constante thermodynamique d'association en M^{-1}, aussi appelée affinité, et K_d est la constante thermodynamique de dissociation, exprimée en M.

A l'équilibre, on peut écrire :

$$[R]_{éq} = [R]_0 - [C] \tag{4.5}$$

$$[L]_{éq} = [L]_0 - [C] \tag{4.6}$$

Dans notre cas d'étude, le ligand (par exemple le composé IBMP) est excessivement présent, comparé à la quantité relative de protéines immobilisées (par exemple les OBP) sur la surface du SAW. On peut donc considérer que :

$$[L]_{éq} = [L]_0 \tag{4.7}$$

L'équation 4.8 devient alors :

$$\frac{[L]_{éq}([R]_0 - [C]_{éq})}{[C]_{éq}} = \frac{[R]_0[L]_{éq}}{[PL]_{éq}} - [L]_{éq} = \frac{[R]_0[L]_0}{[PL]_{éq}} - [L]_0 \tag{4.8}$$

La concentration de récepteurs liés à l'équilibre peut donc être définie par l'équation :

$$[PL]_{éq} = \frac{[R]_0[L]_0}{K_d + [L]_0} \tag{4.9}$$

Il est commun dans plusieurs cas d'études de réarranger les équations à l'équilibre en supposant qu'elles respectent la théorie fondamentale de l'isotherme de Langmuir.

On note alors souvent la saturation fractionnelle des liaisons par :

$$v = \frac{[C]}{[L]_0} = \frac{[L]_0}{K_d + [L]_0} \tag{4.10}$$

v étant la fraction de molécules de protéines saturées avec un ligand à l'intérieur de sa poche de liaison.

Il est intéressant de noter ici, que d'autres modèles d'isothermes sont quelques fois utilisés dans la littérature, tels que l'isotherme BET [7], l'isotherme de Freundlich (1906) [8], de Temkin-Pyzhev (1939) [9], de Dubinin-Radushkevic (1947) [10], de Halsey (1948) [11] et de Jovanovic (1969) [12].

Les modèles testés se répartissent en trois grandes catégories : modèle d'adsorption en monocouche (isothermes de Langmuir), modèle d'adsorption en multicouche (isothermes de Freundlich et de Halsey) et modèle d'adsorption basé sur l'échange d'énergie entre molécule et surface (isothermes de Temkin-Pyzhev et de Dubinin-Radushkevic). Une distinction est faite également entre adsorption sur une surface homogène (isothermes de Langmuir et de Halsey) et sur une surface hétérogène (isothermes de Freundlich, Temkin-Pyzhev et Dubinin-Radushkevic). Par ailleurs, tous ces modèles supposent qu'il n'y a pas d'interactions latérales entre les molécules adsorbées.

Comme détaillé précédemment, le modèle utilisé le plus couramment est le modèle de Langmuir [13, 14, 15], bien que toutes les hypothèses du modèle initial ne soient pas toujours vérifiées : en effet, l'adsorption n'est peut-être pas localisée en forme de monocouche et les interactions latérales entre protéines ou molécules adsorbées ne peuvent pas être totalement exclues.

Ainsi le taux de recouvrement V est défini en fonction du temps d'après la réaction 4.11 et à l'équilibre par 4.12 :

$$V(t) = V_{éq}.\left(1 - e^{-t/\tau}\right) \tag{4.11}$$

$$V_{éq} = \frac{\alpha C}{1 + \alpha C} \tag{4.12}$$

où α est le rapport $\frac{K_a}{K_d}$

C la concentration du ligand (gaz dans notre cas)

τ la constante de temps définie par (4.13) [16] :

$$\frac{1}{\tau} = K_a.C + K_d \tag{4.13}$$

Une autre équation 4.14 permet de décrire l'évolution du déplacement en fréquence en fonction du temps et en fonction de la concentration car le taux de recouvrement est directement proportionnel à la masse déposée en surface. En considérant cette seule contribution, on peut écrire :

$$\frac{1}{\Delta f_{eq}} \propto \frac{\alpha C}{1+\alpha C} \tag{4.14}$$

Soit,

$$\frac{1}{\Delta f_{eq}} \propto \frac{1}{\Delta f_{eq0}} + \frac{1}{\frac{K_a}{K_b}.\Delta f_{eq0}} \frac{1}{C} \tag{4.15}$$

où Δf_{eq} est le déplacement en fréquence à l'équilibre.

4.2.2.c Cinétique de la réponse des capteurs

La réponse des capteurs SAW se traduit par un déplacement de fréquence directement proportionnel au taux de recouvrement V. La cinétique de réponse suit une loi exponentielle qui peut être exprimée à partir de la fonction f(t) décrite par l'équation 4.16 .

$$f(t) = A.\left(1 - e^{-t/\tau}\right) \tag{4.16}$$

La cinétique de réponse des capteurs peut alors être exprimée à partir de l'évaluation de la constante de temps τ de cette fonction exponentielle. Ainsi, cette constante de temps a été calculée pour les réponses de plusieurs capteurs fonctionnalisés avec différents OBP et MUP à différentes concentrations d'IBMP, 2,4-DNT et 4-NT.

La cinétique de réponse du capteur NTA-Ni-6hisMUP20L88Q sera détaillée ici. Ce choix est complément arbitraire.

Le Tableau 4.4 résume quelques constantes de temps calculées pour des expositions d'IBMP par exemple.

Tableau 4.4 - Constantes de temps en secondes des réponses à des expositions de vapeurs d'IBMP à une concentration comprise entre 10 ppb et 12 ppm pour les capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q et aca-rMUP

	Constantes de temps τ (s)	
Concentration IBMP (ppm)	**NTA-Ni-6hisMUP20L88Q**	**aca-rMUP**
12	33 ± 1	55 ± 5
10	38 ± 1	67 ± 8
9	41 ± 3	77 ± 14
7,8	50 ± 4	83 ± 13
6	56 ± 4	87 ± 15
3	66 ± 5	84 ± 17
1,7	75 ± 5	92 ± 16
1,5	76 ± 6	101 ± 21
1	83 ± 5	105 ± 24
0,5	94 ± 8	127 ± 21
0,3	105 ± 13	131 ± 32
0,1	113 ± 14	141 ± 33
0,01	136 ± 32	161 ± 74

De manière générale, la constante de temps diminue, comme attendu, lorsque la concentration d'IBMP augmente. On constate ici que la cinétique de réponse est plus rapide dans le cas du NTA-Ni-6hisMUP20L88Q que dans celui de l'aca-rMUP, et ce indépendamment de la concentration d'IBMP. Il est possible ici que l'orientation contrôlée des protéines sur la surface dans le premier cas (avec la poche de liaison directement accessible) est plus favorable à une liaison rapide avec les ligands que dans le deuxième cas. Il est aussi possible que la constante d'association du 6hisMUP20L88Q envers l'IBMP soit plus importante que celle du rMUP, ce qui serait aussi en faveur d'une cinétique plus rapide. Malheureusement, cette donnée n'est pas disponible à ce stade. Néanmoins, cette tendance a semblé se vérifier lorsque d'autres protéines étaient greffées sur les transducteurs suivant les méthodes 1 et 2. Ceci a aussi été observé en liquide dans le cas de la détection de l'IBMP notamment entre les capteurs fonctionnalisés NTA-Ni-m6hisOBPpig et NTA-Ni-wt6hisOBPpig.

Les Tableau 4.5 et Tableau 4.6 résument quelques-unes des constantes de temps calculées pour des expositions de 2,4-DNT et 4,NT pour le cas d'un capteur fonctionnalisé par la méthode 2 pour NTA-Ni-6hisMUP20L88Q.

Tableau 4.5 - Constantes de temps en secondes des réponses à des expositions de vapeurs de 2,4-DNT à une concentration comprise entre 12 ppb et 240 ppb pour le capteur NTA-Ni-6hisMUP20L88Q

	Constantes de temps τ (s)
Concentration 2,4-DNT (ppb)	NTA-Ni-6hisMUP20L88Q
240	74 ± 10
210	85 ± 9
180	97 ± 13
125	111 ± 15
60	159 ± 13
12	185 ± 34

Tableau 4.6 - Constantes de temps en secondes des réponses à des expositions de vapeurs de 4-NT à une concentration comprise entre 200 ppb et 1,49 ppm pour le capteur NTA-Ni-6hisMUP20L88Q

	Constantes de temps τ (s)
Concentration 4-NT (ppm)	NTA-Ni-6hisMUP20L88Q
1,49	87 ± 15
1,1	114 ± 13
0,75	192 ± 25
0,37	249 ± 34
0,2	535 ± 167

Les deux tableaux ci-dessus montrent que les constantes de temps pour des concentrations équivalentes à des composés nitroaromatiques sont beaucoup plus importantes dans le cas d'expositions au 4-NT que dans celles au 2,4-DNT. Les valeurs de K_a du 6his MUP20L88Q pour ces 2 composés sont égales à 2,79 et 2,05, respectivement. Or d'après l'équation 4.13, plus la valeur de K_d est grande, plus la constante de temps τ est petite, ce qui n'est donc pas vérifié ici.

Aussi, leurs valeurs ne suffiraient pas à expliquer les différences de constantes de temps pour des concentrations équivalentes. Certes, la détermination des K_d se fait en milieu liquide. Il est notamment à envisager que la faible pression de vapeur du 2,4-DNT par rapport à celle du 4-NT et la nature « collante » du 2,4-DNT puissent être mises en cause dans la cinétique lente de réponse observée. D'après ces constations, il apparait donc délicat de comparer la réponse d'un même capteur à plusieurs composés en ne se référençant qu'aux valeurs de K_d des espèces cibles.

Afin d'évaluer les différences de cinétiques entre OBP et MUP, nous avons mesuré les différences de constantes de temps des réponses à une concentration de 240 ppb de 2,4-DNT et d'IBMP selon les OBP et MUP immobilisés sur les SAW (Tableau 4.7).

Tableau 4.7 - Constantes de temps en secondes des réponses à des expositions de vapeurs d'IBMP et de 2,4-DNT à des concentrations de 240 ppb pour différents capteurs

	Constantes de temps τ (s)
	Concentration de 240 ppb d'IBMP
aca-rMUP	133
NTA-Ni-MUP3	136
NTA-Ni-6hisMUP20	109
NTA-Ni-6hisMUP20L88Q	107
NTA-Ni-6hisMUP20Y103R	116
NTA-Ni-6hisMUP20Y103D	115
NTA-Ni-6hisMUP20L124V	121

	Constantes de temps τ (s)
	Concentration de 240 ppb d'IBMP
aca-Amel OBP14	151
aca-Agam4	87
NTA-Ni-6hisOBP 1Pd	116
aca-wtOBPpig	119
NTA-Ni-m6hisOBP pig	110

	Constantes de temps τ (s)
	Concentration de 240 ppb de 2,4-DNT
aca-rMUP	108
NTA-Ni-6hisMUP3	88
NTA-Ni-6hisMUP20	92
NTA-Ni-6hisMUP20L88Q	74
NTA-Ni-6hisMUP20Y103R	142
NTA-Ni-6hisMUP20Y103D	81
NTA-Ni-6hisMUP20L124V	71

	Constantes de temps τ (s)
	Concentration de 240 ppb de 2,4-DNT
aca-Amel OBP14	267
aca-Agam4	77
NTA-Ni-6hisOBP 1Pd	171
aca-wtOBPpig	132
NTA-Ni-m6hisOBP pig	58

Comme on peut l'observer sur le tableau ci-dessus, les capteurs aca-Agam4 et NTA-Ni-6hisMUP20L88Q présentent les temps de détection les plus courts pour l'IBMP, même si pour ce composé les constantes de temps restent très homogènes entre elles. Dans le cas du 2,4-DNT, les capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig et NTA-Ni-6hisMUP20L124V ont les valeurs de τ les plus faibles, ce qui semble cohérent dans le cas du capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig étant donné que c'est un OBP mutant conçu spécifiquement pour avoir une grande affinité envers le 2,4-DNT. Néanmoins les MUP semblent globalement présenter des cinétiques qui restent sensiblement plus élevées. Si l'on essaie alors de comparer ces cinétiques aux valeurs de K_d, par exemple pour 6hisMUP20L88Q (2,79), 6hisMUP20Y103R (4,66), 6hisMUP20Y103D (4,51) et 6hisMUP20L124V (0,6) (les valeurs de K_d sont données entre parenthèses), nous observons une nouvelle fois que ces valeurs ne sont aucunement corrélées aux valeurs de τ comme observé précédemment pour le 2,4-DNT et le 4-NT.

Certaines valeurs semblent plus cohérentes. Par exemple, dans le cas des capteurs aca-wtOBPpig, la constante de temps est plus importante que pour le capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig, ce qui était aussi le cas en milieu liquide. De même, le capteur aca-rMUP présente aussi une valeur de τ plus élevée que le capteur NTA-Ni-6hisMUP20, comme observé aussi en liquide.

Les évolutions de l'inverse de la constante de temps de la réponse des capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q en fonction de la concentration d'IBMP, de 2,4-DNT et de 4-NT sont respectivement tracées dans la Figure 4.5, Figure 4.6 et Figure 4.7.

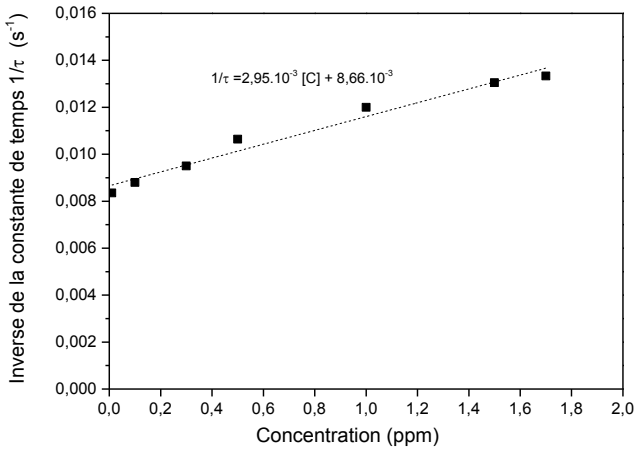


Figure 4.5 - Moyenne des inverses des constantes de temps de réponses pour des concentrations d'IBMP de 10 ppb à 1,8 ppm dans le cas de capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q

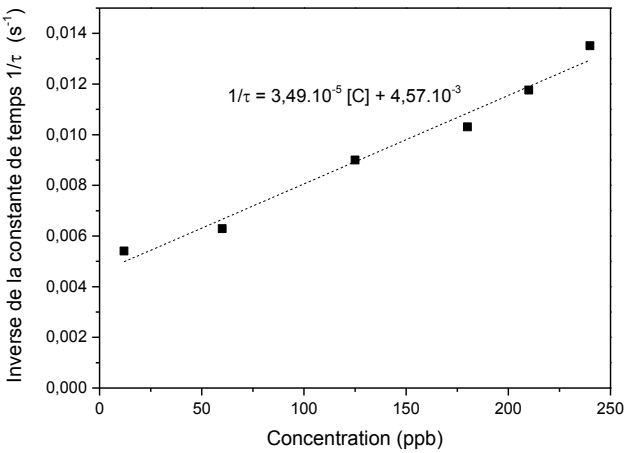


Figure 4.6 - Moyenne des inverses des constantes de temps de réponses pour des concentrations de 2,4-DNT de 200 ppb à 240 ppb dans le cas de capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q

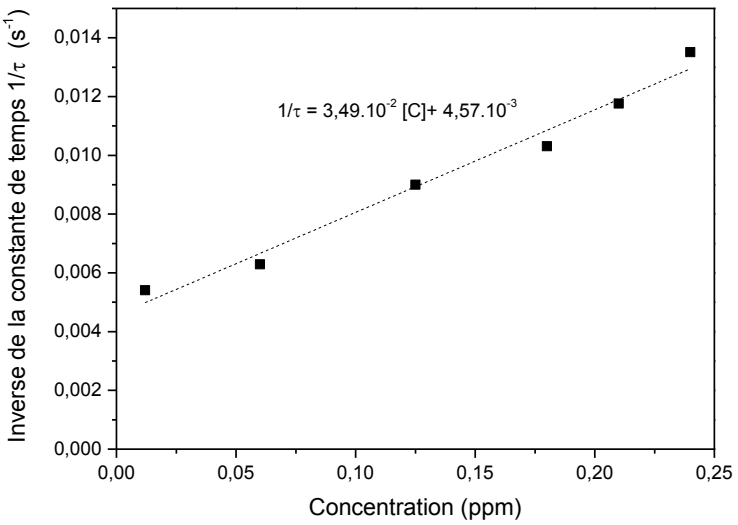


Figure 4.7 - Moyenne des inverses des constantes de temps de réponses pour des concentrations de 4-NT de 12 ppb à 1,49 ppm dans le cas de capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q

Dans les trois figures ci-dessus, l'évolution de $1/\tau$ avec la concentration est relativement linéaire : comme attendu d'après l'équation 4.13, la pente de ces droites correspond à la valeur de K_a alors que l'ordonnée à l'origine correspond à la valeur de K_d.

On trouve ainsi par régression linéaire :

	K_a	K_d
IBMP	$2{,}95.10^{-3}$	$8{,}66.10^{-3}$
2,4-DNT	$3{,}49.10^{-2}$	$4{,}57.10^{-3}$
4-NT	$7{,}48.10^{-3}$	$3{,}37.10^{-4}$

Les résultats obtenus sont très différentes des constantes d'association et de dissociation trouvées en liquide par l'équipe de l'université de Padova, en effet pour les mêmes composés, les K_a et K_d trouvés sont extrêmement plus importants que ceux

calculés dans cette étude. Par exemple, pour le 2,4-DNT (en considérant le 6hisMUP20L88Q) : K_a =0,3 M^{-1} , K_d=2,79 µM et pour le 4-NT : K_a =0,47 M^{-1}, K_d=2,05 µM.

Il apparaît donc particulièrement délicat d'essayer de trouver des corrélations dans le calcul des constantes de temps entre milieux liquides et gazeux. Clairement, en phase gaz les mécanismes d'interaction peuvent être plus complexes : en milieu liquide n'intervient que l'interaction entre le récepteur et le ligand, alors qu'en milieu gaz plusieurs types d'assemblages multicouches peuvent intervenir, voire des interactions avec des molécules préalablement adsorbées en surface.

4.2.2.d Temps de réponse à 90%

La valeur $T_{90\%}$, correspondant au temps nécessaire à un capteur pour atteindre 90% de signal de réponse avant d'arriver à l'état d'équilibre, donne une information pratique sur la rapidité d'un capteur à donner un signal de mesure exploitable. Un exemple de détermination de $T_{90\%}$ est illustré sur la Figure 4.8 dans le cas de la détection de 1 ppm d'IBMP par un capteur SAW NTA-Ni-m6hisOBPpig. Le tableau 4.8 résume les mesures de $T_{90\%}$ effectuées sur des expositions de 240ppb d'IBMP, de 2,4-DNT et de 4-NT à la fois pour la réponse et pour le retour à la ligne de base.

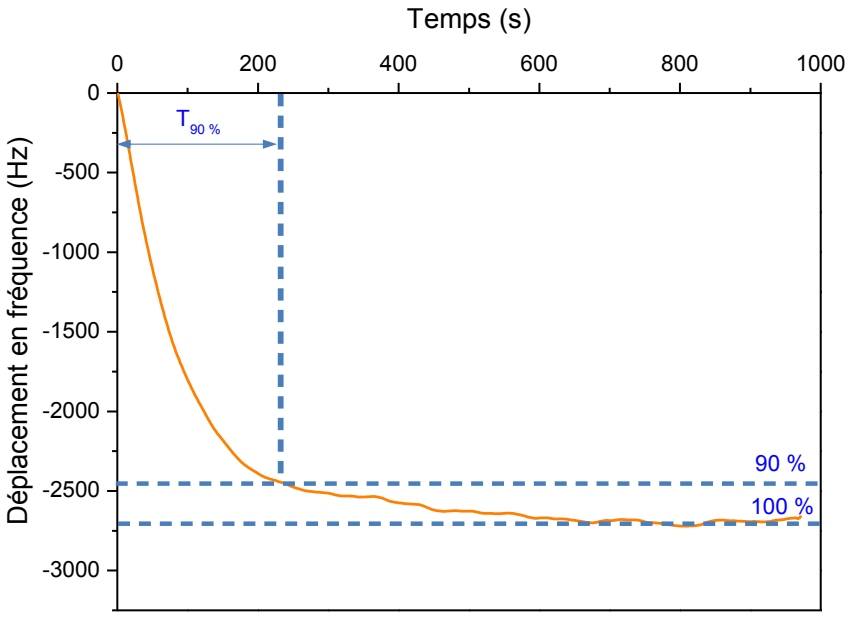


Figure 4.8 - Méthode de calcul du temps de réponse à 90% sur la réponse d'un capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig à une concentration 1 ppm d'IBMP

Tableau 4.8 - Temps de réponse à 90% moyennés sur 5 réponses de 5 capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig distincts, mesurés après 800s d'exposition à des concentrations de 240 ppb d'IBMP, 2,4-DNT et 4-NT pour l'exposition et le retour à la ligne de base.

Composé ([C]=240 ppb)	$T_{90\%}$ Réponse exposition (s)	$T_{90\%}$ Retour à la ligne de base (s)
IBMP	195	217
2,4-DNT	146	153
4-NT	285	312

Nous observons que le $T_{90\%}$ d'exposition est plus court que celui du retour à la ligne de base pour les trois espèces mesurées. Cet écart est inférieur à 1 min.

Le Tableau 4.9 liste les temps de réponse à 90% pour différents capteurs fonctionnalisés avec des LBP différents, mesurés après 800s d'exposition à une concentration de 240 ppb d'IBMP. Globalement les temps de réponses restent ici inférieurs à 5 minutes.

Le temps de réponse le plus rapide de 3 minutes est obtenu dans le cas de l'Agam4. Nous avons remarqué durant nos analyses qu'en utilisant la méthode 1 de greffage le $T_{90\%}$ semble plus long et notamment ceux avec l'Amel OBP 14.

Tableau 4.9 - Temps de réponse à 90% pour différents capteurs après 800s d'une exposition à une concentration de 240 ppb d'IBMP.

	$T_{90\%}$ Réponse exposition (s)
	Concentration de 240 ppb d'IBMP
aca-Amel OBP14	276
aca-Agam4	181
NTA-Ni-6hisOBP 1Pd	213
aca-wtOBPpig	218
NTA-Ni-m6hisOBP pig	195

4.2.2.e Durée de vie des capteurs

Une étude du vieillissement des capteurs a été effectuée : il s'agit de caractériser leur capacité à conserver une réponse identique au cours du temps. Pour cela, des capteurs ont été préparés puis stockés sous air sec à l'abri de la lumière entre chaque mesure pendant plusieurs mois. Par exemple, la Figure 4.9 montre l'évolution de la réponse d'un capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig au premier jour de fabrication, après 1 mois puis 3 mois de stockage, lorsque ce capteur est exposé dans les mêmes conditions à des vapeurs d'IBMP. Il est important de noter ici qu'il a été constaté que ces SAW devaient être réhydratés avant chaque mesure après stockage sous peine de voir leur sensibilité décroitre très significativement. Il est probable que les OBP immobilisés sur la surface du SAW se déshydratent pendant le stockage, ce qui affecterait drastiquement la conformation et donc le fonctionnement normal de ces protéines. En effet, dans la nature, les OBP évoluent principalement dans un environnement humide, il est ainsi probable que les LBP nécessitent un minimum d'hydratation pour être pleinement opérationnels.

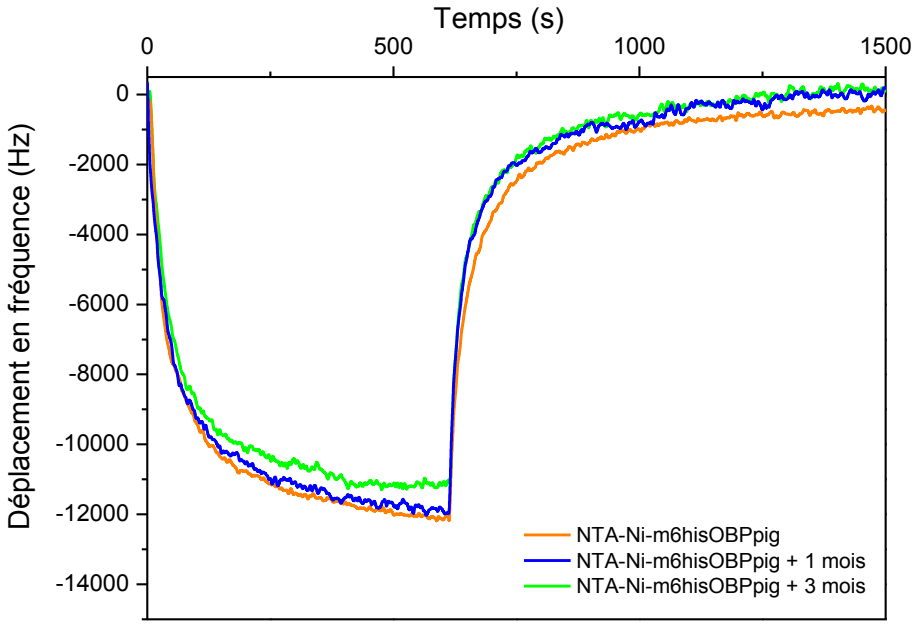


Figure 4.9 - Réponses des capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig à une concentration de 10 ppm d'IBMP à t_0 (orange) et à t_{1mois} (bleu) et à t_{3mois} (vert)

L'allure générale des réponses pour des expositions à t_{1mois} et t_{3mois} semblent très proches de celle mesurée à t_0. Après un mois de stockage la perte de signal en intensité est proche de 2 %. Et elle n'est que 8 % après 3 mois. Ceci a motivé davantage

d'expériences avec des durées plus longues, à t_{6mois}, t_{9mois} et $t_{12\ mois}$ et avec davantage de capteurs. Pour cela 8 capteurs de type NTA-Ni-m6hisOBPpig ont été choisis. La Figure 4.10 résume l'évolution de l'intensité de réponse de ces capteurs à des vapeurs d'IBMP après plusieurs mois. Une perte de signal d'environ 20% après 6 mois et 30% après 12 mois est observée. Cette réduction de sensibilité peut être vraisemblablement attribuée à une dégradation dans le temps des protéines. Néanmoins, cette perte de signal reste relativement faible, ce qui permet d'envisager l'utilisation prolongée de ces capteurs, éventuellement avec des re-calibrations ponctuelles. Ceci confirme bien la robustesse de la couche sensible malgré le fait qu'elle ait été retirée de son milieu biologique normal.

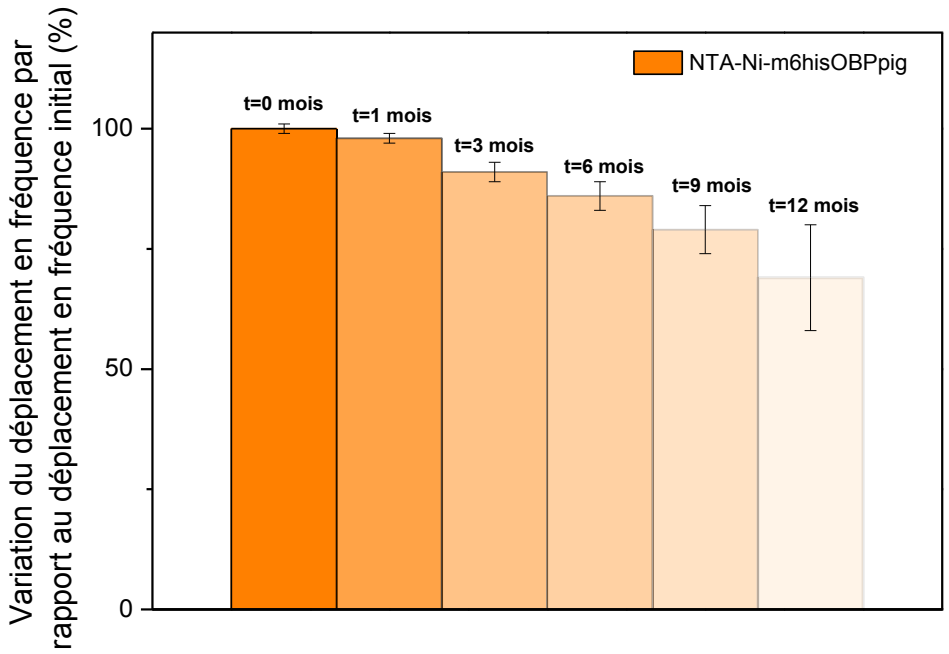


Figure 4.10 - Comparaison de la variation relative des réponses du capteur NTA-Ni-6hisOBPpig à une exposition d'IBMP à une concentration spécifique de 10 ppm, à t= 1, 3, 6, 9 et 12 mois

4.2.2.f Sensibilité

La sensibilité d'un capteur à un composé est l'évolution de l'intensité de sa réponse en fonction de la concentration du composé à détecter. Elle sera donc exprimée en $Hz.ppm^{-1}$. Si la caractéristique du capteur est linéaire, la sensibilité est constante. Nous avons donc évalué les sensibilités des capteurs à partir d'expositions cycliques à des concentrations décroissantes de composés cibles. Par exemple, la Figure 4.11, la Figure 4.12 et la Figure 4.13 montrent respectivement les réponses de plusieurs capteurs fonctionnalisés avec différents OBP et MUP pour plusieurs concentrations décroissantes d'IBMP, de 2,4-DNT et de 4-NT.

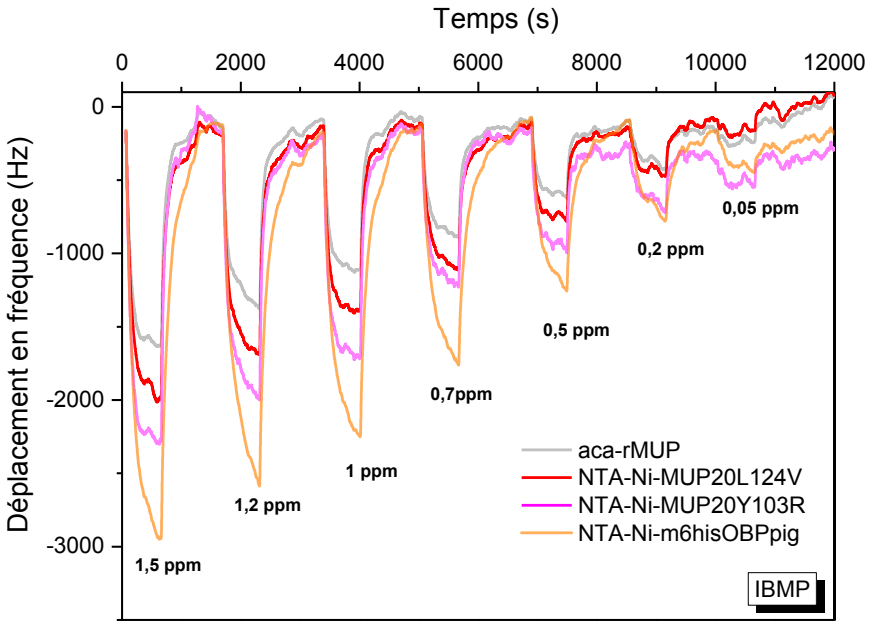


Figure 4.11 - Réponses de différents capteurs à des expositions d'IBMP à différentes concentrations

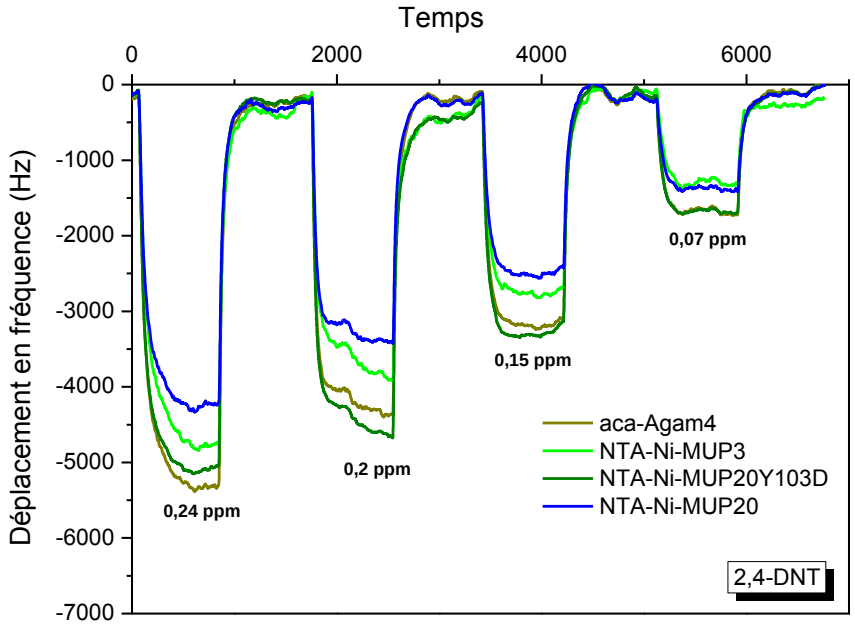


Figure 4.12 - Réponses de différents capteurs à des expositions de 2,4-DNT à différentes concentrations

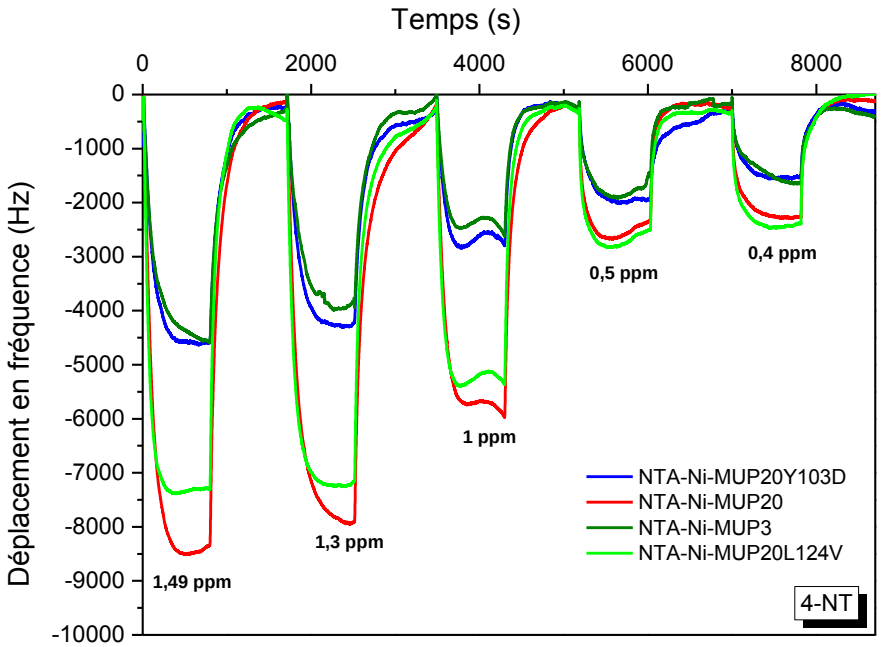


Figure 4.13 - Réponses de différents capteurs à des expositions de 4-NT à différentes concentrations

La concentration la plus basse qui a pu être générée pour l'IBMP était de 50 ppb à l'aide d'un tube à perméation. Cette concentration semble d'après la Figure 4.11 être proche de la limite de détection des capteurs dans ces conditions de mesures. A l'aide des courbes telles que celles présentés dans les 3 figures précédentes, les intensités de réponse au plus proche de l'équilibre sur la durée d'exposition ont été enregistrées pour tracer les droites de calibration des capteurs.

La Figure 4.14 montre un exemple d'évolution de la réponse (moyenné sur 5 expositions) de capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q à une concentration croissante d'IBMP. La réponse des capteurs n'est pas linéaire dans toute la gamme de concentration testée (0-12 ppm). Dans la mesure où la réponse des SAW comprend 2 composantes, l'une gravimétrique et l'autre viscoélastique, il est possible que ces 2 composantes évoluent différemment en fonction de la concentration d'espèces cibles. Ce phénomène a déjà été suggéré par B. Tard car observé sur d'autres capteurs SAW pendant ses travaux de thèse [1]. Dans la gamme de faibles concentrations (0-2 ppm), la réponse est linéaire et passe bien par zéro ce qui permet de déterminer la sensibilité en extrayant la pente de la régression linéaire. La sensibilité du capteur NTA-Ni-6hisMUP20L88Q est de 2259 Hz/ppm. Dans la gamme 2 ppm-12 ppm un autre régime linéaire peut être approximé en fittant par une droite cette fois ne passant pas par zéro et de pente 639 Hz/ppm, soit une sensibilité 70% plus faible que celle obtenue dans la gamme des faibles concentrations.

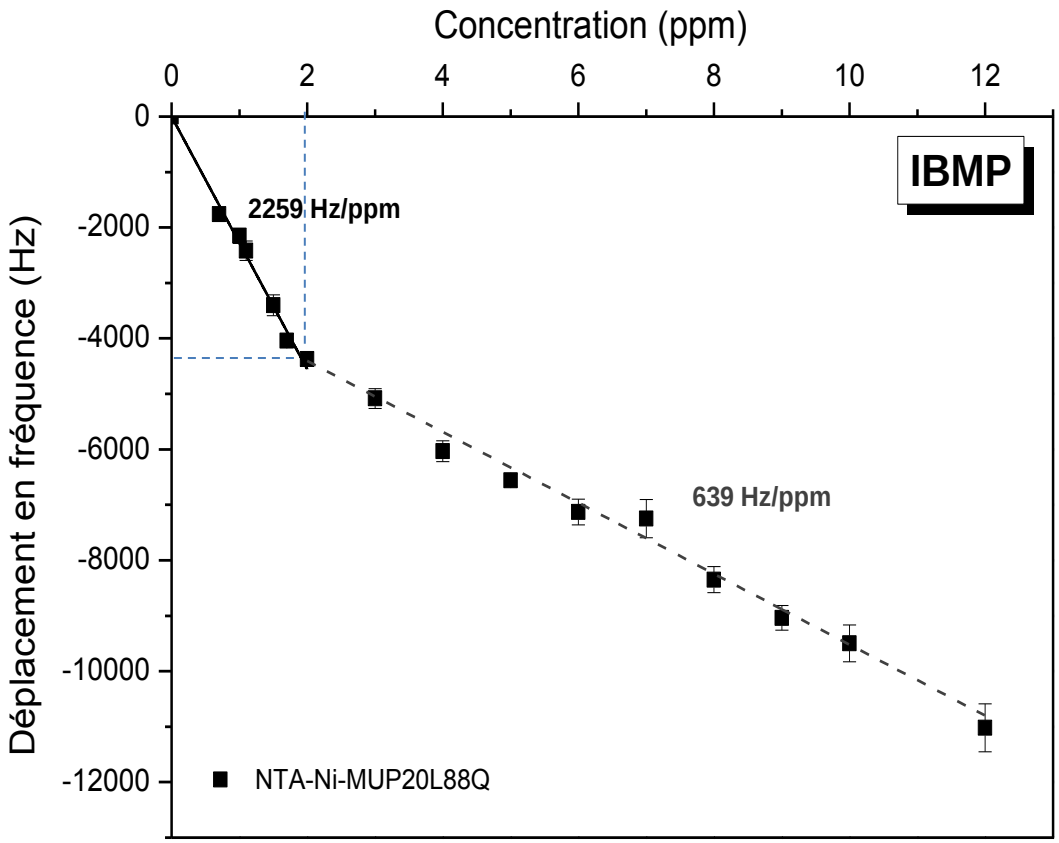


Figure 4.14 - Réponse moyenne à 5 expositions d'IBMP à différentes concentrations pour des capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q

La figure 4.15 montre les courbes de calibration de capteurs fonctionnalisés par des OBP (a) et par des MUP (b) pour l'IBMP dans la gamme de concentrations 0-2 ppm. De même, la Figure 4.16 et la Figure 4.17 montrent l'évolution des réponses de ces mêmes capteurs pour les composés 2,4-DNT dans la gamme de concentrations 0-240 ppb et 4-NT dans la gamme de concentration 0-1,5 ppm. Pour chaque courbe les points tracés correspondent à la moyenne de 5 points de mesure.

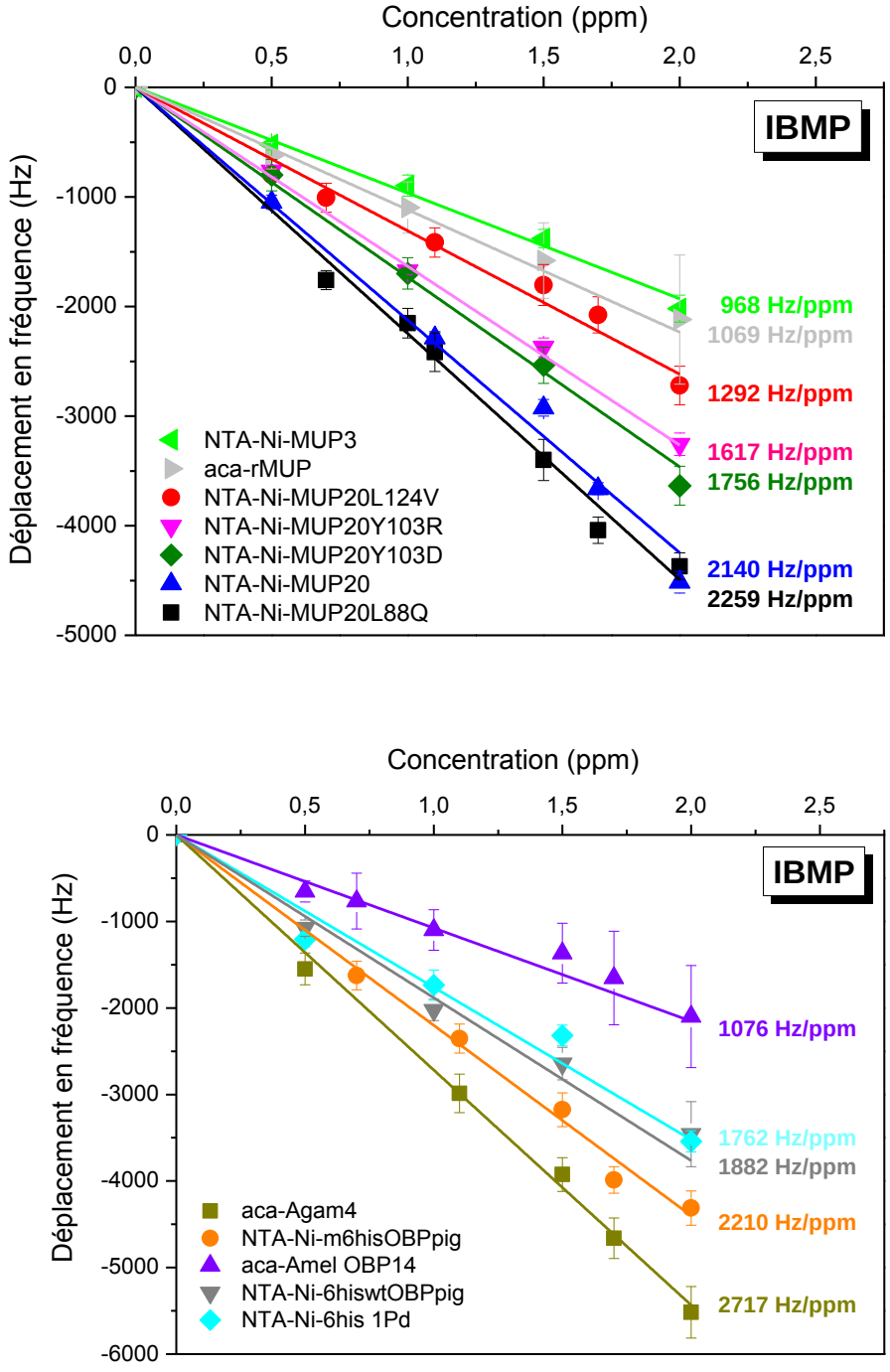


Figure 4.15 - (a) Réponse moyenne à 5 expositions d'IBMP pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des OBP ; (b) Réponse moyenne à 5 expositions d'IBMP pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des MUP

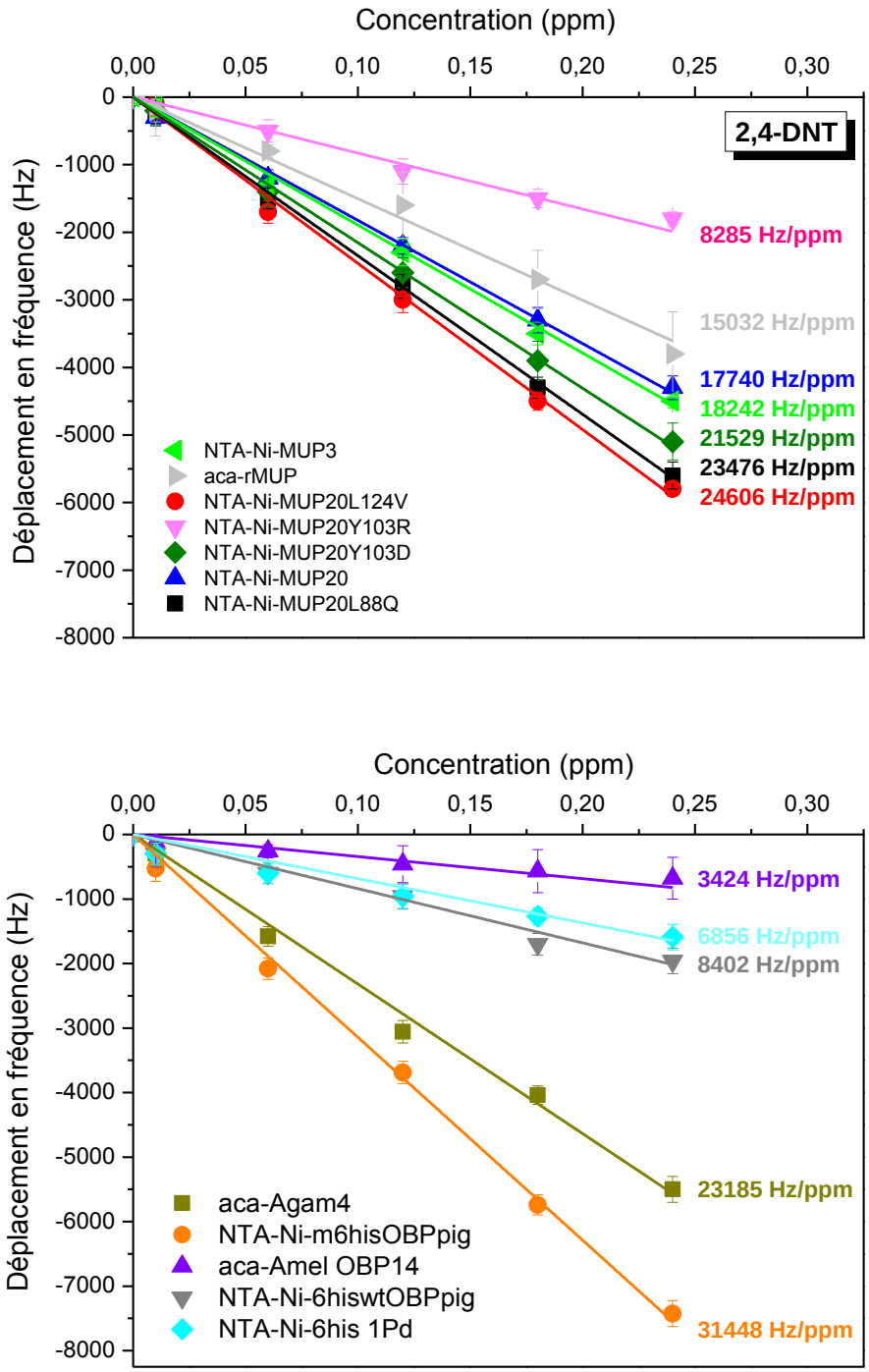


Figure 4.16 - (a) Réponse moyenne à 5 expositions de 2,4-DNT pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des OBP ; (b) Réponse moyenne à 5 expositions de 2,4-DNT pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des MUP

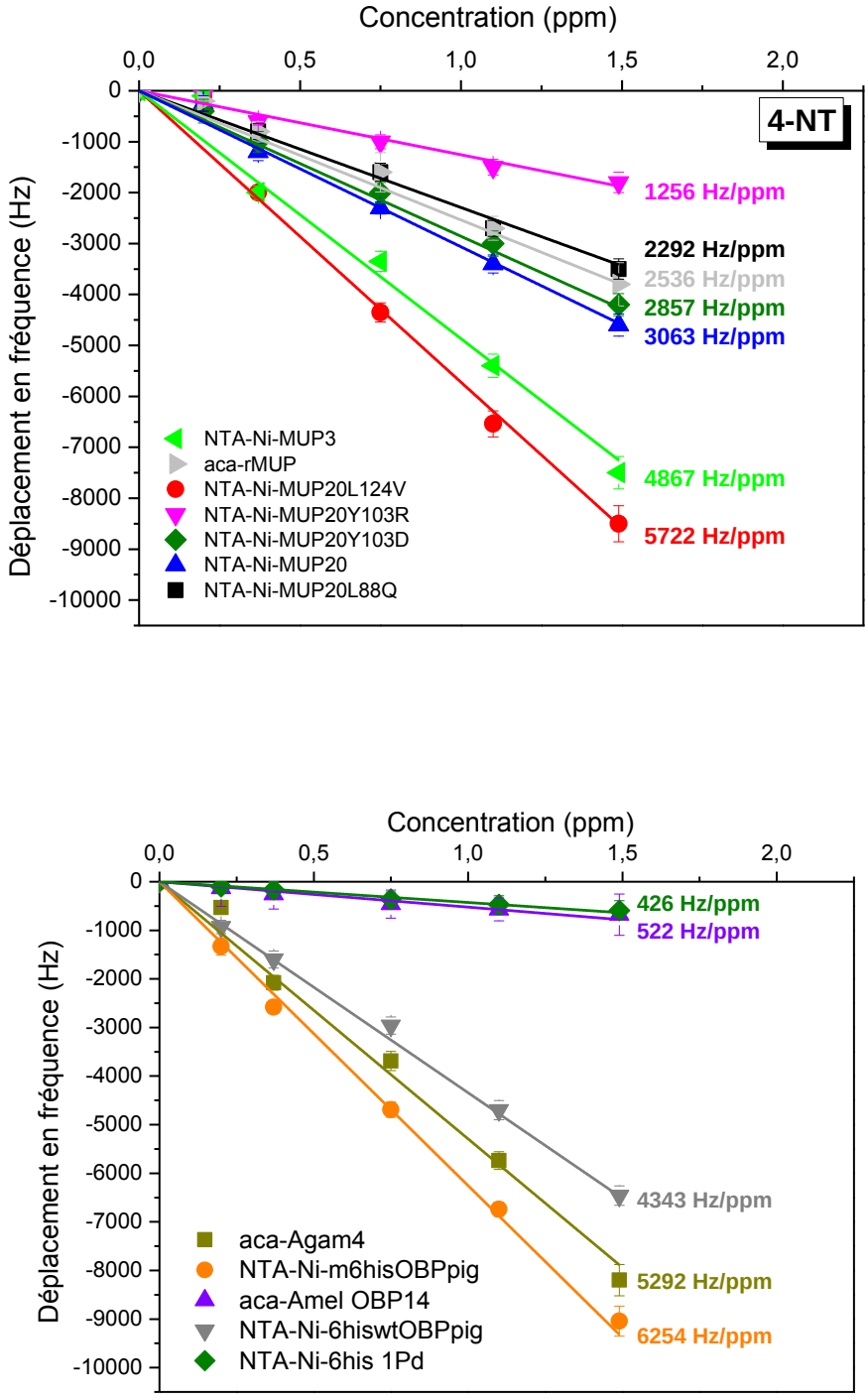


Figure 4.17 - (a) Réponse moyenne à 5 expositions de 4-NT pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des OBP ; (b) Réponse moyenne à 5 expositions de 4-NT pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des MUP

Dans les gammes de concentrations testées, nous pouvons observer dans un premier temps que toutes les réponses sont relativement linéaires. Pour le cas de l'IBMP, les sensibilités les plus importantes sont obtenues pour les capteurs NTA-Ni-Agam4, NTA-Ni-6hisMUP20L88Q et NTA-Ni-6hisMUP20. Le capteur NTA-Ni-Agam4 par exemple a une sensibilité pour l'IBMP de 2717 Hz/ppm. Ces résultats semblent être corrélés avec les constantes d'affinités des LBP envers l'IBMP. En effet, nous savons par exemple que la valeur de K_a de l'Agam 4 (4,3 M^{-1}) est plus grande que celle du 6his 1Pd (0,25 M^{-1}), ce qui est corrélé ici avec une sensibilité plus importante pour le capteur NTA-Ni-Agam4 que pour le NTA-Ni-6his 1Pd (1762 Hz/ppm).

Ces résultats peuvent être confrontés aux mesures de sensibilités effectuées en milieu liquide dans le chapitre 3. Pour comparaison, les 2 capteurs présentant les meilleures sensibilités en milieu liquide sont aussi les capteurs les plus performants en milieu gaz dans le cas de l'IBMP, et notamment NTA-Ni-m6hisOBPpig et NTA-Ni-6hisMUP20.

On note que le capteur aca-Amel OBP14 semble présenter les sensibilités les plus faibles pour chaque exposition avec des constantes de temps et des T90% plus élevés. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que cet OBP a été réceptionné en début de thèse, et élaboré bien avant. Il est notamment envisageable que lors des expériences de calculs de sensibilité, cet OBP d'abeille se soit dégradé voire agrégé : il semble que les OBP peuvent se conserver plus d'un an (voir les expériences de vieillissement effectué (Figure 4.9)) mais il est donc probable que l'OBP n'était alors plus autant fonctionnel au bout de 3 ans.

4.2.2.g Sensibilité et constantes d'associations K_a

A partir des valeurs de sensibilités obtenues précédemment par exemple pour le 2,4-DNT et le 4-NT, nous les avons comparées aux constantes K_a des différents MUP et OBP évalués au chapitre 2 en milieu liquide pour ces composés (Figure 4.18 et Figure 4.19)

Les constantes d'affinité du 6hiswtOBPpig, 6hisMUP20Y103R et du 6his 1Pd sont parmi les plus faibles et il semble que les sensibilités de ces 3 capteurs pour le 2,4-DNT soient aussi très faibles comparés à celles des capteurs les plus performants. En effet, une faible constante d'association laisse présager une faible sensibilité au composé, ce qui est bien le cas pour notre étude. Cependant tous ces résultats ne semblent pas se corréler. Les capteurs NTA-Ni-6hisMUP20Y103R, NTA-Ni-6hisMUP20Y103D, NTA-Ni-6hisMUP20 et NTA-Ni-6hisMUP20L88Q devraient présenter des sensibilités plus faibles étant donné leur Ka peu élevées.

Les plus importantes Ka sont celles du MUP3 et du 6hisMUP20L124V or dans notre cas, il semble que les 2 capteurs NTA-Ni- MUP3 et NTA-Ni- 6hisMUP20L124V ne soient pas les plus sensibles à le composé 2,4-DNT comme on peut le voir dans la Figure 4.18. Le capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig semble être le plus performant.

Pour l'étude des sensibilités du 4-NT, on retrouve à quelques détails près, les mêmes tendances que celles trouvées pour les constantes d'association. Les capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L124V, NTA-Ni-m6hisOBPpig et aca-Agam4 semblent les plus sensibles au 4-NT et comme observé sur la Figure 4.19, les Ka de ces 3 LBP sont les plus élevées pour le 4-NT. Les 3 MUP suivants, 6hisMUP20Y103D, 6hisMUP20 et 6hisMUP20L88Q présentent des Ka très proches et comme on peut remarquer sur la figure, les capteurs NTA-Ni-6hisMUP20Y103D, NTA-Ni-6hisMUP20 et NTA-Ni-6hisMUP20L88Q ont aussi des sensibilités très proches.

La faible constante d'affinité du 6hisMUP20Y103R et du 6his 1Pd laisse présager une faible sensibilité au 4-NT, ce qui est bien le cas pour notre étude pour le 6hisMUP20Y103R mais pas pour le capteur NTA-Ni-6his 1Pd qui semble présenter une sensibilité satisfaisante.

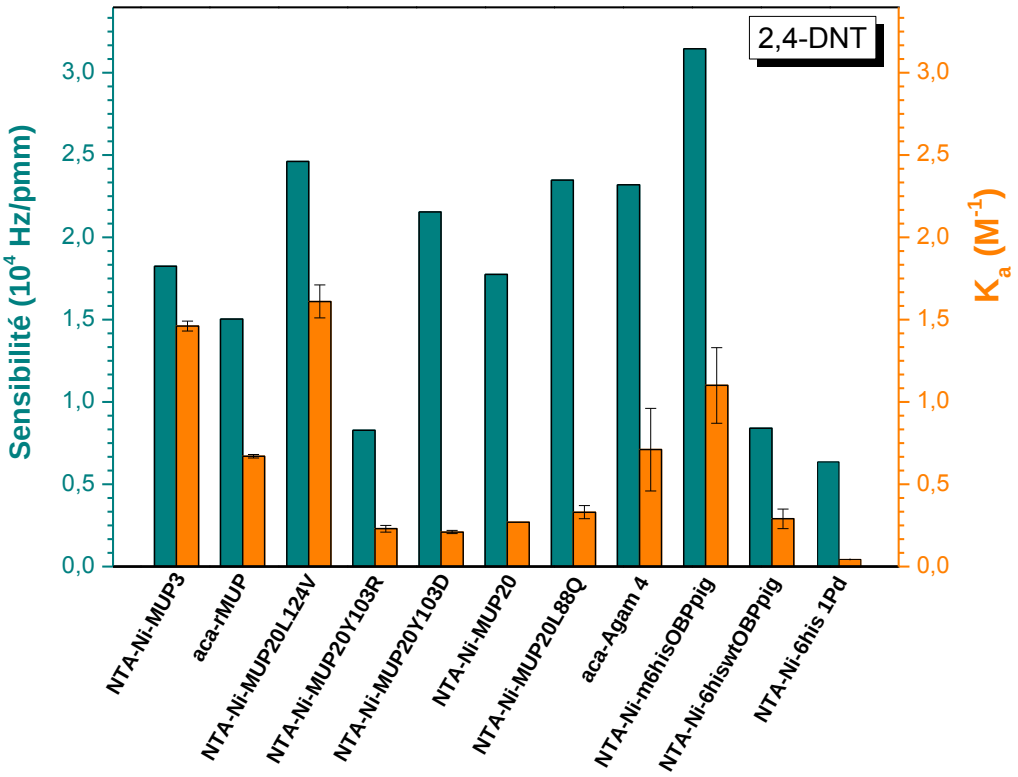


Figure 4.18 - Comparaison des sensibilités obtenues avec les capteurs SAW fonctionnalisés de LBP et les constantes d'affinités des différents LBP calculées en milieu liquide pour le composé 2,4-DNT

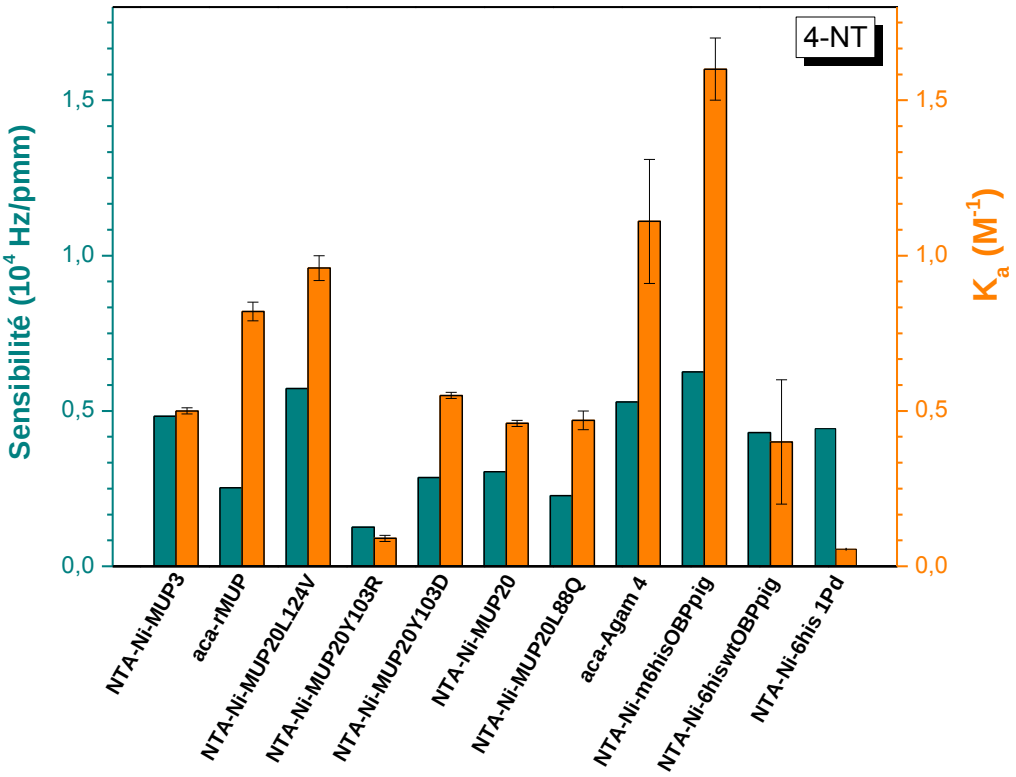


Figure 4.19 - Comparaison des sensibilités obtenues avec les capteurs SAW fonctionnalisés de LBP et les constantes d'affinités des différents LBP calculées en milieu liquide pour le composé 4-NT

En résumé, nous avons étudié dans cette section la cinétique des réponses aux expositions à l'IBMP, au 2,4-DNT et au 4-NT. L'étude a montré que la plupart des capteurs testés présentaient des temps de réponses à 90% inférieurs à 5 minutes, des constantes de temps aux alentours d'1 minute, et un début de détection quasi immédiat. Ces mesures ont été effectuées dans des conditions contrôlées de laboratoire, dans la section suivante nous verrons la détection des composés explosifs et de drogues dans des conditions de terrain et semi-réelles avec la méthode d'entrainement de vapeur par aspiration et aussi l'utilisation du dispositif SNIFFER développé en parallèle à cette étude.

4.3 Campagnes de mesures sur composés réels : explosifs et drogues

Dans le cadre du projet SNIFFER, l'opportunité s'est présentée de réaliser des campagnes de mesures dans le laboratoire du CREL (Centre de Recherche et d'Expertise de la Logistique- qui dépend du ministère de l'intérieur), avec un large panel de composés réels de types explosifs et drogues. Les compositions et informations diverses sur les différents composés utilisés au cours de cette étude sont détaillées en annexes B. Cette collaboration a permis d'avoir accès à des produits illicites issus de saisies judicaires. Ces composés étant de fabrication artisanale, ils ne sont généralement pas purs : dans le cas des explosifs ils contiennent par exemple souvent des agents liants. Dans le cas des drogues ils comportent des produits de coupes. Néanmoins, parfois la présence de ces additifs peut en faciliter la détection puisque par exemple les liants et les plastifiants contenus dans les explosifs de saisie sont généralement plus volatils que les explosifs eux-mêmes.

4.3.1 Méthode d'entrainement de vapeur par aspiration

Les composés illicites sont placés dans des tubes métalliques fermés par une grille comme présenté dans la section 2.4.2.a du chapitre 2. La technique utilisée dans ce cas, contrairement à celle présentée précédemment dans les conditions contrôlées de laboratoire, n'est pas quantitative mais juste qualitative. Il s'agit de la technique d'entrainement de vapeur par aspiration. L'aspiration, dans ce cas, s'est effectuée avec un flux constant de 300 sscm. Les temps d'expositions sont d'environ une minute. Dans ce cas d'étude, aucun préconcentrateur ou chauffage externe n'a été utilisé pour améliorer le signal de détection obtenu. Nous avons utilisé pour ces premières mesures le système SAGAS fourni par le KIT tel que décrit dans le chapitre 2.

4.3.1.a Performance des capteurs

Six capteurs SAW fonctionnalisés avec les LBP suivant par la méthode 1 et 2 : NTA-Ni-6hisMUP20, NTA-Ni-m6hisOBPpig, NTA-Ni-6his 1Pd, aca-Agam4, aca-Agam47 et aca-Amel OBP14, ont donc été testés sous expositions de différents composés illicites.

Les Figure 4.20, Figure 4.21, Figure 4.22, Figure 4.23 et Figure 4.24 montrent respectivement les réponses caractéristiques des capteurs fonctionnalisés par des LBP à une exposition de cannabinol chauffé à 35°C, de dynamite, de plastifiant, de TNT pur standard ne provenant pas de saisie et enfin de TNT provenant de saisie. Les débuts de chaque exposition sont indiqués sur chaque figure par une flèche de couleur verte et les

fins d'exposition (retour à la ligne de base quand cela est possible) sont indiquées par une flèche rouge.

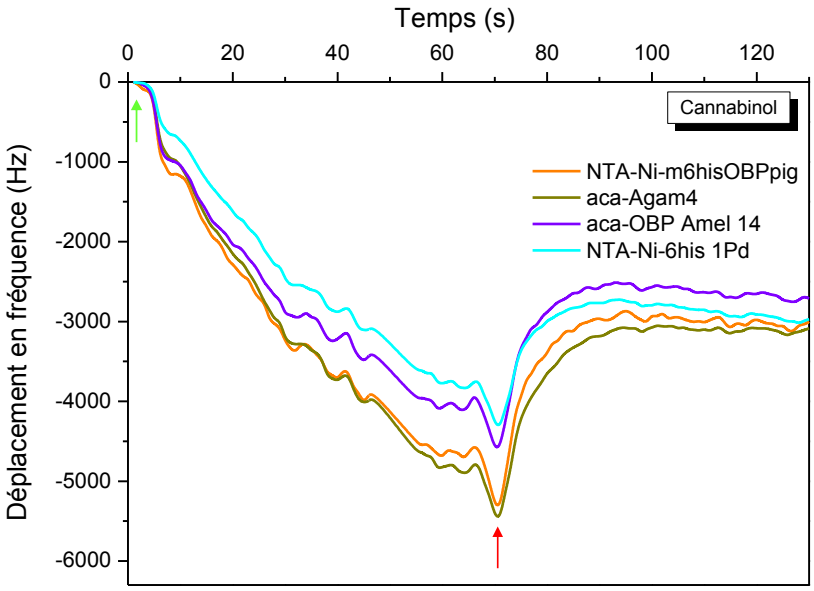


Figure 4.20 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à une exposition de cannabinol chauffé à 35°C

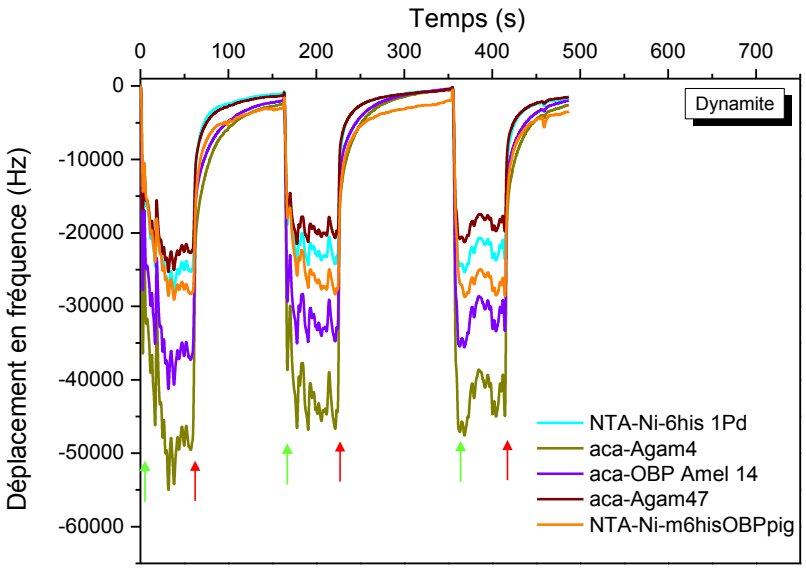


Figure 4.21 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à trois expositions de dynamite

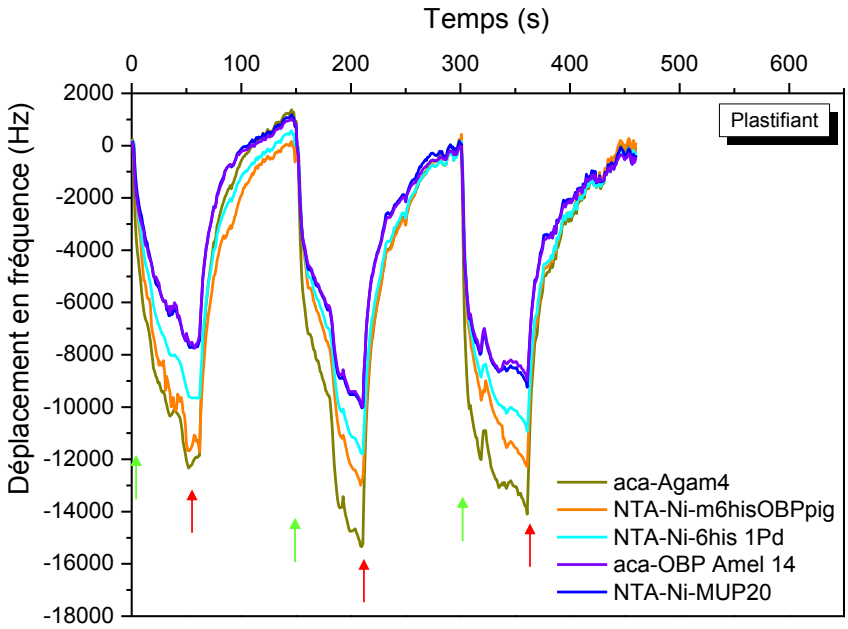


Figure 4.22 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à trois expositions de plastifiant

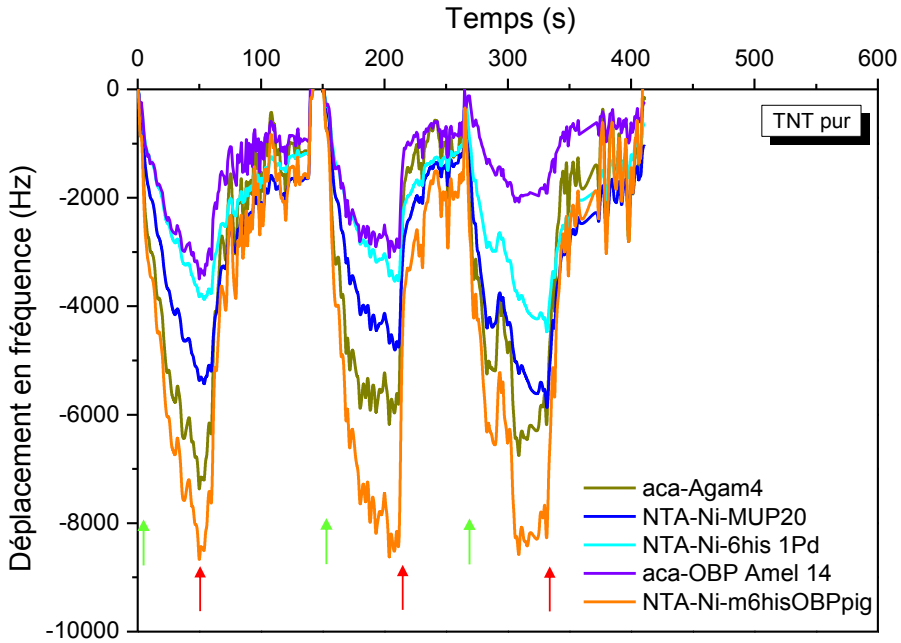


Figure 4.23 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à trois expositions de TNT (pur, ne provenant pas de saisie)

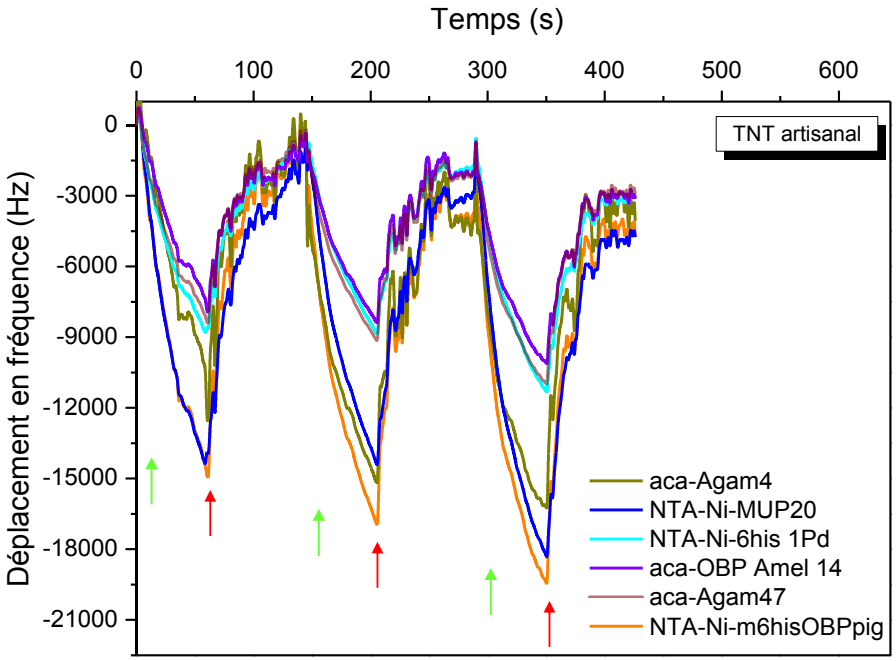


Figure 4.24 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à trois expositions de TNT de saisie.

Les réponses des capteurs se sont avérées généralement franches et réversibles pour la plupart des explosifs testés, et ce malgré leurs pressions de vapeur saturante très faibles et notamment celle du TNT (quelques ppb à 25°C). En comparant les réponses des capteurs aux 2 types de TNT (TNT pur et TNT de fabrication artisanale), on remarque que les réponses présentent des réponses presque 2 fois plus élevées pour le TNT de fabrication artisanale. La présence probable d'éléments additifs ou d'impuretés dans la composition de cet explosif artisanal permet donc d'obtenir des réponses plus élevées malgré la faible pression de vapeur saturante du TNT. Par exemple, la présence de 2,4-DNT, produit dérivé de la synthèse du TNT et qui présente une pression de vapeur bien plus importante, n'est pas à exclure, ce qui pourrait contribuer à la réponse franche observée pour le TNT de saisie.

Dans le cas du cannabinol par exemple, pour lequel la pureté a été garantie par le fournisseur, la réponse est relativement faible même quand l'échantillon est chauffé à 35°C.

Dans ce cas précis, la détection est peu réversible comme on a pu le voir sur le Figure 4.20, ce qui suggère une probable condensation du composé dans le tube d'aspiration par exemple, ou une adsorption complète des molécules de drogues sur les SAW sans aucune possibilité de désorption. Ceci montre bien l'importance de la qualité de la prise d'échantillon.

Il apparait que les capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig et aca-Agam4 sont les plus performants pour détecter les composés explosifs. En effet le capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig montre les réponses les plus importantes pour le TNT, alors que le capteur aca-Agam4 est le plus sensible à la dynamite. Le capteur NTA-Ni-6hisMUP20 semble aussi présenter des réponses généralement franches aux explosifs.

4.3.1.b Apprentissage neuronal

Une approche de type nez électronique est une technique qui permet de discriminer un composé par rapport à un autre grâce à un système multicapteurs couplé à un logiciel d'apprentissage basé sur l'analyse neuronale (modèle de calcul schématiquement inspirée du fonctionnement des neurones biologiques) [17]. Ici le réseau multi-capteurs est basé sur 8 capteurs SAW comportant une couche de nanodiamants en surface, chacune fonctionnalisée par un LBP différent. La phase de reconnaissance comporte 3 étapes : l'enregistrement d'une base de données des réponses de détection, une phase d'apprentissage, et enfin la reconnaissance de composés cibles en temps réel.

Dans notre étude, seuls 4 composés ont été étudiés pour les essais de discrimination. Ainsi, l'apprentissage a été effectué avec le TNT, le Semtex, la dynamite et le plastifiant qui peut être contenue dans certains explosifs de fabrication artisanale.

La Figure 4.25 montre l'exemple d'une capture d'écran du logiciel lorsque les capteurs sont exposés à des vapeurs de TNT. L'algorithme de reconnaissance qui fonctionne ici en temps réel permet de reconnaitre effectivement le TNT avec un pourcentage de certitude de typiquement 98%. Des résultats similaires ont été observés pour les trois autres composés dans ce cas.

Même si ces résultats restent préliminaires, ils permettent d'illustrer le potentiel d'une telle technologie et la possibilité d'utiliser les LBP comme couche sensible dans ce type d'application. Ces travaux continuent d'être explorés dans le cadre du projet SNIFFER.

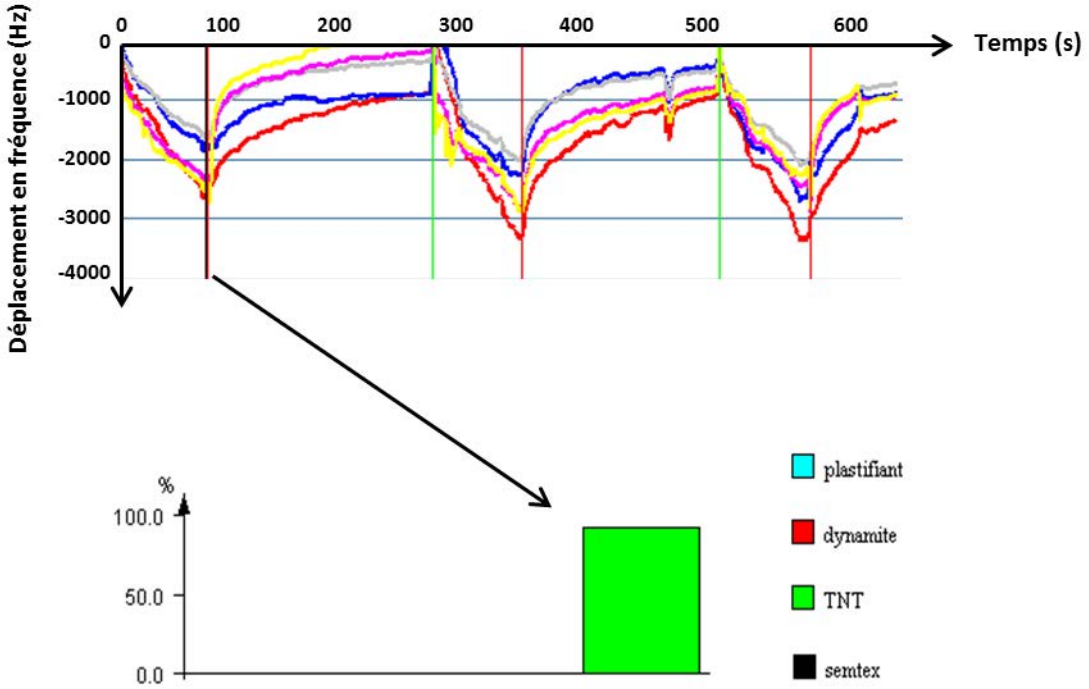


Figure 4.25 - Capture d'écran du logiciel d'acquisition : (en haut) Réponses de 5 capteurs au TNT ; (en bas) Résultat d'algorithme qui reconnait la signature du composé à partir des réponse des capteurs. Le TNT ici a été reconnu avec une fiabilité de 98%.

4.3.2 Utilisation du dispositif Sniffer développé au cours de l'étude

Le prototype du projet Sniffer décrit dans la section 2.4.2.b du chapitre 2. a aussi été testé dans le laboratoire du CREL pour évaluer les performances du système pour détecter des drogues et explosifs purs ou expérimentaux. Les capteurs intégrés à ce système pour cette étude étaient les SAW revêtus de diamant et fonctionnalisés par les OBP et MUP disponibles dans ce projet. Comme évoqué dans le chapitre 2, ici des composés solides ont été déposés sur la plaque chauffante de l'échantillonneur de particules puis désorbés thermiquement pour être envoyés vers les capteurs en phase vapeur. Ces mesures ont permis d'évaluer les limites de détection des capteurs dans ces conditions de mesure ainsi que d'étudier la réponse relative des différents capteurs aux différents composés cibles en fonction de protéines immobilisées sur les capteurs.

Performance des capteurs

Les mesures suivantes ont été réalisées à partir de 7 capteurs SAW fonctionnalisés, la huitième voie du dispositif étant provisoirement défaillante au moment de ces essais. La sensibilité des capteurs varie sensiblement en fonction du type de LBP greffé à la

surface du SAW, comme attendu. Aussi, la limite de détection (LOD) a été déterminée pour chaque composé avec le capteur le plus sensible dans le réseau. Par exemple, dans le cas du TNT il s'agit de la fonction NTA-Ni-m6hisOBPpig. Pour ce capteur, le niveau de bruit est évalué à environ1045 Hz (Figure 4.26). La LOD est alors définie par le signal détectable minimal lorsque la réponse est 3 fois supérieure au bruit, soit ici de 3135 Hz. D'après la Figure 4.26, la LOD est alors comprise dans une fourchette de 100 ng à 250 ng. Cette valeur est remarquable par rapport à l'état de l'art.

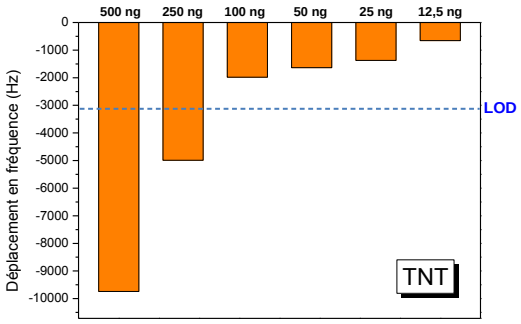


Figure 4.26 - Niveau de réponse du capteur SAW NTA-NI-m6hisOBPpig après 20 secondes d'exposition aux vapeurs issues des quantités solides déposés sur la plaque chauffante représentées par l'axe des x.

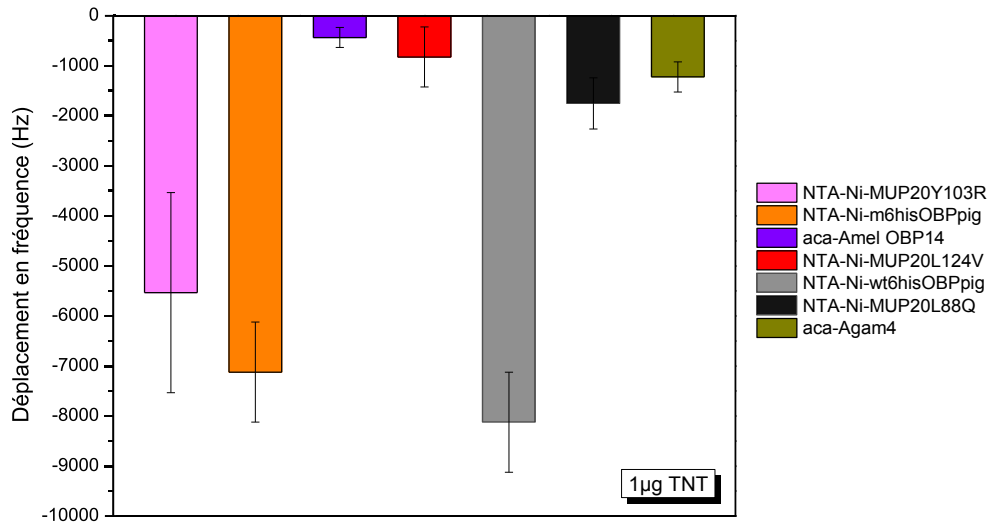
Ainsi, à titre indicatif le Tableau 4.10 résume les LOD pour chacun des composés testés lors des mesures effectuées avec le prototype Sniffer.

Tableau 4.10 - Mesure de LOD pour chaque composé de l'étude

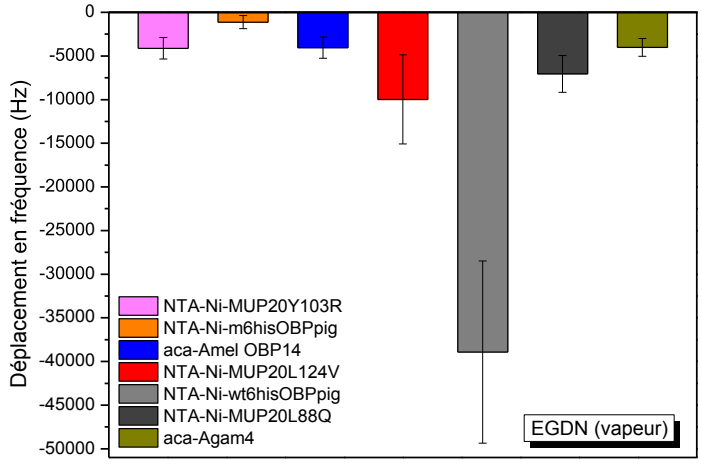
Composés	LOD
TNT (100 ng/µL dans du cyclohexane)	100 ng <LOD< 250ng
RDX (1µg/µL dans de l'acétonitrile)	LOD ≥ 1µg
Cannabinol (1 mg/mL dans du méthanol)	300 ng <LOD< 500 ng
Cocaïne (1 mg/mL dans l'acétonitrile)	LOD ≥ 100 ng
DNT	200 ng <LOD< 500 ng
MDMA	200 ng <LOD< 500ng
MDMA (1 mg/mL dans du méthanol)	50 ng <LOD<100 ng
PETN	50 ng <LOD<100 ng
Heroïne	35 ng < LOD < 55 ng

La Figure 4.1 présente les réponses moyennées de 3 capteurs fonctionnalisés par les différents OBP et MUP pour 3 expositions à différents composés à une concentration de 1µg pour le TNT, l'EGDN, le PETN, le cannabinol, la cocaïne, et de 1,75µg pour l'héroïne.

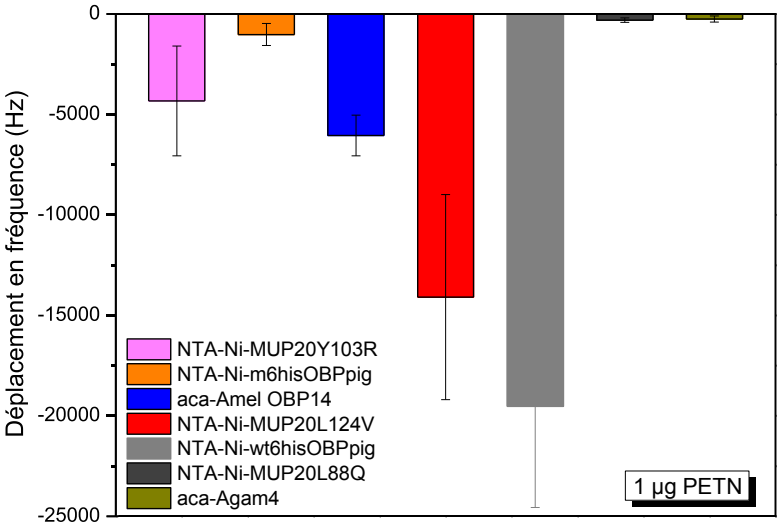
(a)



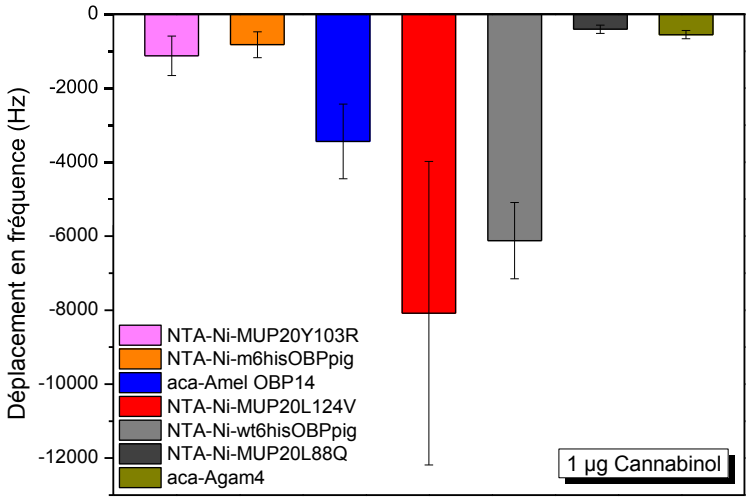
(b)



(c)


0
-5000
-10000
-15000
-20000
-25000
Déplacement en fréquence (Hz)
NTA-Ni-MUP20Y103R
NTA-Ni-m6hisOBPpig
aca-Amel OBP14
NTA-Ni-MUP20L124V
NTA-Ni-wt6hisOBPpig
NTA-Ni-MUP20L88Q
aca-Agam4
1 µg PETN

(d)


0
-2000
-4000
-6000
-8000
-10000
-12000
Déplacement en fréquence (Hz)
NTA-Ni-MUP20Y103R
NTA-Ni-m6hisOBPpig
aca-Amel OBP14
NTA-Ni-MUP20L124V
NTA-Ni-wt6hisOBPpig
NTA-Ni-MUP20L88Q
aca-Agam4
1 µg Cannabinol

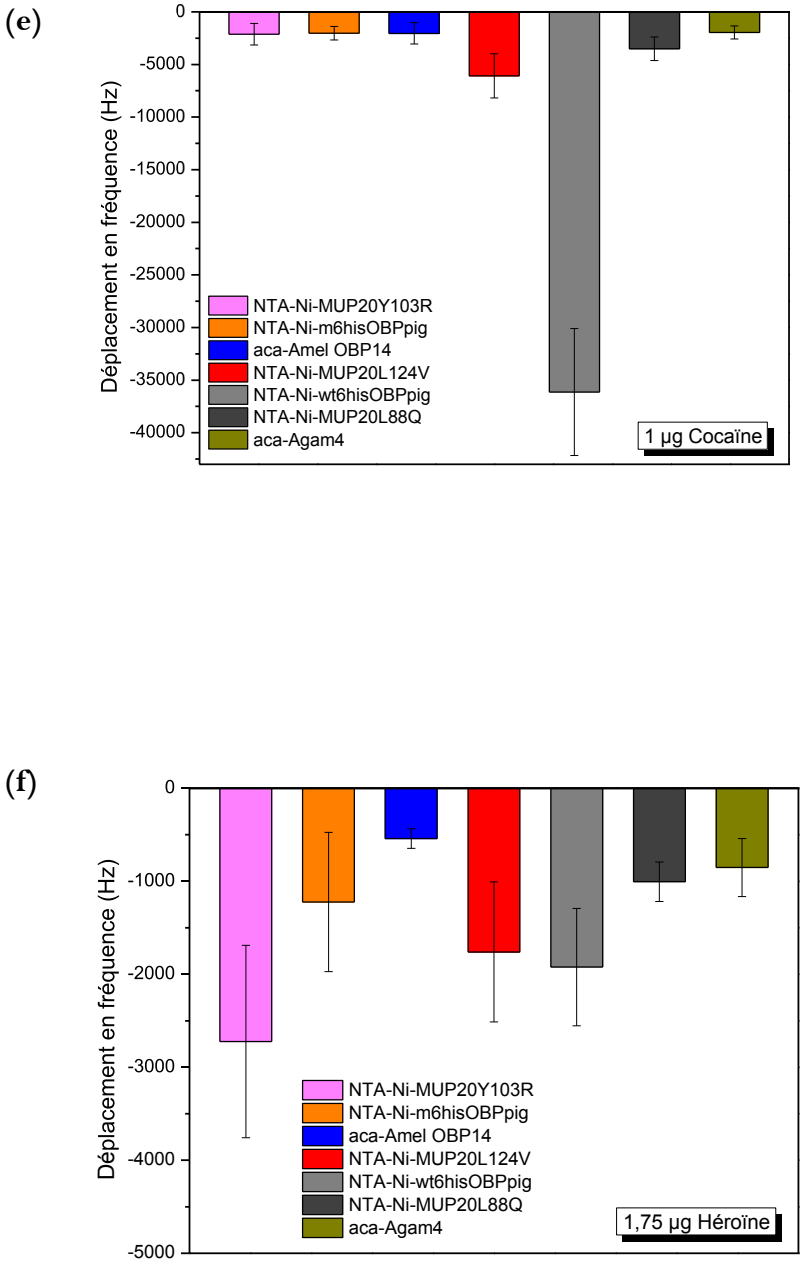


Figure 4.27 - (a) Réponses moyennées de 3 capteurs fonctionnalisés par différents OBP et MUP pour 3 expositions de TNT à une concentration de 1 µg, (b) pour 3 expositions à des vapeurs d'EGDN (c) pour 3 expositions de PETN à une concentration de 1 µg (d) pour 3 expositions de cannabinol à une concentration de 1 µg (e) pour 3 expositions de cocaïne à une concentration de 1 µg, et (f) pour 3 expositions d'héroïne à une concentration de 1,75 µg

Le capteur avec l'OBP mutant de porc semble très sensible au TNT mais est cependant peu sensible aux autres composés. Le capteur NTA-Ni-wt6hisOBPpig semble être sensible à l'ensemble des composés de cette étude. Il semble tout particulièrement sensible à l'EGDN et à la cocaïne contrairement aux autres capteurs qui ne le sont que très faiblement pour ces 2 composés. De manière plus générale, nous pouvons observer que les niveaux de réponse relatifs entre les différents capteurs sont très différents d'une espèce à l'autre. Cela semble indiquer qu'il est possible d'obtenir pour chaque composé une « empreinte » différente et donc reconnaissable, dans la limite de l'expérimentation. Cela apparait donc très prometteur en termes de sélectivité pour le dispositif Sniffer. Des travaux sont encore en cours sur ce prototype à ce jour et permettront de confirmer cette observation.

4.4 Conclusion

Très peu de travaux ont été effectués avec les LBP pour l'élaboration de biocapteurs en milieu gazeux en dehors de notre étude. Nous avons vu dans le chapitre 4 que la détection d'odeurs grâce aux LBP dans ce type de milieu était possible et que ces capteurs pouvaient même être très sensibles à certains composés.

Les propriétés de détection des transducteurs SAW pour chaque LBP immobilisé, en termes de sensibilité, de cinétique et de reproductibilité ont été caractérisées à l'aide d'exposition à différents composés volatils. Les capteurs ont été exposés à des vapeurs d'IBMP, de 2,4-DNT et 4-NT dans des conditions contrôlées de laboratoire et à des composés réels issus de saisies dans le cas d'explosifs et de drogues, lors de plusieurs campagnes de mesures menées dans le laboratoire du CREL. Ces mesures ont permis de montrer que les capteurs fonctionnalisés d'OBP ou de MUP étaient capables de détecter des composés aux pressions de vapeurs saturantes très faibles (tels que le TNT). Les capteurs ont présenté des niveaux de réponses très satisfaisants. Les capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig, aca-Agam4 et NTA-Ni-6hisMUP20L124V se sont avérés les plus performants et sensibles à de nombreux composés tels que les explosifs avec des sensibilités importantes et des temps de réponses plus courts que la majorité des autres capteurs.

Enfin, les mesures de détection de drogues ont confirmé la difficulté à détecter ce type de composés aux pressions de vapeur saturante extrêmement faibles. Néanmoins, grâce au prototype SNIFFER, il a été possible d'avoir des réponses exploitables et même notamment dans le cas de la cocaïne.

Bibliographie du chapitre 4

[1] Tard. B. (2013). Etudes des interactions gaz-surfaces diamant par gravimétrie sur résonateur à onde acoustique. Thèse. Université Pierre et Marie Curie.
[2] Girard, H. a., Scorsone, E., Saada, S., Gesset, C., Arnault, J. C., Perruchas, S., Bergonzo, P. (2012). Electrostatic grafting of diamond nanoparticles towards 3D diamond nanostructures. Diamond and Related Materials, 23, 83–87.
[3] Scorsone, E., Saada, S., Arnault, J. C., & Bergonzo, P. (2009). Enhanced control of diamond nanoparticle seeding using a polymer matrix. Journal of Applied Physics, 106(1), 014908.
[4] Di Pietrantonio, F., Cannatà, D., Benetti, M., Verona, E., Varriale, a, Staiano, M., & D'Auria, S. (2013). Detection of odorant molecules via surface acoustic wave biosensor array based on odorant-binding proteins. Biosensors & Bioelectronics, 41, 328–34.
[5] Williams, A. F. (1991). Cellular Interactions - out of Equilibrium. Nature 352, 473-474.
[6] Kubi, J. (1994). Immunology. W. H. Freeman and Company, New York.
[7] Brunauer S., Emmett P. H., Teller E. (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers, Journal of the American Chemical Society 60, 309-319.
[8] Freundlich H. Z. (1906) Over the adsorption in solution, J. Phys. Chem. 57A, 385-470.
[9] Temkin M., Pyzhev V. (1939) Kinetics of the synthesis of ammonia on promoted iron catalysts, J. Phys. Chem. 13, 851.
[10] Dubinin M. M., Zaverina E. D., Radushkevich L. V. (1947) Zhur. Fiz. Khim., 21, 1351.
[11] Dubinin M. M. (1960) The potential theory of adsorption of gases and vapors for adsorbents with energetically nonuniform surfaces, Chemical Reviews 60, 235-241.
[12] Jovanovic D. S. (1969) Physical adsorption of gases. I. Isotherms for monolayer and multilayer adsorption, Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift Fur Polymere 235, 1203-1213.
[13] Langmuir I. (1918) The adosrption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, J. Am. Chem. Soc. 40, 1361-1403.
[14]Adamson A. W. (1990) Physical chemistry of surfaces, 5th edition, Wiley, New York.
[15] M. Camara, (2009) Développement d'un micro-préconcentrateur pour la détection de substances chimiques à l'état de trace en phase gaz. Thèse, Université de Neuchatel.
[16] Li, Z.-F., Blum, F. D., Bertino, M. F., & Kim, C.-S. (2013). Understanding the response of nanostructured polyaniline gas sensors. Sensors and Actuators B: Chemical, 183, 419–427.
[17] C. Bishop, (2006) Pattern recognition and machine learning. Springer.

Conclusion générale

Des MEMS de type microleviers et SAW en diamant ont été utilisés dans les travaux de recherche, objet de cette thèse, comme transducteurs innovants pour la fabrication de biocapteurs. Ces transducteurs présentent de nombreux avantages, notamment grâce aux propriétés physiques et chimiques exceptionnelles du diamant, permettant d'envisager l'amélioration considérable des performances en termes de robustesse et de propriétés de détection. Un des avantages du diamant repose sur sa chimie unique qui a permis d'immobiliser des biorécepteurs sur la surface des transducteurs pour élaborer de biocapteurs olfactifs pour la détection de petites molécules odorantes. Ces travaux ont permis l'immobilisation des LBP de type OBP, OR et MUP sur transducteurs en diamant, des avancées qui sont à l'état de l'art.

Notre approche a spécifiquement porté sur l'optimisation des voies de greffage de récepteurs olfactifs, et leur évaluation en condition de détection. Deux voies de greffage ont été envisagées :

- la méthode 1 passe par le greffage de l'acide aminocaproïque sur diamant hydrogéné suivi d'un couplage classique EDC/NHS. Ce choix de fonctionnalisation avait déjà été validé précédemment par différentes études. Un des inconvénients résulte a priori en une orientation aléatoire des protéines immobilisées sur la surface

- la méthode 2 est une technique beaucoup plus innovante, dans laquelle l'étape de fonctionnalisation utilise le greffage du complexe NTA-Ni sur la surface hydrogénée du diamant. Cette méthode requiert des LBP ayant une étiquette 6his pour permettre leur immobilisation, l'étiquette étant localisée sur la protéine à l'opposé de la cage réceptrice de ligand. Cette technique présente l'avantage de contrôler l'orientation de la protéine greffée sur la surface du transducteur, ce qui permet d'améliorer la disponibilité des sites de détection. Cette méthode innovante a été abordée en détail et ses avantages évalués sur plusieurs cas concrets de détection.

Dans un premier temps, diverses techniques de caractérisations physico-chimiques, telles que l'imagerie MEB, l'AFM, l'XPS, la spectroscopie de fluorescence, la spectroscopie EIS et la mesure optique par vibrométrie laser, ont été employées pour valider les 2 méthodes de greffage ainsi que pour confirmer l'immobilisation des protéines LBP sur diamant.

Nous avons pu vérifier qu'un tel greffage n'est pas possible sur un échantillon de contrôle négatif pour lequel la surface de diamant a préalablement été oxydée en surface. En comparant les 2 méthodes de greffage, plusieurs indications semblent avantager la méthode 2 qui montre une densité de greffage des protéines plus importante.

Dans un second temps, des LBP ont été greffées en utilisant les méthodes de greffage précédemment validées sur des microleviers en diamant. Les résultats de détection de différents composés organiques, obtenus avec ces capteurs en milieu liquide, ont permis de comparer les performances en termes de sensibilité, d'une part en fonction des méthodes d'immobilisation utilisées, mais également en fonction de différents types de LBP provenant de différentes espèces (mammifères, insectes). La cinétique des réponses a également été étudiée, montrant que la plupart des capteurs testés présentaient une cinétique de réponse de type exponentiel. Ainsi, la méthode 2 de greffage a permis d'obtenir de manière générale des capteurs microleviers plus sensibles aux composés IBMP, 2,4-DNT et 4-NT en milieu liquide avec une détection significativement plus rapide qu'en utilisant la méthode 1 de greffage. Les résultats obtenus, par mesure optique, suggèrent que l'orientation des protéines sur la surface grâce au greffage via le tag 6his, a un effet positif sur la sensibilité des capteurs. Les capteurs préparés avec la méthode 2 de greffage montrent des résultats significativement plus reproductibles que dans le cas d'utilisation de la méthode 1. Plusieurs sensibilités ont pu être extraites pour certains capteurs, comme une sensibilité de 4,16 pour les capteurs m6hisOBPpig à l'exposition d'IBMP. Une comparaison entre LBP a montré que le m6hisOBPpig et le m6hisMUP20 sont les protéines les plus sensibles au 2,4-DNT.

En travaillant avec les récepteurs olfactifs, nous avons remarqué que leur greffage sur diamant était plus complexe, car plus sensible au pH et au temps de greffage que dans le cas des LBP. Ainsi, nous avons pu observer que 4h d'immobilisation d'OR à pH élevé (pH=10) sur diamant étaient nécessaires pour observer une augmentation significative de la résistance de transfert. Une fois ces conditions d'immobilisation optimales trouvées, la détection de plusieurs composés a été réalisée en fonctionnalisant plusieurs microleviers avec les 3 OR. Tous les résultats de détection, de spécificité, de contrôle positif et négatif envers chaque OR, ont pu être corrélés aux affinités trouvées dans la littérature existante à ce jour. Ces expériences ont permis de montrer pour la première fois que les OR peuvent être greffés sur les transducteurs diamant en restant fonctionnels.

Par ailleurs, sachant que relativement peu de travaux ont été effectués avec les LBP pour la détection chimique en phase gazeuse, ceci a constitué la raison pour laquelle nous nous y sommes intéressés et présentés au chapitre 4.

Nous avons étudié pour cela, sur transducteurs SAW de diamant immobilisé des LPB avec les techniques de greffage décrites précédemment, les propriétés de détection des transducteurs SAW pour chaque LBP immobilisé, en termes de sensibilité et de reproductibilité, et ce, à l'aide d'exposition à différents composés volatils. La cinétique des réponses a également été étudiée, montrant que la plupart des capteurs testés présentaient des temps de réponses à 90% inférieurs à 5 minutes, des constantes de temps aux alentours d'1 minute, et avec une cinétique de réponse quasi-exponentielle. Les capteurs ont été exposés à des vapeurs d'IBMP, de 2,4-DNT et 4-NT dans des conditions contrôlées de laboratoire. Ces capteurs SAW ont pu être testés, également, sur de nombreux composés tels que des drogues provenant de saisie judicaire et des composés explosifs de fabrication artisanale dans des conditions de terrain et semi-réelles. Les capteurs présentent une bonne reproductibilité et une forte répétabilité des mesures. Les campagnes de mesures effectuées ont montré que les capteurs étaient capables de détecter des composés aux pressions de vapeurs saturantes très faibles (tels que le TNT, l'EGDN, etc.). De plus, la cinétique des réponses est plutôt bonne, puisque la majorité des réponses présentait des constantes de temps inférieures ou proches de la minute.

Les réponses des capteurs se sont avérées généralement franches avec un fort rapport signal sur bruit, et réversibles pour la plus part des explosifs testés malgré leur pression de vapeur saturante très faible comme pour le TNT, notamment. Des limites de détection (LOD) élevées ont été trouvées, avec par exemple pour le TNT des valeurs comprises entre 100 ng et 250 ng, ou pour l'héroïne 35 et 55 ng. La fonctionnalisation à base de l'OBP wt6hisOBPpig greffé suivant la méthode 2 via NTA-Ni a montré une très bonne sensibilité à l'ensemble des composés utilisés dans cette étude. Elle semble, tout particulièrement, sensible à l'EGDN avec un déplacement en fréquence d'environ 37 000 Hz ; les autres capteurs ne présentant qu'un déplacement de moins de 10 000 Hz. Elle semble aussi, particulièrement, sensible à la cocaïne par rapport à d'autres fonctionnalisations. De manière plus générale, nous pouvons observer que les niveaux de réponses relatifs entre les différents capteurs sont très différents d'une espèce à l'autre. Cela semble indiquer qu'il est possible d'obtenir pour chaque composé une « empreinte » différente et donc reconnaissable, dans la limite de l'expérimentation. Cela apparait donc très prometteur en termes de sélectivité pour le dispositif Sniffer. Ainsi, en utilisant la reconnaissance d'approche neuronale après apprentissage de plusieurs interférants, le système a également été capable de reconnaitre certains composés explosifs lors d'expérimentation préliminaires sur le terrain. Des travaux sont encore en cours sur ces développements. Les mesures réalisées sur les drogues ont permis de confirmer la difficulté particulière de détecter ces composés du fait de leurs pressions de vapeur saturante extrêmement faibles.

Les résultats des travaux de recherche, objet de cette thèse, ouvrent de nombreuses perspectives pour l'utilisation des transducteurs de type microleviers et SAW en diamant fonctionnalisé pour la détection de composés organiques volatils.

Deux axes de travaux futurs peuvent être envisagés :

- Dans un premier temps, des études plus approfondies sur l'apprentissage et la reconnaissance d'odeurs en présence d'interférents permettront d'améliorer la sélectivité du système envers un certain type de composés.
- Dans un second temps, des mesures de détection en milieu gazeux avec des microleviers fonctionnalisés avec des LBP pourraient être envisagées.

L'équipe d'accueil de la thèse est très fortement impliquée dans le projet FP7 SNIFFER visant le développement d'une cellule de mesure gaz spécifique à base de microleviers en diamant. Les contraintes de temps et de calendrier, durant la préparation de ma thèse, ne m'ont pas permis de pouvoir étudier pleinement ce volet : les premiers prototypes n'ont été disponibles qu'aux derniers mois de mon contrat d'études. Néanmoins, plusieurs mesures de détection en milieu gazeux avec ces microleviers ont pu être réalisées, ce qui a servi, notamment, à valider l'approche avec des fonctionnalisations de types polymères permettant d'observer de forts déplacements de fréquences sur des composés de référence. Il est, donc, permis de penser que le couplage de ces méthodes de transduction avec les méthodes de fonctionnalisations innovantes à base de LBP et développées au cours de cette thèse, permettront une réelle avancée vers ces systèmes biomimétiques de nez électroniques.

Annexes A

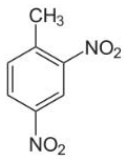
Liste des OBP, MUP, OR utilisés dans cette étude

Nom	Type (mammifère ou insecte)	Mutant (oui / non)	Tag 6his (oui / non)	Lieu de fabrication
wtOBPpig	porc	non	non	Université de Manchester
wt6hisOBP pig	porc	non	oui	GTP
m6hisOBP pig	porc	oui (spécifique au DNT)	oui	GTP
P.domin OBP	guêpe (Polistes dominulus)	non	non	Université de Manchester
6hisOBP-1Pd	guêpe (Polistes dominulus)	non	oui	GTP
Amel OBP14	abeille (Apis Mellifera)	non	non	Université de Manchester
Agam4	moustique (Anopheles gambiae)	non	non	Université de Manchester
Agam47	moustique (Anopheles gambiae)	non	non	Université de Manchester
rMUP	**souris**	non	non	Université de Padova
6his-MUP3		oui	oui	GTP
6his-MUP20		oui	oui	Université de Padova
6his-MUP20-Y103R		oui	oui	Université de Padova
6his-MUP20-Y103D		oui	oui	Université de Padova
6his-MUP20-L88Q		oui	oui	Université de Padova
6his-MUP20-L124V		oui	oui	Université de Padova
cmyc OR1740	**souris**	non	non	INRA (Jouy en Josas)
cmyc OR7D4		non	non	
M71		non	oui	

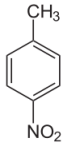
Annexes B

Liste des explosifs et drogues testés dans cette étude

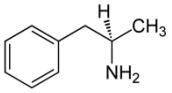
2,4-dinitrotoluène (autres composés : 2,6-DNT, 3,4-DNT)
- $C_7H_6N_2O_4$
- M= 182,13 g.mol^{-1}
- Analogue au TNT, un des produits intermédiaires obtenus lors de la synthèse du TNT



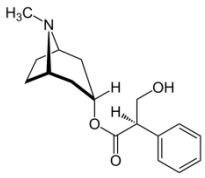
4-nitrotoluène
- $C_7H_7NO_2$
- M= 137,14 g.mol^{-1}



Amphétamine
- $C_9H_{13}N$
- M= 135,20 g.mol^{-1}
- Stupéfiant, connu sous le nom de speed, substance sympathicomimétique aux effets anorexigènes et psychoanaleptiques.

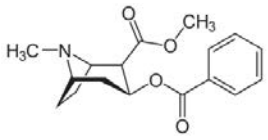


Atropine
- C17H23NO3
- M= 289,36 g.mol^{-1}
- Antidote de certains gaz de combat neurotoxiques



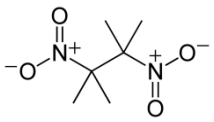
C-4
- 91% de RDX
- 5,3% de plastifiant (adipate)
- 2,1% de liant (polyisobutylène)
- 1,6% d'huile pour moteur
- Nécésité d'un détonateur ou d'un explosif primaire pour détonation

Cocaïne
- $C_{17}H_{21}NO_4$
- M=303.35 g.mol^{-1}
- Stimulant du système nerveux central, extrait de la coca



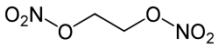
Demex
- Explosif à base de RDX

DMNB (2,3-diméthyl-2,3-dinitrobutane)
- $C_6H_{12}N_2O_4$
- M= 176.17 g.mol^{-1}
- Marqueur du C-4

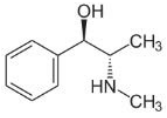


Dynamite
- Explosif fabriqué à base de nitroglycérine

EGDN
- $C_2H_4N_2O_6$
- M= 152,06 g.mol^{-1}
- Appelé également Nitroglycol
- Similaire à la nitroglycérine dans ses propriétés, mais est plus volatil

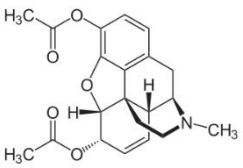


Ephédrine
- $C_{10}H_{15}NO$
- M= 165,23 g.mol^{-1}
- Stimulant améliorant l'efficacité physique ou mentale

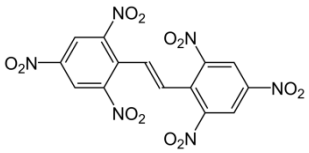


Formex
- Mélange de PETN et de caoutchouc

Héroine
- $C_{21}H_{23}NO_5$
- M= 369,41 g.mol^{-1}
- Obtenu par acétylation de la morphine

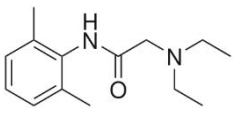


Hexanitrostilbene (HNS)
- C14H6N6O12
- M= 450.23 g.mol^{-1}
- Explosif résistant aux hautes températures

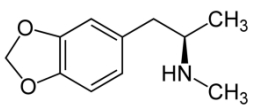


Hexolite-aluminium
- Explosif composé de TNT, RDX,
d'aluminium en poudre et de cire et de chlorure de calcium

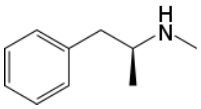
Lidocaine
- $C_{14}H_{22}N_2O$
- M= 234,33 g.mol^{-1}
- Anesthésique local



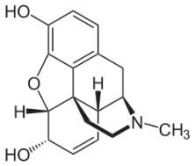
MDMA (Ecstasy)
- $C_{11}H_{15}NO_2$
- M= 193,24 g.mol^{-1}
- Amphétamine (substance sympathomimétique aux effets anorexigène et psychoanaleptique) stimulant du système nerveux central et psychotrope



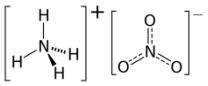
Méthamphétamine
- $C_{10}H_{15}N$
- M= 149,23 g.mol^{-1}
- Drogue de synthèse psycho-stimulante



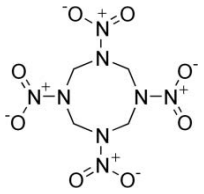
Morphine
- $C_{17}H_{19}NO_3$
- M= 285,33 g.mol^{-1}
- Issu du pavot à opium et utilisé contre la douleur (analgésique)



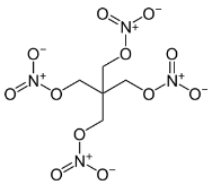
Nitrate d'ammonium
- NH_4NO_3
- M= 80,04 g.mol^{-1}
- Souvent utilisé dans la fabrication de bombes artisanales



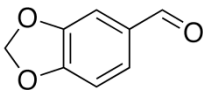
Octogen (HMX)
- $C_4H_8N_8O_8$
- M= 296,15 g.mol^{-1}
- Explosif à point de fusion élevé relativement stable



PETN
- $C_5H_8N_4O_{12}$
- M= 316,13 g.mol^{-1}
- Tétranitrate de pentaérythritol, explosif très puissant

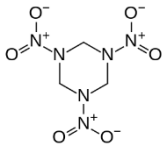


Piperonal (Héliotropine)
- $C_8H_6O_3$
- M= 150,13 g.mol^{-1}
- Précurseur du MDMA, utilize dans les produits de parfumerie



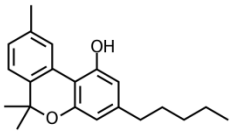
Plastifiant
- Utilisé dans la composition de nombreux explosifs (ex :PETN)
- Rend le plastique souple et flexible

RDX
- $C_3H_6N_6O_6$
- M= 222,12 g.mol^{-1}
- Appelé aussi cyclonite ou hexogène



Semtex
- 49,8% de PETN
- 50,2% de RDX
- Colorant Sudan I
- Antioxydant : N-phényl-2-naphthylamine
- Plastifiant : Phtalate de di-n-octyle
- Liant : styrène-butadiène, caoutchouc
- DMDNB (2,3-dinitro-2,3-dimethylbutane) pour faciliter la détection

THC
- $C_{21}H_{30}O_2$
- M= 314.46 g.mol^{-1}
- Tétrahydrocannabinol, molécule la plus contenue dans le cannabis



Trinitrotoluène
- $C_7H_5N_3O_6$
- M= 227,13 g.mol^{-1}
- Explosif découvert en 1863, préparé par nitration du toluène

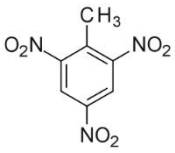


Table des figures

Figure 1.1 - Principe de fonctionnement d'un biocapteur **8**
Figure 1.2 - Structure de la GFP **9**
Figure 1.3 - Représentation schématique du phénomène de résonance de plasmon sous l'effet d'un rayon lumineux incident **9**
Figure 1.4 - Schéma d'un QCM **11**
Figure 1.5 - Principe de fonctionnement d'un transducteur SAW à lignes de retard **13**
Figure 1.6 - Photographie du transducteur MEMS exploité par Zia et al. **19**
Figure 1.7 - Microleviers utilisés dans l'étude de Timurdagan et al. **20**
Figure 1.8 - Microleviers exploités par Huang et al. **20**
Figure 1.9 - Réseau de microleviers utilisé par Zhang et al. (à gauche) et schéma (à droite) **21**
Figure 1.10 - Images MEB de films de diamant polycristallin. **23**
Figure 1.11 - Illustration des différentes stratégies de fonctionnalisation de surfaces en diamant **25**
Figure 1.12 – Molécule d'acide aminocaproïque **27**
Figure 1.13 – Greffage d'acides aminocaproïque sur diamant hydrogéné **27**
Figure 1.14 - Variation de fréquence de résonance de 3 poutres de dimensions identiques au cours de l'étape de fonctionnalisation pour trois concentrations d'acide amino-caproïque différentes (10 µM, 100 µM et 800 µM) **28**
Figure 1.15 - Comparaison du facteur de qualité (Q) entre un microlevier en diamant et en silicium d'épaisseur 4,6 µm **30**
Figure 1.16 - Comparaison de l'évolution de la réponse d'un microlevier à la séquence d'ADN non complémentaire (rouge) et à la séquence d'ADN complémentaire (vert) **31**
Figure 1.17 - Comparaison de la variation relative de fréquence de résonance entre la poutre de mesure avec de l'ADN immobilisée et la poutre de référence nue avant et après dénaturation de brins d'ADN **32**
Figure 1.18 - Réponse en fréquence de résonance en fonction du pH de deux poutres fonctionnalisées par l'immobilisation de l'acide amino-caproïque à 800 µM au cours de deux cycles de pH **32**
Figure 1.19 - Réponses de SAW en diamant, oxydé et hydrogéné à des expositions respectives d'éthanol, NH3, DNT et DMMP. **33**
Figure 1.20 - Réponse de deux capteurs SAW en diamant fonctionnalisés par des terminaisons φ-$(CF_3)_2$-OH à trois expositions successives de 7,4 ppm de DMMP (débit 200 mL/min) **34**
Figure 1.21 - Mécanisme d'action simplifié du système olfactif **36**
Figure 1.22 - Représentations des structures de l'OBP de vache (a), l'OBP de porc contenant un odorant (thymol) à l'intérieur de sa cavité (b) et l'OBP de l'insecte Bombyx mori (c) **37**
Figure 1.23 - Mécanisme d'action simplifié des OBP **38**
Figure 1.24 - Représentation de la structure d'un MUP de souris contenant un odorant (N-phényl-naphthylamine (NPN)) à l'intérieur de sa cavité **40**

Figure 1.25 - Représentation de la structure d'un récepteur olfactif S19 de souris contenant un odorant (heptanol) aux sites de liaison **41**
Figure 1.26 - Représentation de l'acide lipoïque (à gauche) et de l'acide MHDA (à droite) **43**
Figure 1.27 - Schéma explicatif de l'accroche des SAM sur une surface d'or. **44**
Figure 1.28 - Réponse d'un QCM couvert d'OBP de porc à une exposition de 2-isobutyl-3-méthoxypyrazine (350 ppm dans l'air) **47**
Figure 1.29 - Schéma illustrant le couplage biotine/streptavidine sur un transducteur **48**
Figure 1.30 - Immobilisation de nanosomes contenant des membranes d'OR sur une surface en or fonctionnalisés par des couches auto-assemblées: adsorption non spécifique de l'OR (a) et encrage de l'OR via un anticorps biotinylé spécifique (b) **49**
Figure 2.1 - Schéma d'un réacteur de croissance de films de diamant MPCVD **64**
Figure 2.2 -Photographie du réacteur THOR de type AX6050X et de son enceinte. **65**
Figure 2.3 - Photographie du réacteur CLEOPATRA **66**
Figure 2.4 - Illustration du principe de mesure d'épaisseur de films par interférométrie optique : Représentation du parcours de rayons lumineux subissant une succession de réfractions et de réflexions aux interfaces air/diamant et diamant/substrat (à gauche) et Spectre typique de lumière présentant des minima et maxima d'interférences (à droite) **68**
Figure 2.5 - Photo du dispositif de mesure d'épaisseur de films en diamant **68**
Figure 2.6 - Empilement utilisé pour la mesure d'ellipsométrie. **69**
Figure 2.7 - Schéma de la mesure d'épaisseur du diamant du microlevier grâce au profilomètre DEKTAK. **69**
Figure 2.8 - Schéma d'une poutre à géométrie rectangulaire de longueur L, de largeur w et d'épaisseur h. **70**
Figure 2.9 - Cellule piézoélectrique externe (Radiospare) **71**
Figure 2.10 - Schéma de la lecture des jauges piézorésistives **72**
Figure 2.11 - Evolution de la fréquence f_0 en fonction de la longueur L du microlevier en diamant avec une épaisseur fixée à 5 µm (à gauche); Evolution de f_0 et du facteur Q en fonction de l'épaisseur avec L fixée à 200 µm (à droite) **74**
Figure 2.12 - Schéma conceptuel des étapes de fabrication des microleviers en diamant **75**
Figure 2.13 - Schéma de la structure 3D finale (vue de dessus) du microlevier en diamant à l'étape finale de fabrication avec ses jauges permettant la mesure piézorésistive **76**
Figure 2.14 - Photographie d'un substrat de silicium de 4 pouces après libération des poutres en diamant (à gauche), Image MEB d'une poutre en diamant (à droite) **76**
Figure 2.15 - Vue éclatée de la cellule gaz avant assemblage **77**
Figure 2.16 - Schéma de la vue du dessus sur les 8 microleviers dans la cellule **77**
Figure 2.17 - Illustrations de la cellule gaz pouvant accueillir 8 microleviers. **78**
Figure 2.18 - Spectre de la fréquence de résonance d'un microlevier en diamant placé dans la cellule (en haut) ; Variation de la fréquence de résonance et du facteur de qualité Q des microleviers placés sur les 8 positions dans la cellule (la « position 0 » est la position en dehors de la cellule) (en bas) **79**
Figure 2.19 - Photographie de transducteurs SAW **80**
Figure 2.20 - Photographie du moule utilisé pour le dépôt de NDs **81**
Figure 2.21 - Image MEB d'un transducteur SAW avec des couches de NDs **82**
Figure 2.22 - Spectre classique d'un transducteur SAW **83**
Figure 2.23 - Etapes des réactions du couplage EDC/NHS sur une surface d'acide carboxylique. **84**

Figure 2.24 - Résumé des étapes d'une immobilisation d'OBP sur une surface en diamant préalablement hydrogénée greffé en utilisant la méthode 1 ..... **85**
Figure 2.25 - Schéma représentant le principe de chromatographie IMAC avec l'exemple d'une résine NTA-Ni en présence de LBP **86**
Figure 2.26 - Schéma représentant le mécanisme d'accroche des protéines tagguées 6his sur une résine NTA-Ni **87**
Figure 2.27 - Molécule d'imidazole **87**
Figure 2.28 - Résumé des étapes d'une immobilisation d'OBP sur une surface en diamant préalablement hydrogénée greffé en utilisant la méthode 2 ..... **89**
Figure 2.29 - Affinités de différents OBP envers plusieurs composés explosifs **93**
Figure 2.30 - Affinités de différents OBP envers plusieurs drogues **94**
Figure 2.31 - Structure de l'acétophénone ; 2-octanone, androsténone, hélional, vanilline. **98**
Figure 2.32 - Circuit équivalent de Randles (à gauche); Graphique de Nyquist qui décrit l'impédance d'une cellule électrochimique (à droite) **101**
Figure 2.33 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode en diamant dopé au bore fraichement sortie du réacteur (hydrogénée) **103**
Figure 2.34 - Principe de mesure de fréquences de résonance par effet Doppler laser **104**
Figure 2.35 - Photographie de l'équipement de mesure de vibration par effet Doppler laser. **105**
Figure 2.36 - Schéma de la cellule de mesure **106**
Figure 2.37 - Schéma représentant les étapes du protocole d'expérimentation en milieu liquide **107**
Figure 2.38 - Boitier SAGAS fourni par le KIT ; les 8 capteurs SAW intégrés dans le système SAGAS **108**
Figure 2.39 - Principe des étapes 1 et 2 du sampler **110**
Figure 2.40 - Plateforme contenant l'électrode à chauffer (à gauche), Déposition du composé à détecter sur l'électrode (au centre), Schéma du sampler (à droite) **110**
Figure 2.41 - Photographie du sampler (en bas) relié à l'équipement électronique de mesure de détection (en haut) (à gauche); Schéma du système de mesure complet (à droite) .. **111**
Figure 2.42 - Banc de dilution : lignes d'azote (vert), lignes de gaz (bleu), fours (rouge) **112**
Figure 2.43 -Tubes à perméation contenant une solution d'IBMP **112**
Figure 2.44 - Aspiration d'un composé explosif contenu dans un tube fermé par une grille .. **113**
Figure 2.45 - Principe de fonctionnement du PID. **115**
Figure 2.46 - PID PhoCheck 2000+ utilisé lors de l'étude **116**
Figure 2.47 - Concentrations du composé 4-nitrotoluène mesurées par pesée (bleu) et par PID commercial (vert) **116**
Figure 3.1 - Images MEB d'OBP adsorbés sur une surface en diamant **126**
Figure 3.2 - Images MEB d'immobilisation d'OBP sur une surface en diamant fonctionnalisé par la méthode 1 dont le centre a été rayé à l'aide d'une pointe métallique (zoom) 127
Figure 3.3 - Images MEB d'une surface diamant prise après d'immobilisation d'OBP sur une surface hydrogénée et fonctionnalisée par la méthode 1 (à droite) et sur une surface oxydée (à gauche) **127**
Figure 3.5 - a) Structure de la fluoroscéine ; b) Fluoroscéine sous illumination UV **129**

Figure 3.6 - a) Schéma illustrant le substrat en diamant hydrogéné (H) /oxydé (Ox) après photolithographie et oxydation de l'échantillon ; b) Image prise par spectroscopie de fluorescence à λ_{exc}=550 nm et λ_{em}=570 nm du diamant après photolithographie, oxydation, fonctionnalisation par la méthode 2, immobilisation de m6hisOBP pig et immersion dans une solution de fluorescéine ; c) Image du même substrat de la Figure 3.6 ..... **131**
Figure 3.8 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivi d'un greffage du radical de l'acide aminocaproïque (rouge) et suivi du couplage EDC/NHS et de 2h d'immobilisation de wtOBPpig (bleu) **135**
Figure 3.9 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode de diamant oxydé (noir), suivi d'un essai de greffage de l'acide aminocaproïque (rouge) et suivi d'un essai d'immobilisation de wtOBPpig (bleu) **136**
Figure 3.10 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivie d'un greffage du complexe NTA-Ni (rouge) et suivie de 2h d'immobilisation de m6hisOBPpig (bleu) **137**
Figure 3.12 - Evolution de la résistance de transfert des 2 électrodes en diamant hydrogéné, mesurée après chaque étape de greffage de la méthode 1 et 2 suivies d'immobilisation de rMUP et 6hisMUP20 (au même temps de greffage t=2 h) **139**
Figure 3.13 - Spectre d'impédance d'une surface diamant hydrogéné fonctionnalisée par la méthode 2 (NTA-Ni) après immobilisation de m6HisOBPpig pendant 20 min, 40 min et 220 min **139**
Figure 3.14 - Cinétique d'immobilisation du m6hisOBPpig sur diamant hydrogéné fonctionnalisé NTA-Ni (méthode 2) **140**
Figure 3.16 - Spectre d'impédance d'une surface diamant hydrogénée et fonctionnalisée par la méthode 2 (NTA-Ni) après immobilisation de m6HisOBPpig (bleu) et après un traitement de la surface par EDTA (vert) **142**
Figure 3.18 - Spectres d'impédance typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivie d'une adsorption d'OBP (violet) **143**
Figure 3.20 - (a) Spectres d'impédances typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivi d'un greffage de l'acide aminocaproïque (rouge) et suivi du couplage EDC/NHS et d'une immobilisation du récepteur olfactif OR7D4 à pH 7 pendant 1h (bleu), 2h (rose) et 4h (jaune) ; (b) à pH 10 pendant 2h (orange) et 4h (vert) et c) Evolutions de la résistance de transfert mesurée en fonction du pH et du temps d'immobilisation des OR7D4 ..... **146**
Figure 3.21 - (a) Spectres d'impédances typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivi d'un greffage de l'acide aminocaproïque (rouge) et suivi du couplage EDC/NHS et d'une immobilisation du récepteur olfactif OR1740 à pH 10 pendant 4h (bleu) avec l'évolution de Rt; (b) Spectres d'impédances typiques d'une électrode de diamant hydrogéné (noir), suivi d'un greffage du NTA-Ni (orange) suivi d'une immobilisation du récepteur olfactif OR M71 à pH 10 pendant 4h (rose) avec l'évolution de Rt **146**
Figure 3.22 - Evolution de la fréquence de résonance, par rapport à la fréquence de résonance initiale, d'une poutre en diamant à la fin de chaque étape de la procédure de fonctionnalisation : étapes de rinçage B et B' ; étape C de greffage de l'acide aminocaproïque (1 min à 800 µM) et étapes de rinçage D et D' après greffage. **148**
Figure 3.23 - Evolution de la fréquence de résonance de trois microleviers, préalablement fonctionnalisés par l'acide amino caproïque, lors du couplage EDC/NHS **149**

Figure 3.24 - Evolution de la fréquence de résonance de trois microleviers en diamant, préalablement fonctionnalisés par l'acide aminocaproïque suivi du couplage EDC/NHS, lors de l'immobilisation de wtOBPpig **150**
Figure 3.25 - Evolution de la fréquence de résonance de trois microleviers en diamant, préalablement fonctionnalisé par l'acide amino caproïque suivi du couplage EDC/NHS, lors de l'immobilisation de wtOBPpig à une concentration de 1 mg/mL (noir), à une concentration de 0,5 mg/mL (rouge) et à une concentration de 0,1 mg/mL (bleu) **153**
Figure 3.26 - Evolution de la fréquence de résonance de trois microleviers en diamant, préalablement fonctionnalisés par l'acide amino caproïque suivi du couplage EDC/NHS, lors de l'immobilisation de wtOBPpig à une concentration de 0,02 mg/mL **153**
Figure 3.27 - Courbes typiques de détection de l'IBMP à une concentration spécifique de 1,2 mM de deux microleviers de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig **155**
Figure 3.28 - Courbes de calibration de détection pour différentes concentrations d'IBMP pour des microleviers sur lesquels sont immobilisées des OBP de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig **156**
Figure 3.29 - Courbes de calibration de détection pour différentes concentrations du 2,4-DNT pour des microleviers sur lesquels sont immobilisées des OBP de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig **156**
Figure 3.30 - Courbes de calibration de détection pour différentes concentrations du 4-NT pour des microleviers sur lesquels sont immobilisées des OBP de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig **157**
Figure 3.31 - Comparaison de la sensibilité s pour une détection de l'IBMP pour des microleviers avec différents types d'OBP et de MUP **161**
Figure 3.32 - Comparaison de la vitesse de détection grâce à la constante de temps τ pour une détection de l'IBMP pour des microleviers avec différents types d'OBP et de MUP **161**
Figure 3.33 - Comparaison de la sensibilité s pour une détection du 2,4-DNT pour des microleviers avec différents types d'OBP et de MUP **162**
Figure 3.34 - Comparaison de la vitesse de détection grâce à la constante de temps τ pour une détection du 2,4-DNT pour des microleviers avec différents types d'OBP et de MUP **162**
Figure 3.35 - Courbes de détection de l'IBMP à une concentration spécifique de 1,2 mM d'un microlevier de type NTA-Ni-m6hisOBPpig 2 mois après l'immobilisation d'OBP **164**
Figure 3.36 - Comparaison de la variation relative de fréquence de résonance entre la poutre initiale NTA-Ni-6hisMUP20 et cette même poutre lors d'une mesure de détection de l'IBMP à une concentration spécifique de 1,2 mM, 2 mois après l'immobilisation du MUP **164**
Figure 3.37 - Courbes de dissocation de l'IBMP en utilisant 2 conditions de dilution différentes pour un capteur m6hisOBPpig **165**
Figure 3.38 - Courbes typiques de détection de l'acétophénone et du 2-octanone à une concentration spécifique de 10 µM de deux microleviers de type NTA-Ni-ORM71 ..... **167**
Figure 3.39 - Déplacement en fréquence d'un capteur NTA-Ni-ORM71 lors d'une l'exposition d'acétophénone et de 2-octanone à 10 µM et à 1 µM... **167**Erreur ! Signet non défini.
Figure 3.40 - Comparaison des déplacements en fréquence d'un capteur NTA-Ni-ORM71 et d'un capteur NTA-Ni (sans ORM71) lors d'une l'exposition d'acétophénone et de 2-octanone à 1 µM **168**

Figure 3.41 - Déplacement en fréquence d'un capteur aca-OR7D4 lors d'une l'exposition d'androsténone et d'hélional à 10 et 1 µM **169**
Figure 4.1 - Suivi de l'évolution de la fréquence de résonance d'un transducteur SAW après chaque étape de fonctionnalisation : après greffage du NTA (orange), du Ni (rouge) et après immobilisation du m6hisOBPpig (bleu) **182**
Figure 4.2 - Réponses à 3 expositions successives de 2,5 ppm d'IBMP sur 3 différents capteurs : NTA-Ni-m6hisOBPpig fonctionnalisés par la méthode 2 (orange), H-diamant + m6hisOBPpig (noir) et Ox-diamant-m6hisOBPpig (bleu) **187**
Figure 4.3 - Réponse à 5 expositions successives de 8 ppm d'IBMP sur 3 capteurs aca-rMUP fonctionnalisés par la méthode 1 (gris clair) et 3 capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q fonctionnalisés par la méthode 2 (noir) **188**
Figure 4.4 - Moyenne de 5 expositions successives de 8 ppm d'IBMP sur 3 capteurs aca-rMUP fonctionnalisés par la méthode 1 (gris clair) et 3 capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q fonctionnalisés par la méthode 2 (noir) **189**
Figure 4.5 - Moyenne des inverses des constantes de temps de réponses pour des concentrations d'IBMP de 10 ppb à 1,8 ppm dans le cas de capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q **197**
Figure 4.6 - Moyenne des inverses des constantes de temps de réponses pour des concentrations de 2,4-DNT de 200 ppb à 240 ppb dans le cas de capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q **198**
Figure 4.7 - Moyenne des inverses des constantes de temps de réponses pour des concentrations de 4-NT de 12 ppb à 1,49 ppm dans le cas de capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q **198**
Figure 4.8 - Méthode de calcul du temps de réponse à 90% sur la réponse d'un capteur NTA-Ni-m6hisOBPpig à une concentration 1 ppm d'IBMP **199**
Figure 4.9 - Réponses des capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig à une concentration de 10 ppm d'IBMP à t_0 (orange) et à t_{1mois} (bleu) et à t_{3mois} (vert) **201**
Figure 4.10 - Comparaison de la variation relative des réponses du capteur NTA-Ni-6hisOBPpig à une exposition d'IBMP à une concentration spécifique de 10 ppm, à t= 1, 3, 6, 9 et 12 mois **202**
Figure 4.11 - Réponses de différents capteurs à des expositions d'IBMP à différentes concentrations **203**
Figure 4.12 - Réponses de différents capteurs à des expositions de 2,4-DNT à différentes concentrations **203**
Figure 4.13 - Réponses de différents capteurs à des expositions de 4-NT à différentes concentrations **204**
Figure 4.14 - Réponse moyenne à 5 expositions d'IBMP à différentes concentrations pour des capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q **205**
Figure 4.15 - (a) Réponse moyenne à 5 expositions d'IBMP pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des OBP ; (b) Réponse moyenne à 5 expositions d'IBMP pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des MUP **206**

Figure 4.16 - (a) Réponse moyenne à 5 expositions de 2,4-DNT pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des OBP ; (b) Réponse moyenne à 5 expositions de 2,4-DNT pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des MUP **207**
Figure 4.17 - (a) Réponse moyenne à 5 expositions de 4-NT pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des OBP ; (b) Réponse moyenne à 5 expositions de 4-NT pour différentes concentrations pour des capteurs fonctionnalisés par des MUP **208**
Figure 4.18 - Comparaison des sensibilités obtenues avec les capteurs SAW fonctionnalisés de LBP et les constantes d'affinités des différents LBP calculées en milieu liquide pour le composé 2,4-DNT **211**
Figure 4.19 - Comparaison des sensibilités obtenues avec les capteurs SAW fonctionnalisés de LBP et les constantes d'affinités des différents LBP calculées en milieu liquide pour le composé 4-NT **212**
Figure 4.20 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à une exposition de cannabinol chauffé à 35°C **214**
Figure 4.21 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à trois expositions de dynamite **214**
Figure 4.22 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à trois expositions de plastifiant **215**
Figure 4.23 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à trois expositions de TNT (pur, ne provenant pas de saisie) **215**
Figure 4.24 - Réponse des capteurs fonctionnalisés par des LBP à trois expositions de TNT de saisie **215**
Figure 4.25 - Capture d'écran du logiciel d'acquisition : (en haut) Réponses de 5 capteurs au TNT ; (en bas) Résultat d'algorithme qui reconnait la signature du composé à partir des réponse des capteurs. Le TNT ici a été reconnu avec une fiabilité de 98%. **218**
Figure 4.26 - Niveau de réponse du capteur SAW NTA-NI-m6hisOBPpig après 20 secondes d'exposition aux vapeurs issues des quantités solides déposés sur la plaque chauffante représentées par l'axe des x. **219**
Figure 4.27 - (a) Réponses moyennées de 3 capteurs fonctionnalisés par différents OBP et MUP pour 3 expositions de TNT à une concentration de 1 µg, (b) pour 3 expositions à des vapeurs d'EGDN (c) pour 3 expositions de PETN à une concentration de 1 µg (d) pour 3 expositions de cannabinol à une concentration de 1 µg (e) pour 3 expositions de cocaïne à une concentration de 1 µg, et (f) pour 3 expositions d'héroïne à une concentration de 1,75 µg **222**

Liste des tableaux

Tableau 1.1 - Comparaison de propriétés mécaniques du diamant avec celles du silicium.....**24**
Tableau 2.1 - Conditions de synthèse typiques d'un film de diamant polycristallin par procédé MPCVD avec le réacteur THOR Erreur ! Signet non défini.
Tableau 2.2 - Conditions de synthèse typiques d'un film de diamant dopé au bore avec le réacteur SEKI **66**
Tableau 2.3 - Conditions de synthèse typiques d'un film de diamant polycristallin sur transducteur SAW par procédé MPCVD avec le réacteur CLEOPATRA **67**
Tableau 2.4 - Valeurs du S/N en faisant varier les jauges d'impédance R et les facteurs de jauge G avec une force F de 1nN appliquée sur un microlevier en diamant (épaisseur de 3 µm). Les valeurs surlignées en vert sont considérées comme acceptables étant donné un S/N ≥10)..... **73**
Tableau 2.5 - Dimensions des microleviers **74**
Tableau 2.6 - Liste des OBP utilisés dans cette étude **90**
Tableau 2.7 - Valeurs des K_D et IC_{50} de différents explosifs pour l'OBP mutant de porc **91**
Tableau 2.8 - Constantes de dissociations de quelques composés envers l'OBP P.domin..... **92**
Tableau 2.9 - Résumé des sélectivités des OBP envers certains composés (explosifs et drogues). Les meilleures affinités envers un composé en particulier sont en vert (gras italiques). **94**
Tableau 2.10 - Liste des MUP utilisés dans cette étude **95**
Tableau 2.11 - Différences des séquences aminés impliquées dans le processus de liaison de MUP3 et MUP20 par rapport à celles de rMUP (en rouge). Les différences sont notées de couleur bleue..... **96**
Tableau 2.12 - Autres différences de séquences aminées (situés en bout de chaine) de MUP3 et MUP20 par rapport à celles de rMUP (en rouge gras italiques). Les différences sont notées de couleur bleue et en gras. **96**
Tableau 2.13 - Constantes de dissociation K_D de rMUP envers plusieurs ligands **97**
Tableau 2.14 - Constantes de dissociation K_D des quatre mutants MUP20 envers plusieurs ligands..... **97**
Tableau 2.15 - Liste des OR utilisés dans cette étude **98**
Tableau 2.16 - Concentrations mesurées par pesée du composé IBMP..... **114**
Tableau 3.1 - Résumé des variations de fréquence de résonance mesurées au cours de la méthode de greffage 1 (les moyennes sont établies à partir des valeurs mesurées sur 5 poutres)..... **152**
Tableau 3.2 - Comparaison de la sensibilité s et de la constante de temps τ pour des détections de l'IBMP et du 2,4-DNT pour des microleviers de type aca-m6hisOBPpig et NTA-Ni-m6hisOBPpig **157**
Tableau 4.1 - Moyennes des déplacements en fréquence après chaque immobilisation **179**

Tableau 4.2 - Exemples de densité de surface de différents OBP et MUP immobilisés sur SAW en diamant préalablement fonctionnalisé par la méthode 1 ou 2. ..... **180**
Tableau 4.3 - Résumé des principales propriétés des composés IBMP, 2,4-DNT et 4-NT **181**
Tableau 4.4 - Constantes de temps en secondes des réponses à des expositions de vapeurs d'IBMP à une concentration comprise entre 10 ppb et 12 ppm pour les capteurs NTA-Ni-6hisMUP20L88Q et aca-rMUP..... **188**
Tableau 4.5 - Constantes de temps en secondes des réponses à des expositions de vapeurs de 2,4-DNT à une concentration comprise entre 12 ppb et 240 ppb pour le capteur NTA-Ni-6hisMUP20L88Q **189**
Tableau 4.6 - Constantes de temps en secondes des réponses à des expositions de vapeurs de 4-NT à une concentration comprise entre 200 ppb et 1,49 ppm pour le capteur NTA-Ni-6hisMUP20L88Q..... **189**
Tableau 4.7 - Constantes de temps en secondes des réponses à des expositions de vapeurs d'IBMP et de 2,4-DNT à des concentrations de 240 ppb pour différents capteurs..... **190**
Tableau 4.8 - Temps de réponse à 90% moyennés sur 5 réponses de 5 capteurs NTA-Ni-m6hisOBPpig distincts, mesurés après 800s d'exposition à des concentrations de 240 ppb d'IBMP, 2,4-DNT et 4-NT pour l'exposition et le retour à la ligne de base. **195**
Tableau 4.9 - Temps de réponse à 90% pour différents capteurs après 800s d'une exposition à une concentration de 240 ppb d'IBMP. **195**
Tableau 4.10 - Mesure de LOD pour chaque composé de l'étude **215**

Table des équations

Équation 1.1 13
Équation 1.2 13
Équation 1.3 13
Équation 1.4 14
Équation 1.5 15
Équation 1.6 15
Équation 1.7 16
Équation 1.8 16
Équation 1.9 16
Équation 1.10 16
Équation 1.11 17
Équation 1.11 17
Équation 1.12 17
Équation 1.13 17
Équation 1.14 43
Équation 1.15 46
Equation 2.1 102
Equation 2.2 108
Equation 2.3 114
Equation 4.1 184
Equation 4.2 185
Equation 4.3 185
Equation 4.4 185
Equation 4.5 185
Equation 4.6 185
Equation 4.7 185
Equation 4.8 185
Equation 4.9 185
Equation 4.10 185
Equation 4.11 186
Equation 4.12 186
Equation 4.13 186
Equation 4.14 187
Equation 4.15 187
Equation 4.16 187

Communications personnelles

Publications et brevets

Publications

- **Manai, R.**, Scorsone, E., Rousseau, L., Ghassemi, F., Possas Abreu, M., Lissorgues, G., Tremillon, N., Ginisty H., Arnault, J-C., Tuccori, E., Bernabei, M., Cali, K., Persaud, K.C., Bergonzo P. "Grafting odorant binding proteins on diamond bio-MEMS", Biosensors and Bioelectronics, 60, 311–317, 2014.
- **Manai, R.,** Scorsone, E., Rousseau, L., Ghassemi, F., Possas Abreu, M., Lissorgues, G., Tremillon, N., Ginisty H., Mucignat, C., Redaelli, M., Bergonzo P. "Explosive detection via major urinary proteins (MUP) on diamond surface acoustic wave biosensor" *(en soumission)*

Article de vulgarisation scientifique

- **Manai, R**. "Un nouvel outil pour détecter explosifs et drogues dures", Le Huffington Post, Têtes chercheuses, 2014.

Brevet

- **N°1453019** déposé le 4 avril 2014 "Dispositif de detection et/ou dosage d'au moins un compose chimique et enceinte destine à former un tel dispositif"

Communications orales internationales

- "Odorant binding protein modified diamond MEMS for chemical trace detection", European Materials Research Society (spring meeting), Mai 2014, Lille, France.
- "OBPs grafted diamond MEMS as olfactory sensors for trace level detection of explosives", International Symposium on Olfaction and Electronic Nose, Juillet 2013, Daegu, Corée du Sud.
- "Resonant diamond bio-MEMS for chemical trace detection", International Conference on Diamond and Carbon Materials, Septembre 2012, Grenade, Espagne.
- SNIFFER public workshop, Avril 2014, Noisy-le-Grand, France.

Posters

- "Diamond MEMS as new promising biochemical transducers", International Materials Research Congress, Août 2014, Cancun, Mexique.
- "Un nez électronique en diamant pour la détection d'explosifs et de drogues", Réseau Biotechno, Juin 2014, Paris, France.
- SNIFFER public workshop, Avril 2014, Noisy-le-Grand, France.

Réseaux de biocapteurs de type MEMS en diamant pour la reconnaissance d'odeurs

Résumé

La lutte contre le terrorisme et le trafic de narcotiques sont devenus des enjeux sociétaux majeurs. Par exemple, l'identification rapide des colis piégés est aujourd'hui indispensable dans les lieux publics, motivant le développement de systèmes de détection de types nez électroniques. Ce travail de recherche, porte sur l'étude des transducteurs MEMS de type microleviers et SAW (surface acoustic wave), choisis parmi les différentes familles de biocapteurs existants pour leurs nombreux avantages tels que leur grande sensibilité à détecter tous types de molécules. Cette thèse est axée sur l'étude de ces deux types de MEMS en diamant combinés à des biorécepteurs olfactifs spécifiquement impliqués dans la perception et la reconnaissance des odeurs. Les propriétés physiques et chimiques exceptionnelles du diamant déposé sur leur surface ont permis le développement de détecteurs à la fois miniaturisés, robustes et sensibles. La chimie unique du diamant a permis en particulier d'immobiliser sur la surface de ces transducteurs différents types de biorécepteurs de type OBP (Odorant Binding Protein), MUP (Major Urinary Protein) et OR (récepteurs olfactifs) comme couche sensible. L'immobilisation de ces LBP sur les MEMS en diamant a été caractérisée par diverses techniques telles que la spectroscopie électrochimique d'impédance (EIS), la spectroscopie de fluorescence ou encore la spectroscopie XPS. Les performances des capteurs ont été suivies par vibrométrie laser dans le cas des microleviers et à l'aide d'un système d'acquisition commercial dans le cas des SAW, en mesurant les déplacements de fréquence de résonnance lors d'exposition aux composés cibles. Une comparaison entre les différents types de LBP provenant de différentes espèces (mammifères, insectes) a été effectuée en termes de sensibilité lors d'exposition à des drogues et des composés explosifs. Les limites de détections (LOD) obtenues dans nos conditions de mesures se situent dans la gamme d'1µg jusqu'à 35 ng par exemple pour l'héroïne, en fonction des espèces cibles testées. La LOD du TNT est d'environ 100 ng.

Mots clés : Diamant, MEMS, Microlevier, SAW, Ligand Binding Protein, Nez électronique

Diamond bio-MEMS for odor detection

Abstract

Over the last decade, the need for resources devoted to counter terrorism as well as narcotic trafficking has grown. Thus the effective fight against those scourges requires the development of advanced physical and chemical detection systems and sensor systems such as electronic noses able to detect drugs and explosives compounds. In this context, ligand binding proteins (LBP) combined to diamond MEMS such as resonant microcantilevers and surface acoustic wave (SAW) sensors are foreseen as highly promising transducers for the design of label free biosensors in particular for the detection of small organic molecules. LBP are small proteins involved in the perception and recognition of odorant molecules. In this study, OBP (Odorant Binding Protein), MUP (Major Urinary Protein) and OR (olfactory receptor) were used to bind selected analytes. The carbon nature of diamond offers wide opportunities for stable grafting of such bioreceptors. The performances of these transducers present a real improvement in terms of speed, miniaturization and sensitivity. Immobilization of LBP on diamond transducers was investigated using fluorescence methods, electrical impedance spectroscopy (EIS) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The sensing performances of the resulting biosensors were assessed by monitoring the frequency shift in real time upon exposure to the target molecules. We compared different kind of LBP, coming from vertebrates, insects, mutant or wild type in terms of sensitivity, selectivity and for their capability to bind odors, explosive and drug compounds. Within our experimental conditions, the detection of a wide variety of drugs and explosives was possible in the concentration range typically from 1 µg to e.g. 35 ng in the case of heroin, depending on the test substances. The limit of detection of TNT compound is about 100 ng.

Keywords: Diamond, MEMS, Microcantilever, SAW, Ligand Binding Protein, Electronic nose