



HAL
open science

Conception d'un système d'analyse multi-capteur ISFET pour la surveillance in-situ de l'azote minéral. Application à la culture du blé dur

Matthieu Joly

► To cite this version:

Matthieu Joly. Conception d'un système d'analyse multi-capteur ISFET pour la surveillance in-situ de l'azote minéral. Application à la culture du blé dur. Electronique. INSA de Toulouse, 2018. Français. NNT : 2018ISAT0043 . tel-02918087v1

HAL Id: tel-02918087

<https://theses.hal.science/tel-02918087v1>

Submitted on 20 Aug 2020 (v1), last revised 23 May 2019 (v2)

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

Présentée et soutenue par :

Matthieu Joly

le lundi 19 mars 2018

Titre :

Conception d'un système d'analyse multi-capteur ISFET pour la surveillance in situ de l'azote minéral. Application à la culture du blé dur

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED GEET : Micro et Nanosystèmes

Unité de recherche :

Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Directeur/trice(s) de Thèse :

Jérôme Launay et Pierre Temple-Boyer

Jury :

Céline DURIEU, Directrice R&D - Société Agronutrition, Carbone
Jean-Yves FOURNIOLS, Professeur des Universités - LAAS-CNRS Toulouse
Sabine HOUOT, Directrice de Recherche - INRA UMR ECOSYS Grignon
Jérôme LAUNAY, Maître de Conférences - LAAS-CNRS Toulouse
France LE BIHAN, Professeur des Universités - IETR Rennes
Tiphaine TALLEC, Physicien CNAP - CESBIO Toulouse
Pierre TEMPLE-BOYER, Directeur de Recherche - LAAS-CNRS Toulouse
Wojciech WROBLEWSKI, Professeur des Universités - WUT Varsovie (Pologne)

Remerciements

Je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la mise en place et la réalisation de ces travaux de thèse ainsi qu'à mon épanouissement au sein du LAAS-CNRS.

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres du jury, Jean-Yves Fourniols pour avoir accepté de présider mon jury, France Le Bihan et Wojciech Wróblewski pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit ainsi que Sabine Houot et Tiphaine Tallec d'avoir accepté d'examiner mes travaux.

Cette belle aventure est née de la rencontre entre la société Agronutrition et l'équipe MICA du LAAS-CNRS. J'exprime donc mes remerciements à Cédric Cabanne, président d'Agronutrition, ainsi que Faouzi Attia et Céline Durieu, principaux porteurs du projet chez Agronutrition. Ils m'ont offert l'opportunité de prendre part à ce projet et m'ont accordé leur confiance tout au long de sa réalisation. Je souhaiterais également dire merci à l'ensemble du personnel d'Agronutrition, en particulier aux doctorants ainsi qu'aux employés de la plateforme d'expérimentation. Leur aide m'a été précieuse pour appréhender l'agronomie et tenter de la relier au monde de la microélectronique.

La réussite d'une thèse dépend fortement de son encadrement. A ce titre, je remercie chaleureusement mes directeurs Pierre Temple-Boyer et Jérôme Launay pour leur accueil au sein de l'équipe MICA et toute l'aide qu'ils m'ont apportée. Ils se sont toujours montrés disponibles lorsque j'en avais besoin et m'ont témoigné leur soutien sans faille à de multiples reprises, tout en maintenant un climat de confiance et de bonne humeur.

J'exprime également ma reconnaissance aux services TEAM et I2C ainsi qu'aux stagiaires qui m'ont assisté dans la réalisation technique de mes travaux, et plus précisément : Sandrine Souleille, Charline Blatché, Laurent Mazenq, David Colin, Xavier, Camille, Éric et Iman.

La bonne humeur et le bien-être au travail sont des caractéristiques marquantes du LAAS-CNRS. Je souhaiterais à présent dire merci à toutes les personnes qui contribuent à cette ambiance de travail hors norme. Merci à Richard de m'avoir intégré dès mon arrivée dans notre petit « convoi » du midi. La troupe se composait initialement d'Adrian, pilier du groupe à l'humour particulier, Aliko, Aude et Hélène, puis s'est agrandie au fil des mois avec l'arrivée de nouvelles têtes au laboratoire : Lucie, Kayum, Lin, Maxime, Gabriel, Douglas, Elise, Aurore, Emma, Lucien, Dolores, et tous les autres. Mes remerciements vont également à ceux qui ont partagé mes pauses-café. Ces dernières furent marquées par les débats philosophiques avec Quentin, les discussions comiques avec Benjamin et Ahmet, ou encore les tours de pâté de maison avec Cécile. Je n'oublie pas mes amis de Tarzan et ses Fabuleux Sandwichs, groupe de musique avec lequel je clôturais mes semaines en beauté lors d'interminables répétitions le vendredi soir. Ce n'est pas sans une certaine satisfaction que je vois apparaître ce nom sur un document académique. Tous ces moments ont été essentiels pour garder motivation et optimisme dans les inévitables instants de doute du doctorat.

Je remercie profondément toute ma famille, mes parents, grands-parents, mes frères et Juliette pour leur soutien, leurs encouragements, et leur amour durant ces années de thèse.

Enfin, merci aux ISFET pour leur charmante compagnie. Même s'ils sont parfois peu loquaces, ils se rattrapent grâce à leur incomparable sens de l'humour flegmatique.

Table des matières

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Positionnement du projet INNOPERF-Blé et état de l'art des méthodologies d'analyse ionique du sol.....	5
Introduction : le blé, céréale essentielle à la nutrition de l'homme	7
1. L'azote au sein du système Sol-Plante	8
a. Métabolisme azoté de la plante : rôle et devenir de l'azote	8
b. Cycle de l'azote dans les sols cultivés.....	10
i. Gain en azote minéral au sein du système Sol-Plante	11
ii. Pertes d'azote vers l'extérieur du système Sol-Plante	13
2. Fertilisation azotée dans l'Agriculture moderne.....	14
a. Chiffres et pratiques communes.....	14
b. Efficacité de la fertilisation azotée.....	16
c. Conséquences environnementales et sur la santé de la fertilisation	17
d. Réglementation de la fertilisation azotée.....	18
3. Méthodologies d'analyse pour le suivi du cycle de l'azote au sein du système Sol-Plante	19
a. Méthodes conventionnelles en laboratoire	19
i. L'échantillonnage du sol	19
ii. Extraction de l'azote minéral.....	20
iii. Dosage de l'azote minéral par les techniques analytiques conventionnelles.....	21
iv. Avantages/inconvénients de l'échantillonnage du sol.....	25
b. Méthodologie d'analyse sur site : agriculture de précision, vers une agriculture raisonnée ?	25
i. Définition et objectifs de l'agriculture de précision	25
ii. Techniques d'analyse sur site du statut azoté de la plante	27
iii. Techniques d'analyse sur site de l'azote du sol.....	32
c. Systèmes de détection des nutriments du sol sur site basés sur des capteurs électrochimiques à membrane ionosensible	34
d. Approches d'intégration système et positionnement du projet	39
Bibliographie.....	43
Chapitre 2 : Théorie des capteurs électrochimiques potentiométriques	51
1. Modèles théoriques de la réponse d'une membrane ionosensible.....	53
2. Modes de transduction Ion-Electron.....	57

a.	L'Ion-Selective Electrode (ISE) conventionnelle	57
b.	L'ISE à contact solide.....	60
i.	Utilisation d'un polymère conducteur comme contact solide.....	63
ii.	Augmentation de la capacité de double couche	64
c.	Ion Sensitive Field Effect Transistor (ISFET).....	65
3.	Propriétés de détection.....	69
a.	Sensibilité et limite de détection (LOD)	69
b.	Sélectivité.....	70
i.	Fixed Interference Method (FIM)	71
ii.	Separate Solution Method (SSM)	72
iii.	Separate Solution Method (SSM) II	72
4.	Les constituants d'une membrane polymérique ionosensible.....	73
a.	Matrice et plastifiants	73
b.	Ionophore	76
i.	Ionophores de l'ion ammonium NH_4^+	77
ii.	Ionophores de l'ion nitrate NO_3^-	78
c.	Additifs ioniques	82
	Conclusion.....	83
	Bibliographie.....	85
	Chapitre 3 : Fabrication et caractérisation <i>in vitro</i> des microcapteurs électrochimiques	91

1.	Fabrication des capteurs potentiométriques pour le projet INNOPERF-Blé.....	93
a.	Présentation des dispositifs développés.....	93
i.	Puce multi-capteur en technologie silicium	93
ii.	Electrode planaire miniature.....	95
b.	Principales étapes du procédé de micro-fabrication du dispositif multi-capteur en salle-blanche	96
c.	Assemblage du système multi-capteur.....	98
d.	Procédé d'intégration des couches ionosensibles en fluoropolysiloxane (FPSX)	99
2.	Caractérisations <i>in vitro</i> des MOSFET et pH-ISFET.....	102
a.	Caractérisations électriques	102
i.	Introduction et présentation des méthodes de caractérisation électrique	102
ii.	Résultats.....	103
b.	Propriétés de détection des pH-ISFET à grille alumine et nitrure de silicium en phase liquide	105
i.	Sensibilité au pH.....	105

ii.	Sélectivité des pH-ISFET aux ions alcalins	106
iii.	Durée de vie des pH-ISFET en phase liquide.....	107
3.	Développement et caractérisation <i>in vitro</i> des pNH ₄ -ISFET et pNO ₃ -ISFET.....	108
a.	Définition des besoins de détection.....	108
b.	Développement et caractérisation <i>in vitro</i> des pNH ₄ -ISFET.....	110
i.	Formulation et protocole de préparation des membranes ionosensibles.....	110
ii.	Evaluation <i>in vitro</i> des propriétés de détection.....	111
c.	Développement et caractérisation <i>in vitro</i> des pNO ₃ -ISFET	114
i.	Formulation des membranes ionosensibles.....	114
ii.	Evaluation <i>in vitro</i> des propriétés de détection.....	114
4.	Développement et intégration d'une électrode de référence miniature « tout solide »	119
a.	Introduction.....	119
b.	Fabrication de l'électrode Pt/Ag/AgCl/PDMS-KCl	121
i.	Dépôt du film d'argent sur l'électrode de platine.....	121
ii.	Formation d'une couche de chlorure d'argent en surface du film d'argent	123
iii.	Dépôt d'une membrane polymérique dopée en KCl	124
c.	Caractérisations <i>in vitro</i> des électrodes de référence miniatures.....	125
	Conclusion.....	127
	Bibliographie.....	129
	Chapitre 4 : Application à l'analyse du sol.....	133
	Introduction	135
1.	Détermination du pH du sol par les pH-ISFET en conditions <i>in situ</i>	135
a.	Influence de l'humidité et la texture du sol sur la réponse du pH-ISFET.....	135
b.	Détermination du pH de sols argilo-limoneux en fonction de l'humidité du sol	138
c.	Remarques sur les mesures dans les suspensions et extraits de sol	139
d.	Etude de la durée de vie dans le sol des pH-ISFET	141
2.	Evaluation de la réponse des pNO ₃ -ISFET et pNH ₄ -ISFET en conditions <i>in situ</i>	143
a.	Analyse <i>in situ</i> du sol par les pNH ₄ -ISFET	143
b.	Analyse <i>in situ</i> du sol par les pNO ₃ -ISFET	145
c.	Durée de vie dans le sol des ISFET fonctionnalisés.....	146
3.	Intégration de la technologie ISFET dans un système d'analyse multi-capteur autonome et communicant pour la suivi du cycle de l'azote dans le cadre de la culture du blé dur	150
a.	Présentation du système d'analyse.....	150
b.	Choix et étude d'une électrode de référence pour le système d'analyse.....	152
i.	Introduction	152

ii. Caractérisation de l'électrode de référence WE200.....	153
c. Protocole de mise en place du système sur la parcelle.....	154
4. Caractérisation du système d'analyse multi-capteur	156
a. Présentation du banc d'essai	156
b. Première caractérisation du système d'analyse sur le banc d'essai.....	157
Conclusion.....	162
Bibliographie.....	165
Conclusion générale	167
Bibliographie.....	171
Annexes.....	173
Résumé	175
Summary.....	176

Introduction générale

L'agriculture est au cœur d'un des principaux défis du XXIème siècle : nourrir de plus en plus d'êtres humains en réduisant les impacts sur l'environnement et le climat. La fertilisation azotée des cultures céréalières joue un rôle majeur dans cette problématique. Une carence en azote est néfaste au rendement des cultures et à la qualité du grain. A l'inverse, un excès d'azote augmente fortement les risques de pollution des nappes phréatiques et de l'atmosphère par le lessivage des ions nitrates et les émissions d'oxydes d'azote.

L'analyse de la teneur en azote du sol peut faciliter la mise en place de pratiques de fertilisation qui tiennent davantage compte des variations temporelles et locales du sol et des plantes. Cependant, les méthodes conventionnelles d'analyse sont chronophages car elles reposent sur le prélèvement d'échantillons sur la parcelle qui sont ensuite envoyés à des laboratoires spécialisés. Le coût et les délais de traitement des échantillons par ces laboratoires ne permettent pas de mener une surveillance continue et dans l'espace. L'agriculture de précision est une approche en plein essor qui vise à corriger ce problème en s'appuyant sur des technologies de mesure et de géolocalisation sur site en temps-réel. Dans le domaine de la fertilisation azotée, ces analyses reposent principalement sur une évaluation indirecte de la teneur en azote contenu dans la plante et non pas directement dans le sol. Elles sont le plus souvent effectuées via des capteurs optiques embarqués sur des véhicules au sol ou par télédétection (drones, avions, satellites). Cette approche ne répond pas tout à fait à la problématique puisque les réserves en azote du sol demeurent inconnues. Ces réserves, en particulier celles des ions nitrates, sont pourtant responsables des problèmes environnementaux évoqués précédemment.

Le consortium INNOPERF-Blé a ainsi été constitué dans le but de travailler à l'amélioration de l'efficacité de l'utilisation de l'azote du blé dur. Il se compose de partenaires académiques (LAAS-CNRS, UMR AGIR, CESBIO et IPBS) et industriels (Agronutrition, Sirea et Agri-Intranet) travaillant dans le cadre d'un projet soutenu par le Fonds Unique Interministériel (FUI) de soutien aux projets de recherche et développement collaboratifs des pôles de compétitivité.

Deux principaux axes de travail sont empruntés dans le projet INNOPERF-Blé. Le premier axe vise l'étude de produits biostimulants sur l'efficacité de l'azote du blé dur en fonction du stade d'application et des conditions hydriques du sol. En particulier, les effets du biostimulant sur l'absorption de l'azote minéral par les racines, le devenir de l'azote absorbé au sein de la plante ainsi que sur le remplissage du grain sont examinés.

Le deuxième axe de travail a pour objectif d'améliorer la mobilisation par la plante de l'azote déjà présent dans le sol grâce à une surveillance continue effectuée par un système d'analyse multi-capteurs *in situ*, autonome et communicant. Les travaux de cette thèse CIFRE effectués en partenariat avec le LAAS-CNRS et la société Agronutrition s'inscrivent dans le cadre de ce deuxième axe du projet INNOPERF-Blé. Ils portent sur le développement et l'intégration dans un système, développé avec la société Sirea, de capteurs chargés d'évaluer le pH ainsi que les concentrations en ions ammonium NH_4^+ et nitrates NO_3^- du sol, les deux formes d'azote assimilables par les plantes. Cette approche constitue donc une rupture par rapport aux systèmes commercialisés actuels. *In fine*, les données renvoyées par ces capteurs seront traitées

et exploitées par un outil d'aide à la décision (OAD) conçu par la société Agri-Intranet dans le but d'aider les agriculteurs à pratiquer une fertilisation optimale pour leur culture et l'environnement.

Les capteurs que nous proposons de développer pour équiper le système final sont des transistors à effet de champ sensibles aux ions (ISFET). Ce sont des microcapteurs électrochimiques de type potentiométrique, réalisés en technologie silicium et apparus dans les années 1970 suite aux travaux de P. Bergveld. L'équipe Microsystèmes d'Analyse (MICA) du LAAS-CNRS a acquis depuis les années 2000 une expertise dans la fabrication et la caractérisation des ISFET ainsi que dans l'étude de leurs applications aux domaines du biomédical et/ou de l'environnement. Les microcapteurs ISFET présentent de nombreux avantages qui découlent de leur fabrication selon les technologies de la microélectronique : intégration, fabrication en masse, faible coût, bonne résistance mécanique... Leurs petites dimensions et leurs faibles besoins de maintenance les rendent particulièrement adaptés à une intégration dans un système dédié à la mesure sur site à plus ou moins long terme. Les puces générique ISFET obtenues à la fin du procédé de microfabrication en salle blanche sont sensibles au pH. Ces pH-ISFET peuvent « facilement » être fonctionnalisés en vue de la détection d'autres espèces ioniques grâce à l'intégration de couches polymériques chimiquement sensibles. Ainsi, une partie des travaux à mener au cours de cette thèse concerne le développement et l'étude de membranes ionosensibles pour la détection des ions nitrates et ammonium.

Les défis scientifiques associés à cette thèse sont nombreux. Une problématique fondamentale pour le succès du projet est de déterminer si les microcapteurs ISFET peuvent véritablement être utilisés de manière *in situ* dans le sol alors que cette technologie a été initialement prévue pour l'analyse en phase « purement » liquide. De plus, les propriétés de détection des ISFET devront être compatibles avec les concentrations en ions ammonium et nitrates typiques des sols cultivés, sans subir l'influence des autres espèces présentes. Enfin, la surveillance de l'azote du sol pendant toutes les phases de croissance du blé dur ne sera possible qu'à condition que les propriétés de détection des ISFET se maintiennent pendant plus de cinq mois. Pour y parvenir, l'intégration des microcapteurs dans un système d'analyse autonome et communicant adapté à l'analyse du sol sera une problématique cruciale.

Au vu de ces différents défis, ce manuscrit est composé de quatre chapitres.

Dans le premier chapitre, nous replacerons nos travaux dans leur contexte général. Nous présenterons le rôle de l'azote pour les plantes ainsi que les pratiques de fertilisation azotée et leurs conséquences environnementales. Après avoir introduit les principales méthodes d'analyses conventionnelles de l'azote, nous dresserons un état de l'art des technologies de mesures de l'azote sur site, notamment celles basées sur des capteurs électrochimiques. Enfin, nous nous positionnerons par rapport aux stratégies d'intégration envisageables afin de répondre du mieux possible à notre problématique générale.

Dans le deuxième chapitre, nous nous appuierons sur quelques bases théoriques pour expliquer comment fonctionnent les capteurs électrochimiques potentiométriques, comment les concevoir et les caractériser. A partir d'une étude bibliographique, nous présenterons les choix effectués concernant les formulations des membranes ionosensibles qui seront intégrées aux pH-ISFET pour détecter les ions nitrates et ammonium du sol.

Le troisième chapitre débutera par une description du procédé de fabrication des pH-ISFET ainsi que du procédé d'intégration des membranes ionosensibles. Puis, nous discuterons les résultats obtenus au cours de la caractérisation des pH-ISFET, pNH_4 -ISFET et pNO_3 -ISFET en conditions *in vitro*. Enfin, nous traiterons la problématique de l'électrode de référence, composant essentiel à la fiabilité des capteurs électrochimiques, à travers un exemple de fabrication et de caractérisation d'une électrode miniature « tout solide ».

Le quatrième et dernier chapitre sera consacré à l'application des microcapteurs ISFET à l'analyse ionique du sol en conditions *in situ*. Nous évaluerons l'influence de certains paramètres comme l'humidité, la texture du sol ou la durée de mesure sur les capacités de détection des ISFET. Les mesures seront comparées aux résultats obtenus par les techniques d'analyse classiques. Enfin, nous présenterons l'intégration de la technologie ISFET dans un système d'analyse multi-capteurs autonome et communicant développé en collaboration avec la société Sirea. Les premiers résultats obtenus dans le sol avec ce système seront discutés.

Nous achèverons ce manuscrit en livrant un ensemble de conclusions et de perspectives sur les capteurs et le système réalisés ainsi que leurs applications à l'analyse des sols cultivés.

Chapitre 1 :

Positionnement du projet INNOPERF-Blé et état de l'art des méthodologies d'analyse ionique du sol

Introduction : le blé, céréale essentielle à la nutrition de l'homme

Cultivé en Mésopotamie depuis l'antiquité, le blé est aujourd'hui la plus importante culture vivrière produite au sein des zones tempérées du globe. Les propriétés uniques du gluten contenu dans le blé permettent la fabrication de nombreux produits comme le pain, les pâtes et les nouilles. Ces produits, plus pratiques à produire et à consommer que les aliments traditionnels, attirent de plus en plus de consommateurs, même en dehors des régions où le blé est cultivable. Le blé incarne ainsi une certaine forme du mode de vie occidental [1]. D'un point de vue nutritionnel, cette céréale est avant tout source d'énergie, à travers les glucides qui constituent entre 65 et 75% du poids du grain et plus particulièrement l'amidon qui représente 80% des glucides [2][3]. Le blé apporte de nombreux autres nutriments en quantités significatives comme des protéines, des fibres, et dans une moindre mesure, des lipides, vitamines, et des minéraux.

La production mondiale de blé a suivi une progression linéaire depuis le début des années 1960 pour finalement s'élever à plus de 700 millions de tonnes en 2014 (Figure 1) [4]. La Chine, l'Inde, les Etats-Unis, la Russie et la France se disputent le top 5 des plus gros producteurs mondiaux de blé (Figure 2).

Le blé, céréale du genre *Triticum*, existe sous deux principales variétés, *Triticum turgidum subsp. durum* et *Triticum aestivum*, plus communément appelées blé dur et blé tendre. Les travaux du projet INNOPERF-Blé se tournent plus spécifiquement vers l'étude du blé dur. Cette variété, produite mondialement à environ 35-40 millions de tonnes par an, est adaptée au climat chaud et sec caractérisant le pourtour méditerranéen. Elle est notamment utilisée à la confection des semoules et pâtes alimentaires [1]. Avec une production de 1,4 million de tonnes en 2014 récoltées sur une surface de 288 000 ha, la France se hisse au 2ème rang des producteurs européens de blé dur, derrière l'Italie [5].

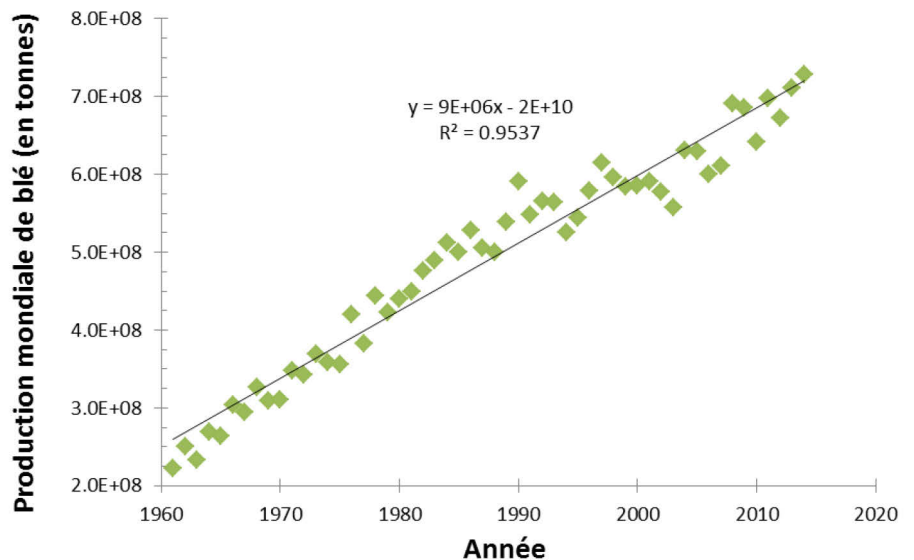


Figure 1 : Evolution temporelle de la production mondiale de blé. Courbe réalisée à partir des données fournies par l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) [4]

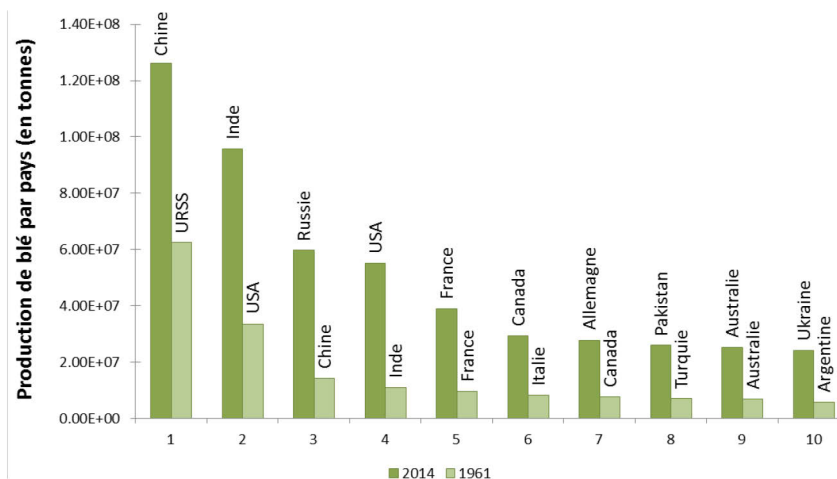


Figure 2 : Top 10 des producteurs de blé au niveau mondial. Graphique réalisée à partir des données fournies par la FAO [4]

En 2016, près de 800 millions de personnes souffraient de sous-alimentation, notamment en Inde, en Chine et en Afrique sub-Saharienne [4]. Les estimations de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) prévoient une augmentation de plus de 30% de la population mondiale d'ici à 2050. Selon ces prévisions, 9,7 milliards de personnes peupleront alors la planète. Ces chiffres nous interrogent sur notre capacité à nourrir l'humanité. Des projections de la FAO estiment que la production agricole mondiale devra augmenter de 70% entre 2005-2007 et 2050 [6]. Pour y parvenir, une première solution est l'intensification de l'agriculture qui vise à produire plus sur la même surface cultivée. Une seconde solution est la mise à disposition de l'agriculture d'un très grand nombre de terres. Toutefois, l'augmentation à grande échelle des surfaces agricoles engendre de nouveaux problèmes liés à l'environnement (déforestation), aux manques d'infrastructure ou de volonté politique. Le scénario le plus crédible est donc de chercher à produire plus, mieux et sur la même surface. Dans ce contexte, l'apport de nouvelles technologies pour aider à l'implémentation de nouvelles pratiques de cultures sera crucial, notamment en ce qui concerne la nutrition du blé et le pilotage de la fertilisation [7].

Dans la prochaine partie, nous tenterons de présenter le métabolisme azoté du blé afin de mieux comprendre pourquoi l'azote du sol est au cœur des considérations propres à la culture du blé.

1. L'azote au sein du système Sol-Plante

a. Métabolisme azoté de la plante : rôle et devenir de l'azote

L'élément azote, de symbole N, est essentiel à la croissance et au développement des plantes. Il est un des principaux constituants de leur ADN, mais aussi de leurs protéines, enzymes et de la chlorophylle indispensable à la photosynthèse [8]. L'azote représente ainsi entre 1 et 5% de la matière sèche des plantes [9]. Son utilisation par les plantes se fait à travers l'enchaînement de trois processus :

- (1) L'absorption de l'azote du sol,
- (2) L'assimilation de l'azote absorbé, qui correspond à sa transformation en composés azotés organiques,
- (3) La translocation, c'est-à-dire le transfert de l'azote vers les autres organes de la plante.

Malgré l'abondance de l'azote à 78%_{vol} dans l'atmosphère sous forme de diazote N₂, l'absorption de l'azote par la plupart des plantes cultivées se limite essentiellement aux formes minérales ammonium NH₄⁺ et nitrates NO₃⁻. Les ions nitrates sont généralement présents en plus fortes concentrations que les ions ammonium dans les solutions liquides issues des sols agricoles (1-5 mM contre 20-200 μM) [10]. Du fait de leur plus grande mobilité, ils sont plus facilement absorbés par les racines que les ions ammonium qui sont en partie retenus par le complexe argilo-humique du sol.

Après leur absorption par les racines, les nitrates peuvent être stockés dans les vacuoles des racines, directement assimilés ou bien transportés jusqu'aux parties aériennes via les vaisseaux du xylème (Figure 3) [9]. Arrivés au niveau des feuilles, ils pourront également être stockés dans les vacuoles ou assimilés. L'assimilation des nitrates consiste en leur réduction enzymatique en ammonium, suivant deux étapes [11] :

- (1) L'enzyme réductase (NR) convertit les ions NO₃⁻ en ions nitrites NO₂⁻ au niveau du cytoplasme,
- (2) Les nitrites sont transportés jusqu'aux plastes où ils seront réduits en ammonium NH₄⁺ par l'enzyme nitrite réductase (NiR).

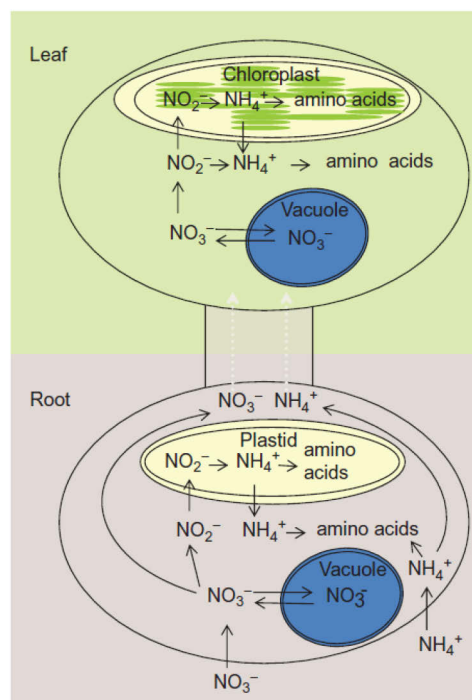


Figure 3 : Vue d'ensemble des mécanismes d'absorption et d'assimilation de l'azote par les plantes. Tiré de [9]

A ce stade des explications, l'ammonium au sein de la plante provient de différentes sources : absorption par les racines, réduction enzymatique des ions nitrates absorbés, dégradation des protéines des tissus en sénescence ou encore photorespiration au niveau des chloroplastes de feuilles insolées. L'assimilation de l'ammonium en acides aminés se fait ensuite par le jeu de deux enzymes agissant successivement : la glutamine synthétase (GS) et la glutamine oxoglutamate aminotransférase (GOGAT) [12] [13] :

- (1) L'enzyme GS fixe l'ammonium sur une molécule de glutamate déjà présente pour former la glutamine,
- (2) L'enzyme GOGAT transforme la glutamine en deux molécules de glutamate.

Les molécules de glutamate et glutamine peuvent ensuite être directement utilisées à la synthèse d'autres molécules telles que des amides, amines, acides aminés, peptides, protéines, et autres acides nucléiques (Figure 4).

Ainsi, c'est en prélevant les ions ammonium et nitrates du sol que les plantes peuvent synthétiser leurs acides aminés, dont une partie est stockée dans les protéines du grain. Pour le blé, ces protéines représentent 7 à 22% du poids du grain à sec [1]. Ce pourcentage est une condition d'accès au marché ou de valeur de la production agricole [14]. Par exemple, dans le cas du blé dur, un objectif de 14%_m de protéines dans le grain est visé afin d'assurer la fabrication de pâtes disposant d'une ténacité suffisante [15]. De plus, ce pourcentage est essentiel à la bonne nutrition de l'Homme qui puise dans sa nourriture les acides aminés qui ne sont pas produits par son propre métabolisme.

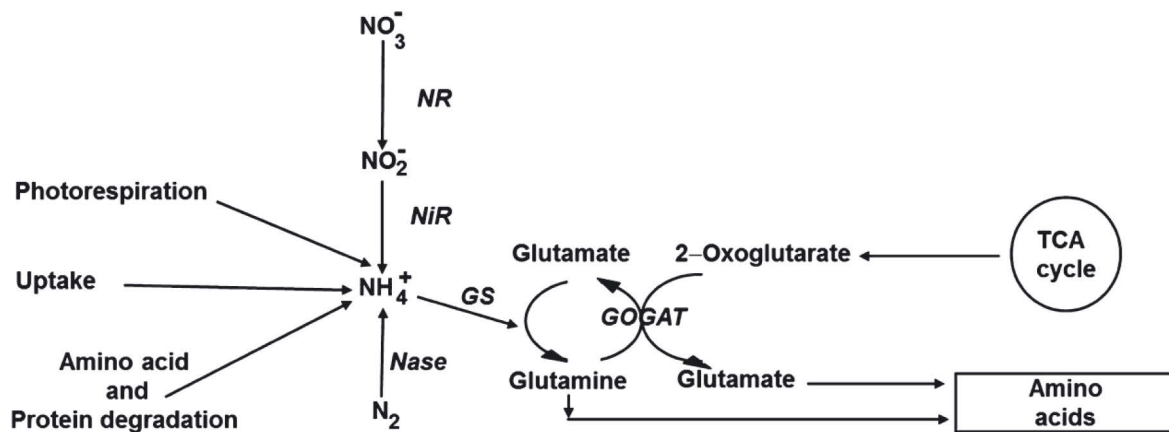


Figure 4 : Les principales transformations opérant lors de l'assimilation de l'azote par les plantes. Tiré de [8]

b. Cycle de l'azote dans les sols cultivés

Le cycle de l'azote désigne l'ensemble des processus de transformation des différentes formes de l'azote (diazote, azote organique, azote minéral, etc...) à travers l'atmosphère, les écosystèmes terrestres et marins. Nous venons de voir que la disponibilité des ions ammonium et nitrates dans le sol est un facteur décisif à la bonne croissance du blé puisque celui-ci ne peut pas absorber l'azote sous une autre forme. La prochaine sous-partie est donc consacrée à la description des principaux processus du cycle de l'azote qui déterminent la fertilité des sols cultivés. Ils sont résumés sur la Figure 5. Nous nous placerons du point de vue d'une plante en décrivant, dans un premier temps, les mécanismes augmentant la quantité d'azote minéral dans le sol, et dans un second temps, ceux qui entraînent une perte d'azote minéral.

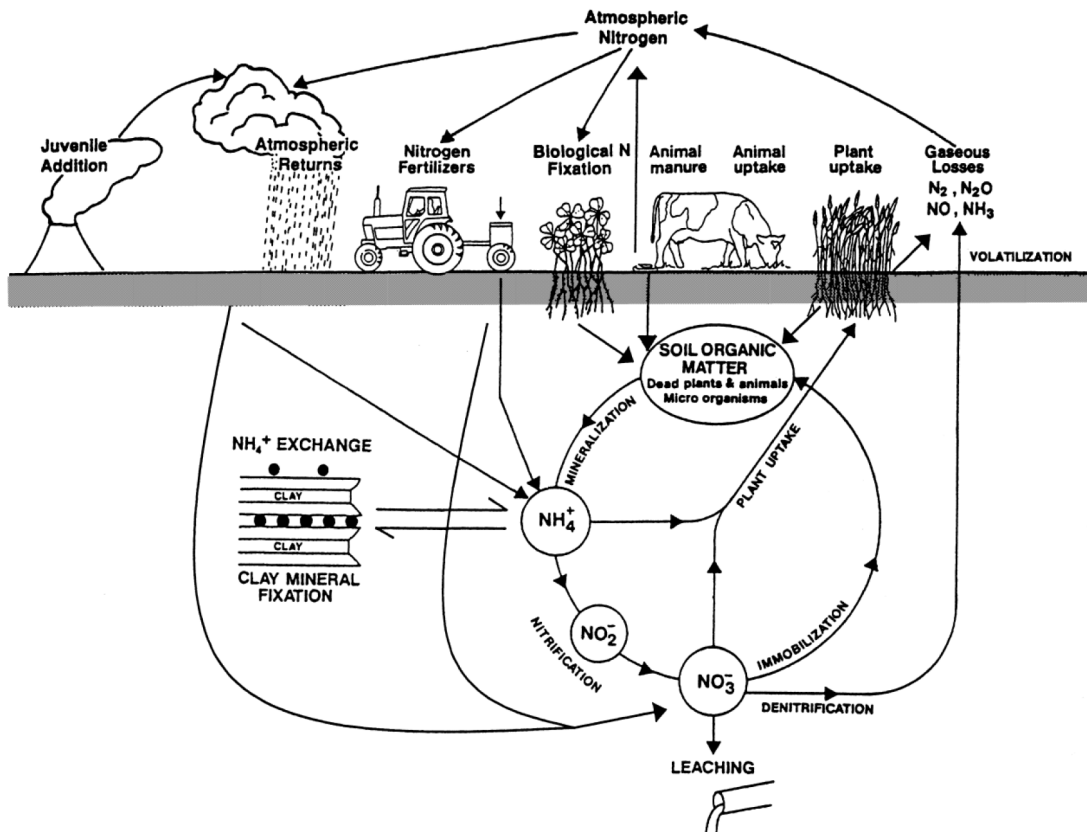
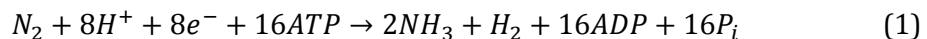


Figure 5 : Représentation schématique des principales transformations du cycle de l'azote au sein du système sol-plante. Tiré de [16]

i. Gain en azote minéral au sein du système Sol-Plante

La triple liaison covalente entre les deux atomes d'azote rend la molécule de diazote N_2 extrêmement stable et indisponible pour la plupart des organismes vivants. En conséquence, seuls certains organismes procaryotes sont capables d'utiliser l'atmosphère comme source d'azote [17]. Ces bactéries réduisent le diazote N_2 en ammoniac NH_3 , assimilable par la suite sous forme d'ammonium NH_4^+ . Il s'agit de la fixation biologique de l'azote, principal phénomène naturel permettant l'entrée d'azote au sein du système sol-plante. Cette transformation repose sur l'action d'un complexe enzymatique appelé nitrogénase selon la réaction de réduction suivante [18]:

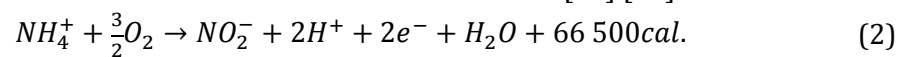


Avec 16 molécules d'ATP hydrolysées pour une seule molécule N_2 fixée, ce métabolisme est l'un des plus coûteux en énergie du monde vivant [19]. Les bactéries fixatrices d'azote se divisent en deux catégories. La première correspond à celles dites « libres » qui tirent leur énergie de la matière organique du sol (bactéries des genres *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Clostridium*). La deuxième catégorie de bactéries vit en symbiose avec les racines de plantes légumineuses (genre *Rhizobium* [20]) et fixe l'azote de manière beaucoup plus efficace [21]. L'invention du procédé Haber-Bosch en 1904 par le chimiste Allemand Fritz Haber a cependant rendu possible la fixation de l'azote atmosphérique par une méthode industrielle. Contrairement à la fixation biologique, celle-ci ne fonctionne qu'à haute température ($\approx 500^\circ C$) et sous forte pression (150-300 bars) en plus de nécessiter des catalyseurs efficaces [17]. La production d'ammoniac demande donc une quantité importante d'énergie qui est apportée via du gaz naturel ou du charbon. Aujourd'hui, ce procédé coûteux est toujours à la base de la production

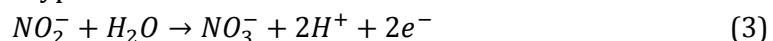
des engrais azotés de synthèse utilisés massivement en agriculture. Les conséquences de leur emploi, notamment environnementales, seront détaillées dans une prochaine partie.

Les sols des régions tempérées contiennent entre 0,06% et 0,3% d'azote dont près de 90% se trouvent sous forme organique provenant de la population microbienne et des déchets d'origine animale ou végétale [22]. La conversion de cet azote organique en forme minérale ammonium s'appelle la minéralisation. Ce processus est réalisé par l'activité biologique de microorganismes hétérotrophes du sol qui puisent leur carbone et leur énergie dans les déchets organiques. Cependant, ces microbes ont également besoin de nutriments azotés pour assembler leurs protéines et acides nucléiques. En conséquence, si la matière organique du sol n'est pas suffisamment riche en azote, les microorganismes immobilisent l'azote du sol pour leur propre métabolisme. La disponibilité de l'azote inorganique pour les plantes résulte donc de l'équilibre entre ces deux phénomènes, minéralisation et immobilisation. Cet équilibre dépend essentiellement de la qualité de la matière organique, qu'on évalue à travers son contenu en carbone C par rapport à son contenu en azote (rapport C/N) [23]. L'exemple du fumier utilisé comme engrais en agriculture illustre ce phénomène. Le fumier dispose d'un faible rapport C/N et les microorganismes du sol n'ont donc pas de mal à y trouver de l'azote. Il en résulte que la minéralisation domine l'immobilisation et l'ammonium libéré est alors disponible pour les plantes. En plus du rapport C/N de la matière organique, la teneur en eau et la température du sol influent également sur l'activité microbienne [24].

La nitrification désigne le processus biologique correspondant à la transformation enzymatique en deux étapes des ions ammonium en ions nitrates. Ces transformations sont réalisées par des bactéries aérobies, dites nitrifiantes, de la famille *Nitrobacteraceae* (Figure 6) [25]. La première étape est assurée par les bactéries *Nitrosomonas*, qui tirent leur énergie de l'oxydation de l'ammonium en ions nitrites NO_2^- selon la réaction [26] [27]:



La deuxième étape de la nitrification consiste en l'oxydation enzymatique des ions nitrites en ions nitrates par les bactéries de type *Nitrobacter* selon la réaction :



L'activité de ces deux types de bactéries est optimale en sols aérés, possédants un pH et une température situés respectivement dans les gammes [7,5 -8,0] et [25-30]°C [28] [25]. Toutefois, des études récentes ont montré que certaines bactéries *Crenarchaeota* sont également capables d'oxyder l'ammonium en conditions anaérobies [30] [31].

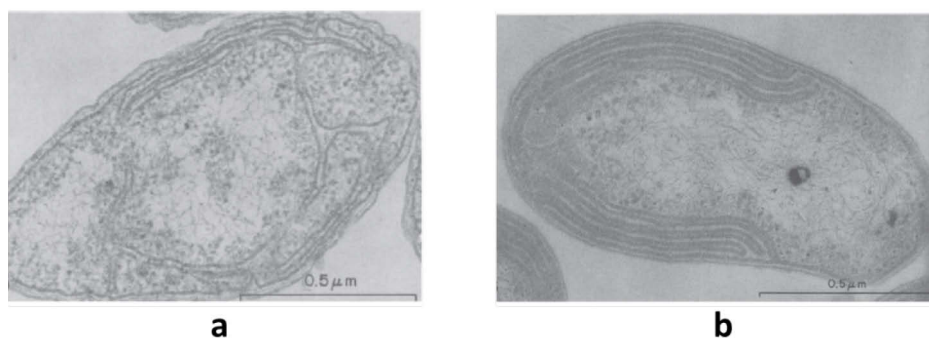


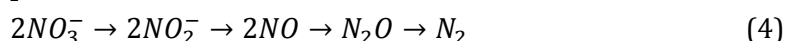
Figure 6 : (a) Section d'une souche terrestre de bactérie *Nitrosomonas europaea* (microscope électronique à balayage, x 81,700). (b) Section longitudinale d'une bactérie *Nitrobacter winogradskyi* (microscope électronique à balayage, x 113,500). Tirés de [25]

ii. Pertes d'azote vers l'extérieur du système Sol-Plante

La volatilisation ammoniacale est une première cause de perte d'azote. En solution aqueuse, ammonium NH_4^+ et ammoniac NH_3 forment un couple acide-base $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ caractérisé par une constante de dissociation acide $\text{pK}_a=9,25$. Cela signifie qu'à $\text{pH}=9,25$, les deux formes sont présentes en proportions égales et l'on peut considérer qu'à $\text{pH}<6,5$, seule la forme NH_4^+ subsiste. Par conséquent, dans des sols à pH élevé et en condition de sécheresse, l'ammonium peut être transformé en ammoniac puis volatilisé.

D'autre part, l'azote minéral peut être perdu par le phénomène de lixiviation, plus couramment appelé lessivage. Les ions nitrates de même que la plupart des particules de sols argilo-limoneux sont des espèces chargées négativement. Pour cette raison, les NO_3^- ne sont pas retenus par le sol mais se solubilisent très facilement dans l'eau. Ainsi, contrairement aux ions NH_4^+ , les ions NO_3^- sont naturellement drainés en profondeur vers les nappes phréatiques. Les sols à granulométrie plus fines sont généralement moins sujets au lessivage car le drainage de l'eau y est plus lent et la dénitrification plus probable [16]. La présence dans le sol de macropores, créés par exemple par une sécheresse ou le passage de lombrics ou racines, peut aussi avoir un important impact sur le lessivage. En effet, après fertilisation, cette porosité constitue un moyen privilégié pour l'eau de pluie ou d'irrigation chargée en nitrate de contourner rapidement les pores les plus fines [32]. Les conditions climatiques et saisonnières sont un autre facteur déterminant du lessivage des nitrates. Le phénomène est davantage marqué durant l'automne et l'hiver des régions tempérées, quand il y a moins d'évapotranspiration et des précipitations plus importantes. Enfin, c'est bien évidemment la quantité d'azote apportée par l'Homme à la parcelle qui détermine le plus les pertes par lessivages. Si la dose dépasse les besoins des plantes, le surplus non-absorbé s'accumulera dans le sol et sera drainé par l'eau des précipitations ou de l'irrigation.

Enfin, une troisième forme de perte est la dénitrification. Ce terme regroupe l'ensemble des réactions de réductions enzymatiques transformant les nitrates en nitrites, à leur tour transformés en produits gazeux de type oxydes d'azote, monoxyde d'azote NO et monoxyde de diazote N_2O , puis en diazote N_2 :



Ces réactions sont réalisées par une très grande diversité de bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, ou encore *Spirillum* qui peuvent utiliser les nitrates comme source d'énergie [33]. Néanmoins, la plupart des bactéries dénitrifiantes sont des organismes anaérobies facultatives. Il leur est donc énergétiquement plus favorable de respirer l'oxygène si bien que la dénitrification se produit en général dans les sols aux pores peu aérés, par exemple à cause d'un excès d'eau. Au niveau du cycle de l'azote global, il est à noter que le phénomène de dénitrification est le seul à permettre un retour de l'azote fixé dans l'atmosphère. Autrement, les organismes fixateurs d'azote auraient consommés l'ensemble du diazote présent dans l'air [23]. La dénitrification n'est pas toujours considérée comme nuisible puisqu'elle permet la diminution des pertes de nitrate par lessivage, pertes ayant de lourdes conséquences sur l'environnement et la santé. Cependant, la réaction doit être complète pour ne pas libérer d'oxydes d'azote qui sont des polluants atmosphériques contribuant à l'effet de serre.

2. Fertilisation azotée dans l'Agriculture moderne

a. Chiffres et pratiques communes

Plusieurs estimations révèlent qu'en 2000, plus de 40% de la population mondiale dépendait des engrais azotés issus du procédé Haber-Bosch (cf. partie 1bi) pour produire sa nourriture [34] [35]. Une autre étude affirme que, malgré l'évolution des méthodes de culture, l'augmentation de la mécanisation, la sélection végétale et les modifications génétiques des plantes, les engrais azotés de synthèse seraient responsables de 30 à 50% de l'augmentation spectaculaire des rendements constatée ces dernières décennies (Figure 7) [36]. Aujourd'hui, la consommation mondiale actuelle des fertilisants azotés s'élève à environ 100 Mt/an [4].

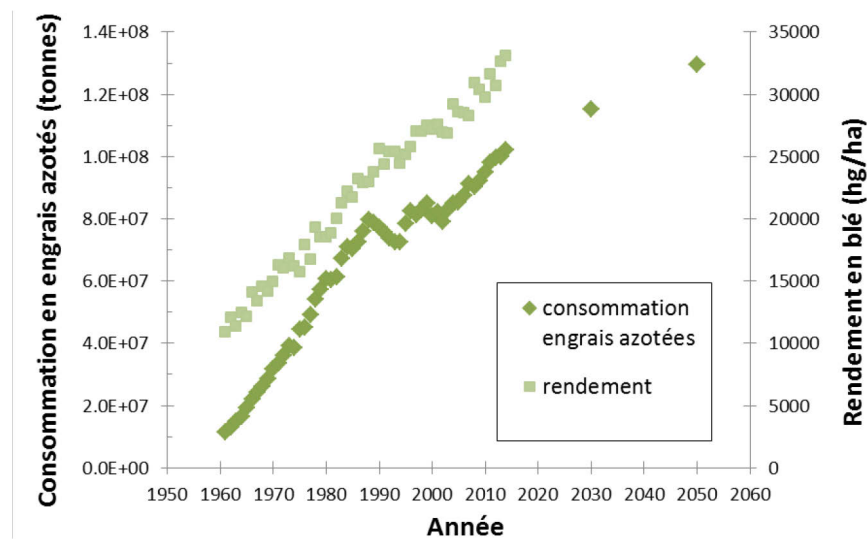


Figure 7 : Consommation d'engrais azotés de synthèse entre 1961 et 2017 et prévisions pour les années 2030 et 2050. Rendement des cultures de blé (tout genre confondu) entre 1961 et 2014. Réalisé à partir des données fournies par la FAO [4]

La description du métabolisme azoté du blé montre que la disponibilité de l'azote minéral dans le sol est essentielle à la croissance de la plante. A l'échelle globale de la culture, on constate que la nutrition azotée est un des plus importants facteurs de la production agricole. Sans apport d'engrais, les travaux de Wang & al. sur la culture de blé dur témoignent de pertes allant jusqu'à 75% de la production maximale. Même avec un apport de 200 kg/ha, la production n'atteint que 75% de la production maximale (Figure 8) [37]. De plus, cette étude montre que la teneur en azote du grain, et donc *in fine* sa qualité nutritionnelle, peut baisser de 66% sans engrais (Figure 9). La qualité des récoltes constitue ainsi le deuxième enjeu de la fertilisation azotée.

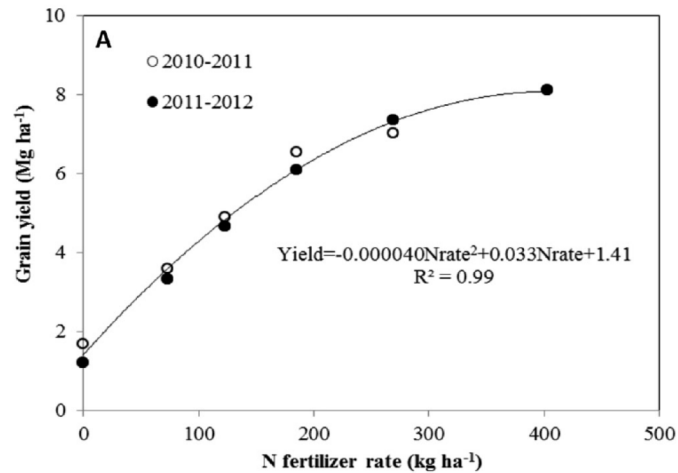


Figure 8 : Rendements en grains du blé dur en fonction de la dose totale surfacique d'engrais azoté apportée. Tiré de [37]

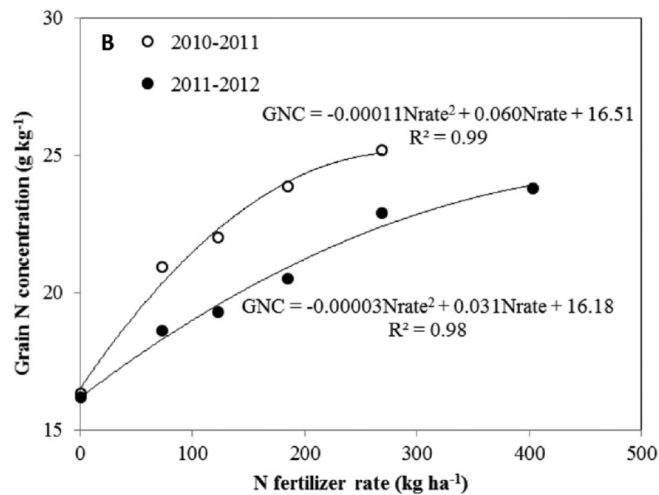


Figure 9 : Concentration en azote du grain en fonction de la dose totale surfacique d'engrais azoté apportée. Tiré de [37]

Les engrais se présentent sous forme solide (granulé, cristal ou prill) ou liquide. Ils peuvent être combinés à d'autres nutriments ou oligo-éléments. On parle alors d'engrais binaires au phosphore NP, ou au Potassium NK, et d'engrais tertiaires NPK. Les engrais ont un mode d'action direct ou à libération progressive selon la vitesse de disponibilité de l'azote apporté à la culture. L'épandage a lieu directement au sol ou par pulvérisation foliaire. L'azote peut être apporté au champ directement sous forme minérale ammoniacale ou nitrique, ou sous forme organique. L'urée, de formule $(NH_2)_2CO$, est la plus simple des formes organiques. Une fois au contact du sol, l'urée s'hydrolyse en un à quatre jours en azote ammoniacal, selon la température, sous l'action de l'enzyme uréase. Les effluents d'élevage (fumiers, lisiers...) et effluents urbains (boues de station d'épuration, composts urbains...) sont des formes plus complexes d'apports azotés organiques car leur teneur précise en carbone, azote total et azote minérale est fortement variable [14].

La dose totale d'engrais à épandre est d'abord estimée par la méthode du bilan prévisionnel de l'azote (Figure 10). En appliquant le principe de conservation de la masse, ce bilan est établi en tenant compte des besoins de la culture vis-à-vis de l'objectif de rendement,

des reliquats azotés à l'ouverture et la fermeture du bilan, ainsi que de l'azote minéralisable au cours du temps [38]. Pour le blé dur, la dose totale se situe typiquement autour de 180 à 250 kg N/ha [14]. La fertilisation azotée du blé est généralement fractionnée en deux, trois, voire quatre apports qui ont lieu à différents stades du développement de la plante (Figure 11). Le premier apport, dit « sortie hiver » ou « tallage », a pour but de limiter les carences du blé au début de son développement. La quantité d'azote doit donc être judicieusement adaptée en fonction des reliquats azotés présents dans le sol. La seconde dose est apportée autour du stade « épi 1cm » et a pour but d'atteindre le rendement optimum. Le troisième et souvent dernier apport est effectué au stade « dernière feuille étalée - gonflement ». Cet apport est considéré comme le plus important pour son effet combiné sur le rendement de la culture et la teneur en protéines [39].

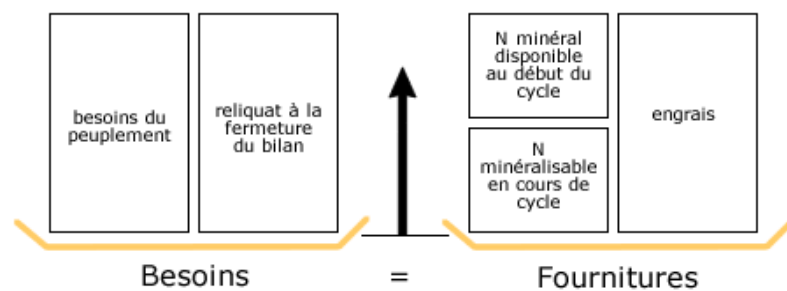


Figure 10 : Représentation schématique de la méthode du bilan prévisionnel de l'azote. Tiré de [38]

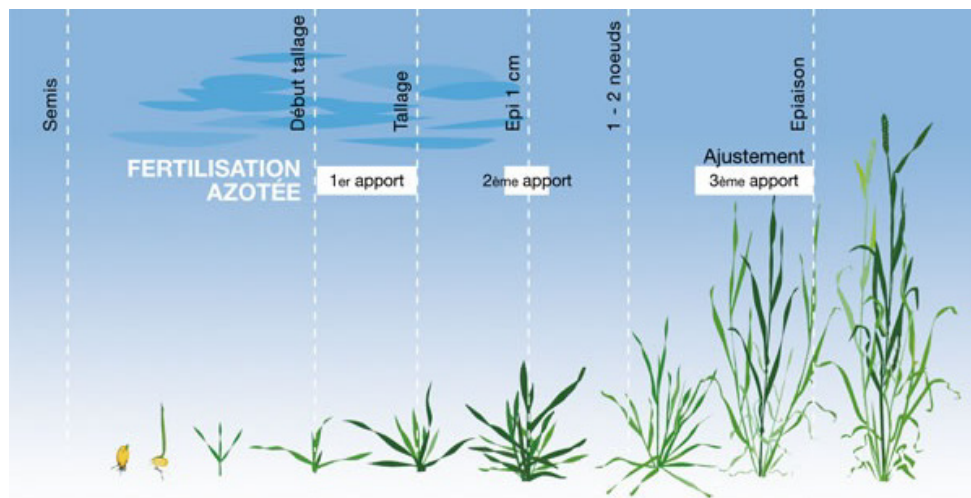


Figure 11 : Représentation schématique des différents stades de croissance du blé et de sa fertilisation. Tiré de [40]

b. Efficacité de la fertilisation azotée

Le premier objectif visé par l'introduction des fertilisants de synthèse en agriculture était d'augmenter le rendement surfacique des récoltes. Comme l'épandage d'engrais azotée représente généralement le coût d'intrants le plus élevé, ces engrais sont parfois employés avec le facteur financier comme seul critère d'optimisation des quantités épandues [41]. Il se pose donc la question de la réelle efficacité d'une telle pratique de fertilisation azotée.

Plusieurs études soulignent que seulement 30 à 50% de l'azote apporté est effectivement utilisé par la culture [42][43][44]. Autrement dit, plus de 50% de la fertilisation azotée est perdue par lessivage, dénitrification, volatilisation ou consommée par les micro-organismes. En

2005, environ 100 Tg d'azote issu du procédé Haber-Bosch a été utilisé en agriculture au niveau mondial alors que seulement 17 Tg d'azote a été consommé par l'Homme sous forme de produits laitiers, viandes ou produits issus des récoltes. On ne peut que constater le manque d'efficacité d'utilisation de l'azote, même en tenant compte des produits non-alimentaires (transport, cuir, laine...) [34].

L'évaluation de l'efficacité de l'azote peut se faire au moyen de l'indicateur « Efficacité d'Utilisation de l'Azote », plus connu en anglais sous le nom Nitrogen Use Efficiency (NUE). Sa définition la plus simple correspond à la biomasse totale de la production (rendement en grain) rapportée à la quantité d'azote disponible dans le sol, en incluant la dose d'engrais apportée [41]. Le NUE varie de manière complexe en fonction de la disponibilité de l'azote dans le sol et de la façon dont les plantes l'assimilent et le remobilisent au cours de leur vie [8]. Les principales sources de variations du NUE peuvent être regroupées dans trois catégories : le génotype de l'espèce, les facteurs environnementaux et la gestion des cultures.

Premièrement, il est évident que chaque espèce et variété de plantes disposent de ses propres caractéristiques morphologiques et fonctionnelles (racines, feuilles, etc...) qui influencent directement sa capacité à absorber l'azote du sol et son efficacité à exploiter cet azote pour se développer [45].

En second lieu, les facteurs environnementaux tels que la température, les précipitations ou la texture du sol affectent le NUE car ces paramètres influencent la croissance des plantes et la disponibilité de l'azote du sol via les processus de minéralisation ou de lessivage. Par exemple, les sols sablonneux sont marqués par des vitesses de percolation plus importantes facilitant le phénomène de lessivage au contraire de sols argileux disposant d'une meilleure capacité de rétention de l'eau. Les conditions climatiques et géographiques (bassin versant) ont également un impact crucial sur l'intensité du lessivage de l'azote [46]. Un autre facteur environnemental décisif pour l'assimilation des nutriments par les plantes est la disponibilité des micro- et macro-éléments dans le sol et en particulier les rapports massiques entre ces éléments. Ainsi, même à un niveau raisonné de fertilisation azotée et avec une teneur en azote suffisante dans le sol, une carence en phosphore ou potassium limite l'assimilation de l'azote par les plantes et pourra entraîner des pertes en azote [47].

Enfin, l'amélioration du NUE est étroitement liée à la gestion de la culture qui doit adapter la fertilisation aux besoins réels des plantes, localement et au cours du temps. La dose d'engrais et la méthode d'apport ont bien sûr un rôle primordial mais d'autres facteurs moins évidents comme l'arrangement spatial et la densité des cultures interviennent également [48]. Le moment de l'apport doit être choisi judicieusement en fonction du stade de croissance de la plante et des prévisions météorologiques pour minimiser les pertes par lessivage. La forme d'azote apportée joue un rôle important dans la régulation des pertes d'azote et influence donc le NUE. L'ammonium et l'urée sont moins susceptibles de lessiver que les nitrates mais sont sujets aux pertes par volatilisation. Les engrais à libération contrôlée offrent une bonne option pour réduire les pertes d'azote car ils facilitent la synchronisation de la disponibilité de l'azote avec la demande des plantes [49].

c. Conséquences environnementales et sur la santé de la fertilisation

Les pratiques agricoles modernes, et notamment la fertilisation, ont engendré un dérèglement du cycle de l'azote au niveau mondial. Le cycle de l'azote au sein des écosystèmes préindustriels demeurait remarquablement fermé, malgré la grande mobilité de l'azote dans

l'atmosphère et l'hydrosphère. Autrefois, le bétail nourri par les cultures locales fournissait le lisier qui était le principal agent assurant le transfert de l'azote vers les terres cultivées. Aujourd'hui, l'emploi des engrais de synthèse et les moyens de transports à bas coût autorisent un découplage géographique entre zones de cultures céréalières et zones d'élevage. Certains territoires sont devenus spécialisés dans l'agriculture intensive basée sur la fertilisation de synthèse alors que les territoires d'élevage sont maintenant dépendants des importations de nourriture. L'urbanisation de la moitié de la population mondiale engendre également une augmentation des échanges commerciaux de biens agricoles. Les restes issus de l'alimentation humaine et animale, loin des lieux d'agriculture, ne peuvent plus être recyclés facilement dans le secteur agricole. Les flux d'azotes atmosphériques et hydrologiques ne se compensent plus et sont causes de pollution des systèmes hydrologiques [50] [51].

Les conséquences environnementales d'une fertilisation azotée excessive sont nombreuses. Tout d'abord, le lessivage des nitrates du sol engendre une pollution des nappes phréatiques et mettent ainsi en danger la santé humaine. La consommation d'une eau polluée par les nitrates est jugée particulièrement nocive pour les enfants de moins d'un an. En effet, les nitrates peuvent interférer dans le transport de l'oxygène dans le sang et engendrer la méthémoglobinémie ou « syndrome du bébé bleu ». Cette maladie, pouvant être mortelle, se caractérise par des troubles respiratoires pouvant être associés à des vomissements et diarrhées voire à des pertes de conscience et des crises convulsives dans les cas extrêmes [52]. Toutefois, si plusieurs cas de méthémoglobinémie causée par les nitrates de l'eau ont été reportés dans les années 1940 et 1950, ils sont plus rares aujourd'hui [16].

L'eutrophisation des eaux douces et marines est la principale conséquence environnementale de l'agriculture. Elle est causée par les écoulements de surface, l'érosion et l'infiltration de l'eau chargée en nitrates des champs agricoles vers les points d'eau. Au sein de l'union européenne, il a été estimé que l'agriculture est responsable de 40 à 80% des entrées d'azote dans les eaux de surface [53]. La présence dans ces eaux d'une quantité anormalement importante de nutriments d'origine agricole entraîne une forte prolifération de certains types de plantes et d'algues. Cette prolifération engendre un bouleversement de l'écosystème au bénéfice des algues et plantes à croissance rapide et au détriment des espèces végétales à croissance lente. Globalement, les eaux eutrophiques sont donc marquées par une diminution de la biodiversité [54].

Aux problèmes d'eutrophisation s'ajoutent la volatilisation ammoniacale et l'émission des oxydes d'azote par dénitrification (cf. partie 1bii) qui contribuent respectivement aux problèmes de pluies acides et au réchauffement climatique de la planète [12].

d. Réglementation de la fertilisation azotée

Afin de se prémunir des conséquences de l'agriculture sur la santé et l'environnement, une réglementation a été mise en place au niveau européen et transposée en droit français. Il s'agit de la directive n°91/676/CEE dite « nitrates » adoptée en décembre 1991. Son principal objectif est de réduire la pollution des réserves d'eau de surface et de sous-sol par le lessivage des nitrates issu des activités agricoles.

Pour atteindre cet objectif, la directive exige des Etats membres qu'ils désignent l'ensemble des territoires affectés par la pollution ou qui pourraient l'être si aucune action n'est prise pour l'éviter. Ces territoires, les « zones vulnérables aux nitrates » (ZVN), sont soumis à un programme d'actions obligatoires propres à la gestion des fertilisants. Par exemple, l'épandage

d'azote provenant des effluents d'élevage dans les ZVN est limité à 170 kg/ha. La réglementation fixe également des périodes d'interdiction d'épandage de fertilisant azoté en ZVN. Elle demande aux agriculteurs de tenir à jour et conserver pendant 5 ans des documents d'enregistrements des pratiques de fertilisation réalisées sur leurs parcelles [55] [56]. Dans certaines régions, des mesures spécifiques par arrêtés préfectoraux imposent aux agriculteurs de réaliser chaque année une analyse de sol pour la détermination du reliquat azoté [57].

Cette politique semble porter ses fruits puisque la superficie dans laquelle la charge critique pour l'eutrophisation était dépassée concernait 84% des écosystèmes en 1990 contre 63% en 2010 (Figure 12)[58]. Les estimations pour l'année 2020 montrent toutefois que le nord-ouest de la France resterait touché par l'eutrophisation.

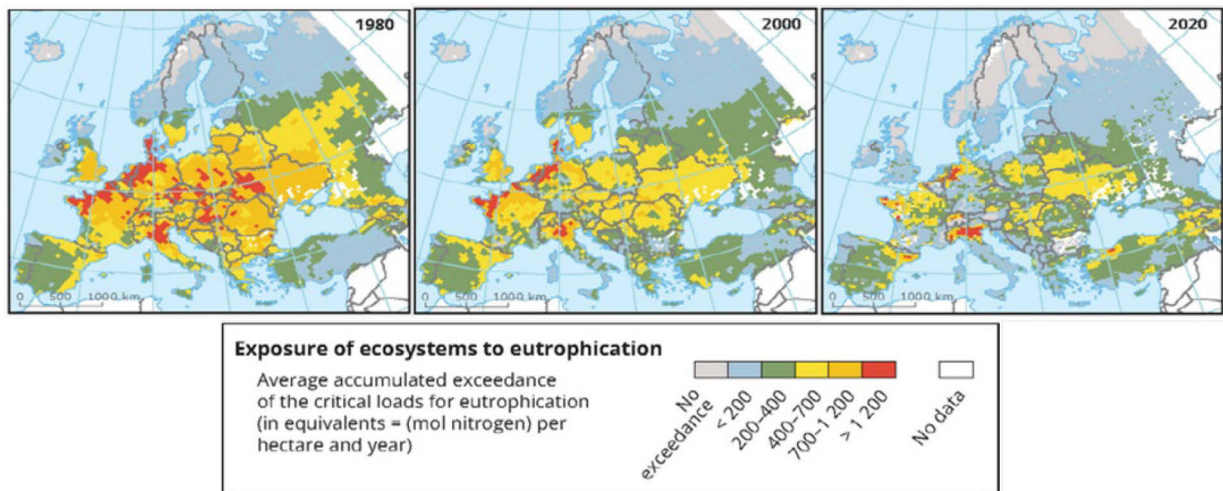


Figure 12 : Evolution entre 1980 et 2030 des zones de l'Union européenne exposées à un excès d'accumulation de nitrates. Tiré de [58]

En France, le décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001 fixe la concentration limite en nitrate dans l'eau destinée à la consommation humaine à 50 mg/L pour les eaux superficielles et à 100 mg/L pour les autres eaux [59]. La limite pour les ions ammonium s'élève à 4 mg/L. Aux Etats-Unis, l'agence fédérale de protection de l'environnement EPA a imposé une limite de 44,3 mg/L de nitrate dans l'eau potable [60].

3. Méthodologies d'analyse pour le suivi du cycle de l'azote au sein du système Sol-Plante

a. Méthodes conventionnelles en laboratoire

i. L'échantillonnage du sol

En agriculture, la méthode conventionnelle d'analyse du sol repose sur l'analyse par un laboratoire d'échantillons de sol prélevés sur la parcelle. Il se pose la problématique de l'échantillonnage : comment obtenir des échantillons qui soient les plus représentatifs du milieu ? La technique d'échantillonnage employée doit garantir que l'analyse finale reflètera bien le niveau de concentration concerné à un instant et en un lieu donnés [61]. Typiquement, un sol de surface 1 ha et de profondeur 15 cm possède une masse de sol de 2000 tonnes. Un prélèvement d'un kg de ce sol représente donc seulement 0,00005% de la terre totale. Si l'on considère que seulement 1 g de cet échantillon sera effectivement analysé par le laboratoire, cela

signifie que l'on exploite seulement 0,00000005% du sol pour prendre des décisions cruciales concernant la gestion des intrants [62].

En pratique, pour que l'analyse tienne compte de l'inévitable variabilité d'une parcelle, celle-ci doit être divisée en zones homogènes. Cette division se base sur des critères tels que le type de sol et de culture, le degré d'érosion, le relief, l'historique de culture ou de fertilisation, ou tout autre facteur pouvant avoir une influence sur la concentration des nutriments azotés (Figure 13) [63]. Un échantillon constitué du mélange d'une vingtaine de prélèvements de sols doit être effectué pour chaque zone homogène en évitant les bordures de champs, anciennes haies ou chemins. Le sol est prélevé à l'aide d'une tarière sur une profondeur de 0-30 cm pour les grandes cultures céréalières. Dans le cas de l'analyse de reliquats azotés, l'étude se fait sur 3 couches distinctes appelées « horizons » : 0-30 cm, 30-60 cm et 60-90 cm.

Après prélèvement, les conditions de conservation et de transport des échantillons jusqu'au laboratoire ne doivent pas être négligées pour éviter les transformations des formes azotées organiques et minérales par les micro-organismes du sol. Les échantillons doivent donc être transportés aussi rapidement que possible. Pour le cas spécifique de l'analyse de l'azote minéral des échantillons, un stockage à 4°C voire une congélation permet de se prémunir de l'activité des micro-organismes.

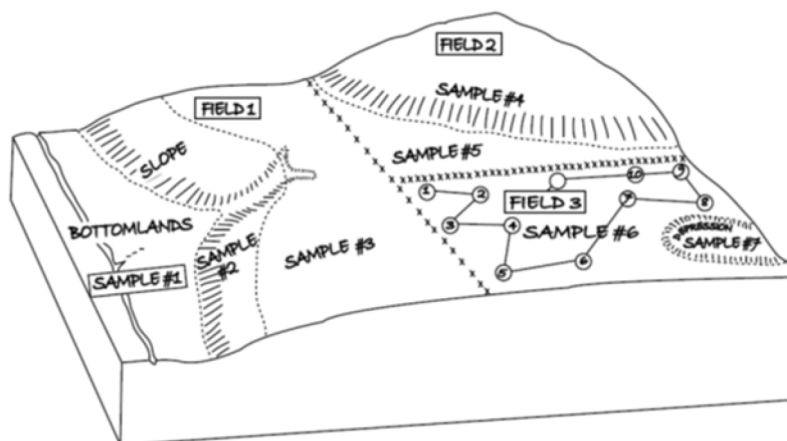


Figure 13 : division de la parcelle en zones homogènes pour accroître la représentativité des variabilités du milieu lors de l'analyse des échantillons. Tiré de [63]

ii. Extraction de l'azote minéral

Dans le sol, alors que les ions nitrates, très solubles, se trouvent dans la phase liquide, les ions ammonium sont répartis en trois fractions :

- 1) Ions solubilisés dans la solution du sol,
- 2) Ions échangeables fixés sur le complexe argilo-humique du sol,
- 3) Ions non-échangeables fixés sur le complexe argilo-humique.

Les ions ammonium NH_4^+ et nitrates NO_3^- doivent être extraits de l'échantillon de sol avant d'être dosés. Une simple extraction à l'eau est suffisante pour les ions nitrates et ammonium déjà présents dans la solution du sol [64]. Les ions ammonium de la deuxième fraction doivent être échangés avec les cations d'une solution d'extraction saline. Classiquement, une solution de chlorure de sodium KCl à 1 M est utilisée [65]. En raison du risque d'interférences ioniques du KCl avec la méthode de dosage employée, certains auteurs ont étudié

des solutions alternatives comme l'extraction au chlorure de calcium CaCl_2 à 0,01 M ou encore le sulfate de cuivre CuSO_4 à 0,02 M [66].

iii. Dosage de l'azote minéral par les techniques analytiques conventionnelles

Une fois l'azote minéral extrait dans une solution aqueuse, la détermination de sa concentration peut se faire en utilisant la multitude de techniques analytiques disponibles en laboratoire. Les principales seront succinctement présentées au cours des prochains paragraphes.

▪ **Spectrophotométrie UV** (nitrate) :

Les ions nitrates absorbent le rayonnement ultraviolet dans la gamme de longueurs d'onde [200-210 nm]. Cette propriété est exploitée pour déterminer la concentration en nitrate des solutions d'extrait de sol. Un spectrophotomètre permet de mesurer l'absorbance A_λ de la solution à une longueur d'onde λ donnée et de remonter à sa concentration C selon la loi de Beer-Lambert :

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \times l \times C \quad (5)$$

où ε_λ est le coefficient d'absorption molaire; l est la longueur de solution à traverser.

Les extraits de sol sont fortement susceptibles de contenir de la matière organique ainsi que des ions chlorures Cl^- , nitrites NO_2^- et fer III Fe^{3+} en quantités variables. Or ce sont des espèces qui absorbent dans la même gamme de longueurs d'onde que les nitrates. Différentes méthodes ont donc été proposées pour réduire leur interférence sur la détermination de la teneur en nitrate [67] [68]. L'approche de Norman *et al.* consiste en la réduction des nitrates par hydrogénation catalytique au Nickel de Raney (alliage de nickel et d'aluminium) en milieu acide. La comparaison des absorbances d'une solution traitée au Nickel de Raney et d'une solution non traitée permet de remonter à la concentration en nitrate en corrigeant le signal provenant des espèces interférentes. La limite de détection de la méthode se situe autour de de 0,5 $\mu\text{g NO}_3^-/\text{g}$ et répond de manière linéaire jusqu'à 100 $\mu\text{g/g}$ de sol [69].

▪ **Méthode de Griess (dosage colorimétrique par réduction cadmium-cuivre)** (nitrate) :

La première étape de cette technique est la réduction des ions nitrates en ions nitrites par passage de la solution d'extrait de sol sur une colonne de cadmium cuivré. Dans un second temps, l'échantillon est traité à l'acide sulfanilique. Le composé formé se couple avec du α -naphtylamine (réactif de Griess) pour former un colorant azoïque rouge. De manière similaire à la méthode précédemment présentée, on remonte à la concentration en nitrite de la solution par mesure de l'absorbance de la solution à la longueur d'onde 540 nm et comparaison avec des solutions étalons (Figure 14) [65] [70]. En réalité, c'est donc la concentration "nitrate + nitrite" qui est déterminée.

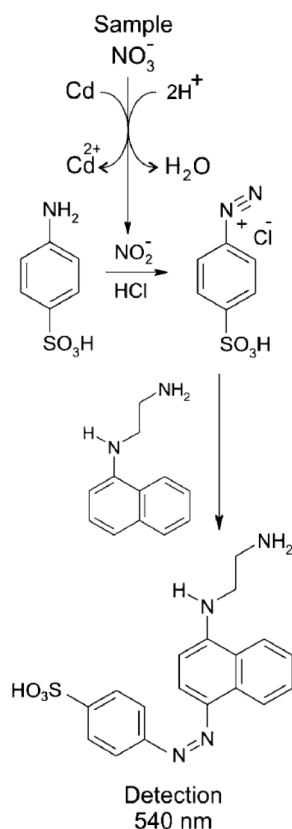


Figure 14 : Les transformations chimiques opérant au cours de la méthode de Griess permettant le dosage colorimétrique des nitrates. Tiré de [71]

- **Dosage colorimétrique** (ammonium) :

En milieu alcalin, l'ammoniaque réagit avec le phénol et l'hypochlorite pour former une couleur bleue d'intensité proportionnelle à sa concentration. Cette coloration provient de la formation d'indophénol. Un catalyseur est couramment utilisé pour augmenter la vitesse de réaction à température ambiante. Il peut s'agir d'acétone, d'ions manganèse ou d'ions nitroprussiates. La colorimétrie est effectuée en mesurant l'absorbance de la solution d'extraits de sol à la longueur d'onde 636nm et en la comparant aux résultats obtenus sur des solutions étalons [72]. Dans un second temps, il est également possible de déterminer la concentration "nitrate + nitrite" en utilisant un alliage Devarda (alliage aluminium/cuivre/zinc). En effet, en milieu fortement alcalin, cet alliage permet la réduction des ions nitrates et nitrites en ions ammonium qui peuvent alors être dosés de la même manière [73].

- **Titration acido-basique** (ammonium) :

Une alternative à la méthode précédente est de procéder à un titrage acido-basique des ions ammonium. En milieu alcalin, les ions ammonium passent sous forme ammoniac NH₃. Le NH₃ est ensuite déplacé par entraînement à la vapeur, recueilli dans de l'acide borique et finalement titré avec de l'acide sulfurique en présence d'un indicateur coloré [65].

- **Méthodes électrochimiques** (pH, nitrate et ammonium) :

A l'interface entre chimie et électronique, les méthodes électrochimiques permettent la détection d'espèces ioniques ou moléculaires en exploitant leurs propriétés électriques en phase liquide. Elles sont classifiées en plusieurs familles selon le paramètre électrique mesuré :

Paramètre mesuré	Méthode électrochimique
Intensité électrique (I)	Ampérométrie
Potentiel électrique (E)	Potentiométrie
Impédance électrique (Z)	Impédancemétrie
Conductivité électrique (σ)	Conductimétrie

Tableau 1 : Les différentes méthodes d'analyse électrochimique

Parmi toutes ces méthodes électrochimiques, les capteurs potentiométriques sont les plus répandus sur le marché de l'analyse ionique pour l'environnement. Au sein de la famille des capteurs potentiométriques, les électrodes ioniques spécifiques (Ion Selective Electrode, ISE, en anglais) sont bien adaptées à la mesure des ions nitrates, ammonium et du pH des solutions d'extraits de sol. Leur principe de fonctionnement consiste en la mesure à courant nul d'un potentiel électrique, dépendant de l'activité de l'espèce à détecter, par rapport à un potentiel de référence.

Typiquement, l'électrode spécifique est couplée à une électrode de référence formant un montage à deux électrodes plongé dans la solution dont on veut déterminer la concentration. L'ISE est constituée d'un réservoir interne contenant un électrolyte de composition connue et disposant à son extrémité d'une membrane ionique, un élément sensible permettant uniquement le passage par osmose de l'ion cible (Figure 15). Une différence de potentiel électrique s'établit entre l'électrode spécifique et l'électrode de référence, dont le potentiel est indépendant de la composition de la solution. Suivant la loi de Nernst, la variation de cette différence de potentiel est proportionnelle au logarithme de l'activité de l'ion cible :

$$E = E^0 + \frac{RT}{vF} \ln A \quad (6)$$

Où E est la différence de potentiel mesurée entre les deux électrodes ; E^0 est une constante regroupant un ensemble de termes de potentiel (potentiel de jonction, potentiel normal de l'électrode de référence...) ; R est la constante des gaz parfaits ; T est la température ; v est la valence de l'ion mesuré ; F est la constante de Faraday (96 485 C/mol) ; et A l'activité de l'ion cible [74].

Ainsi à 25°C, les ISE les plus performantes disposent d'une pente de réponse d'environ 59 mV/pX^{+/-} dans une gamme linéaire qui est généralement de l'ordre [10⁰ – 10⁻⁵ mol/L].

Les électrodes spécifiques disposent de nombreux avantages par rapport aux techniques présentées précédemment : pas d'utilisation de réactifs chimiques dangereux, temps de réponse court, bonne précision, bon rapport coût/efficacité.

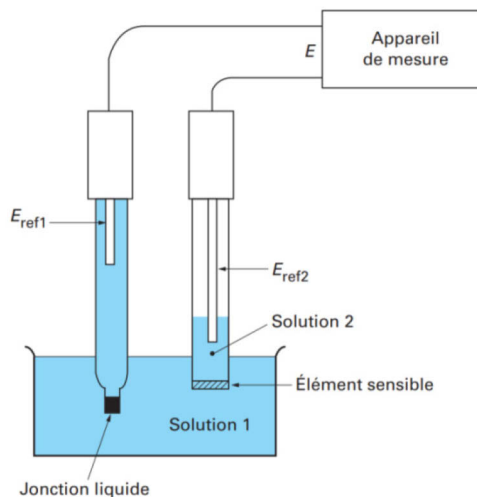


Figure 15: Montage à deux électrodes utilisé pour la détermination de l'activité Ionique d'une espèce par une électrode spécifique. Tiré de [74]

Les capteurs potentiométriques font l'objet de très nombreux efforts de recherche scientifiques et industriels visant notamment la miniaturisation des électrodes, l'amélioration de leur sélectivité et de la dérive temporelle du signal mesuré. Les travaux de P. Bergveld au début des années 1970 ont donné naissance à un deuxième type de capteurs potentiométriques résultant de l'intégration de membranes ionosensibles sur un composant électronique issu des procédés de la microélectronique : l'ion Sensitive Field Effect Transistor (ISFET) [75]. Par rapport aux ISE conventionnelles, l'ISFET présente de nombreux avantages : petites dimensions, « tout solide », faible impédance de sortie réduisant les interférences des champs électromagnétiques externes, fabrication en masse et à faible coût, possibilité d'intégrer des circuits de compensation et de traitement de données dans la même puce avec le capteur et un court temps de réponse [76].

Le développement de capteurs électrochimiques pour la détection du pH, de l'ammonium et des nitrates des sols est l'objectif des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit. Une description beaucoup plus exhaustive de ces capteurs et de leur application à l'étude des sols sera donc proposée dans le prochain chapitre de ce manuscrit.

- **Chromatographie à échange d'ions** (« Chromatographie ionique », nitrate et ammonium) :

Le principe général des techniques de chromatographie est la séparation d'espèces dissoutes entre une phase mobile et une phase stationnaire. La phase mobile peut être un gaz, un liquide ou un fluide supercritique. La phase stationnaire peut être un liquide, ou plus couramment, un solide. Les méthodes de chromatographie sont classifiées en deux principales familles selon l'état physique de la phase mobile : chromatographie en phase gazeuse (GC) et chromatographie en phase liquide (LC).

La chromatographie à échange d'ions (IC) est une forme de LC. Une colonne dont la partie interne est recouverte d'une résine échangeuse d'ions (phase stationnaire) est traversée par un liquide sous pression contenant les ions à analyser (phase mobile ou éluant). La résine se présente le plus souvent sous forme de billes de polymères dotées sur leur surface de groupes fonctionnels chargés. La séparation des ions de l'analyte provient du fait que la force d'attraction électrostatique exercée par ces groupes fonctionnels diffère pour chaque ion [77]. Plus

l'attraction entre ion cible et contre-ion de la phase stationnaire est forte, plus le temps de rétention sera long avant le passage devant le détecteur situé en sortie de colonne. La diminution de la granulométrie à volume constant offre une meilleure surface d'échange et engendre donc une augmentation de la résolution et du seuil de détection de cette technique. Le temps de rétention dépend également du débit, de la température et de la capacité de l'éluant à désorber les ions fixés sur la résine. Les moyens de détections les plus couramment employés sont la conductimétrie et la spectrophotométrie [78].

Cette méthode est bien adaptée à la mesure des ions ammonium et nitrate en solutions d'extraits de sol [79]. La détermination de la concentration en ammonium par IC peut subir l'interférence des ions sodium Na^+ qui se manifeste par un recouvrement des deux pics correspondants sur le chromatogramme. Toutefois, il est possible de réduire l'imprécision de la mesure. Par exemple, en jouant sur certains paramètres comme la concentration de l'éluant ou le débit, le temps de rétention augmente et une meilleure résolution des pics est obtenue [78] [80].

Les principaux avantages de l'IC sont sa courte durée d'analyse, la possibilité de travailler avec de petits volumes d'échantillons, sa bonne sensibilité et le fait que, contrairement aux méthodes colorimétriques, l'on puisse simultanément déterminer la composition d'un échantillon contenant une multitude d'espèces ioniques inconnues [80].

iv. Avantages/inconvénients de l'échantillonnage du sol

L'analyse des échantillons de sol par les laboratoires agréés bénéficie de la précision et des limites de détection maximales offertes par les techniques analytiques que nous venons de décrire. De plus, les services généralement proposés par ces laboratoires dépassent largement la simple détermination de l'azote minéral. Les agriculteurs peuvent obtenir de très nombreuses informations sur leur sol : granulométrie, concentration en oligo-éléments et éléments majeurs, composition du complexe argilo-humique, ou encore pH. Cependant, l'échantillonnage du sol est une procédure fastidieuse et extrêmement chronophage. Si l'agriculteur souhaite réellement prendre en compte la variabilité temporelle et locale du sol, l'échantillonnage doit être répété régulièrement et en de nombreux endroits de la parcelle. En pratique, le coût financier et temporel n'est alors plus négligeable, d'autant plus que les délais de traitement des échantillons par les laboratoires ne permettent pas une gestion de la parcelle à l'échelle hebdomadaire.

La gestion des intrants agricoles nécessite donc le développement de capteurs bon marché utilisables directement sur site et permettant d'effectuer des mesures le plus fréquemment possible, avec le minimum de maintenance, des protocoles simples et des résultats en temps-réel. En revanche, les avantages d'une mesure à bas coût directement sur site s'obtiendront nécessairement au détriment d'une perte de précision vis-à-vis des méthodes conventionnelles. Le développement de ces capteurs rentre dans le cadre de l'agriculture de précision qui est l'objet de la prochaine partie. Nous verrons également dans quelle mesure certaines techniques de laboratoire sont transférables pour des analyses sur le terrain.

b. Méthodologie d'analyse sur site : agriculture de précision, vers une agriculture raisonnée ?

i. Définition et objectifs de l'agriculture de précision

Le terme agriculture de précision regroupe l'ensemble des méthodes et technologies permettant une gestion « sur-mesure » des intrants agricoles par la prise en compte des variabilités locales et temporelles de la parcelle. Cette nouvelle approche de l'agriculture est

apparue dans les années 1980 aux Etats-Unis. En bref, l'objectif de l'agriculture de précision est d'aider les agriculteurs à épandre le bon intrant, dans la bonne quantité, au bon endroit, au bon moment et de la bonne manière [81]. Pour y arriver, elle s'appuie sur l'utilisation des technologies de l'information pour recueillir des données sur les différences spatiales et temporelles du champ. Parmi elles, on trouvera notamment :

- des systèmes de mesure de la position (GPS) afin de localiser la provenance d'une information,
- des systèmes d'information géographique (SIG) pour collecter, traiter, analyser, et gérer les données spatiales,
- des capteurs communicants pour la mesure de paramètres propres aux plantes ou au sol,
- des systèmes d'épandage à débit variable afin d'adapter la dose d'intrant en temps réel en fonction des variations locales du terrain.

Les systèmes de l'agriculture de précision reposent sur une approche en plusieurs étapes. La première consiste à évaluer la variabilité des sols (pH, teneur en matière organique, texture, humidité, ensoleillement...) ou de la culture. Une cartographie de la parcelle est souvent générée pour représenter ces variations. Lors de la deuxième étape, la prise en compte de la variabilité des données aboutit à une prise de décision concernant le traitement à appliquer localement à la culture (fertilisation, irrigation, épandage de pesticides...). Enfin, en dernière étape, le système doit permettre d'évaluer l'efficacité de la procédure appliquée. Cette efficacité peut se traduire, par exemple, en termes de rendement agricole, de marge économique ou encore d'empreinte écologique obtenus grâce à l'optimisation de la quantité d'intrants. De nombreux challenges d'ordres socio-économiques, agronomiques et technologiques peuvent encore freiner l'utilisation de l'agriculture de précision. Son implémentation génère des coûts supplémentaires et nécessite de nouvelles compétences [82].

Dans le cas spécifique du pilotage de la fertilisation azotée, l'objectif de l'agriculture de précision est d'augmenter significativement l'efficacité de l'utilisation de l'azote (NUE) afin de minimiser les problèmes environnementaux tout en assurant de bons rendements. Le succès de cette démarche dépend fortement de la capacité à prédire les processus qui régulent la disponibilité de l'azote dans le sol (minéralisation et immobilisation par les micro-organismes) et les besoins en azote des plantes [49].

L'élaboration de règles de décision concernant la fertilisation azotée se base sur deux méthodes possibles : l'analyse du statut azoté de la plante ou l'analyse du sol. Aujourd'hui c'est majoritairement via l'analyse de la plante que les outils d'aide à la décision (OAD) sont conçus. Cela est probablement dû à la plus grande fiabilité et disponibilité sur le marché de capteurs optiques dédiés à l'analyse des tissus des plantes. Plutôt que d'évaluer la disponibilité directe de l'azote du sol pour les plantes, ces techniques interrogent des propriétés physiques reliées à leur métabolisme azoté. L'analyse porte sur un autre marqueur du cycle de l'azote du système sol-plante mais l'objectif est bien le même : augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote (NUE) par une meilleure gestion de la fertilisation. Les prochains paragraphes sont ainsi dédiés à un tour d'horizon des différentes méthodologies d'analyse sur site utilisées en agriculture pour déterminer le statut azoté des plantes ou la concentration d'azote minéral du sol.

ii. Techniques d'analyse sur site du statut azoté de la plante

▪ Teneur de la feuille en chlorophylle par mesure de transmittance optique :

Une première stratégie visant à l'amélioration du NUE consiste à suivre le statut azoté de la culture à travers la concentration en chlorophylle des feuilles. Ce pigment situé dans les chloroplastes des cellules végétales est capable de transformer l'énergie du soleil en énergie chimique grâce au processus de photosynthèse [83]. La chlorophylle existe sous différentes structures chimiques dont les principales, la chlorophylle a $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ et la chlorophylle b $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$, possèdent toutes deux 4 atomes d'azote. Il a été montré que, dans les feuilles, la concentration en chlorophylle est positivement corrélée à la concentration en azote [84]. Pour cette raison, de nombreuses études mettent en avant l'intérêt de la mesure de la teneur en chlorophylle comme indicateur du statut azoté des plantes et de leurs besoins en azote [85] [86] [87] [88].

Ainsi, à partir des années 1980, plusieurs sociétés ont travaillé au développement de spectrophotomètres portatifs permettant la mesure de la teneur en chlorophylle des plantes. Le plus connu est le SPAD 502 fabriqué aujourd'hui par Konica Minolta (Japon). L'appareil se présente sous forme d'une pince mesurant la transmittance de deux longueurs d'onde à travers la feuille : le rouge (650 nm) absorbé par la chlorophylle, et l'infrarouge (940 nm) qui n'est pas absorbé (Figure 16a) [82]. Parmi les instruments au fonctionnement similaire, le N-Tester commercialisé par Yara International (Norvège) fonctionne lui aux longueurs d'onde 650nm et 960nm. Une comparaison des deux transmittances est effectuée par le capteur qui renvoie à l'utilisateur une valeur numérique M calculée comme suit :

$$M = k \log_{10} \frac{I_{0(650)} [I_{0(940)} - (I_A + I_R)_{940}]}{I_{0(940)} [I_{0(650)} - (I_A + I_R)_{650}]} \quad (7)$$

Où $I_{0(\lambda)}$ est l'intensité de la lumière incidente émise à la longueur d'onde λ ; $I_{A\lambda}$ et $I_{R\lambda}$ sont les intensités lumineuses correspondant respectivement aux flux absorbés et réfléchis à la longueur d'onde λ ; k est une constante définie par le constructeur [89].

Il a été montré que la valeur renvoyée par le SPAD est bien corrélée à la concentration surfacique en chlorophylle des feuilles de blé. Cette corrélation s'exprime à travers une relation curvilinéaire (Figure 16b) [89]. Cependant, étant donné que des facteurs génétiques et environnementaux (ensoleillement, humidité, carence du sol en autre nutriments) influencent la couleur verte des feuilles, une normalisation des données du SPAD en fonction des variétés de blé, des stades de croissance, de l'emplacement des cultures est impérative pour pouvoir être exploitée correctement dans le cadre du pilotage de la fertilisation [84]. La méthode présente pour avantages d'être simple et non-destructive mais ne permet de caractériser qu'une feuille après l'autre, de manière manuelle. Cela rend compliquée l'évaluation de la variabilité spatiale du blé à l'échelle de la parcelle entière.

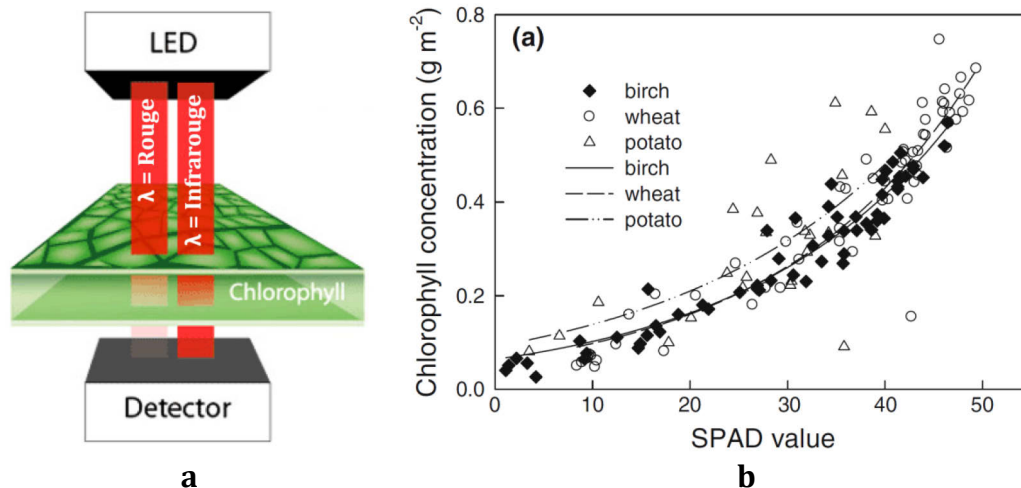


Figure 16 : (a), principe de fonctionnement des pinces optiques permettant la mesure de teneur en chlorophylle des plantes. Adapté de [90]. (b), relation liant la concentration surfacique d'une feuille (bouleau, blé et pomme de terre) en chlorophylle à la valeur numérique renvoyée par le SPAD.
Tiré de [89]

- **Mesure de fluorescence de la chlorophylle :**

Une autre approche de mesure de la teneur en chlorophylle des feuilles est basée sur la mesure de fluorescence. L'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle peut subir trois mécanismes : elle peut être utilisée comme moteur de la photosynthèse (photochimie), elle peut être dissipée sous forme de chaleur, ou être réémise à une plus grande longueur d'onde (fluorescence) (Figure 17). La fluorescence de la chlorophylle, dans l'infrarouge proche (NIR) ne représente que 1 à 2% de ces mécanismes mais elle est facilement mesurable [91].

La société FORCE-A (France) a mis au point un appareil, le Dualex, qui mesure la fluorescence chlorophyllienne pour déterminer la teneur en chlorophylle des feuilles, ainsi qu'en flavonols et anthocyanes de l'épiderme foliaire. Flavonols et anthocyanes sont deux types de polyphénols, des composés carbonés stockés au niveau des vacuoles des feuilles. Ils sont produits lorsque la plante souffre d'une carence en azote et peuvent donc servir d'indicateur du statut azoté de la plante [92]. Le Dualex dispose de deux longueurs d'onde d'émission spécifiques de l'absorption par les flavonols et les anthocyanes à respectivement 375nm (UV-A) et dans le vert. L'appareil émet également une troisième longueur d'onde, à 650nm (rouge), qui est uniquement absorbée par la chlorophylle. Il est muni d'un détecteur permettant la mesure de fluorescence chlorophyllienne dans l'infrarouge. Une excitation à une longueur d'onde spécifique d'un type de polyphénols sera d'autant plus absorbée que ce polyphénol est présent en concentration importante dans l'épiderme (Figure 18a). Les rayons non-absorbés par les polyphénols vont générer la fluorescence chlorophyllienne au niveau du mésophylle. Une seconde excitation dans le rouge ne sera pas absorbée par les polyphénols et générera plus de fluorescence chlorophyllienne. Finalement, en comparant les deux niveaux de fluorescence mesurés par le détecteur, il est possible de remonter à la teneur en polyphénols. Contrairement aux capteurs de chlorophylle fonctionnant par mesure de transmittance, la réponse du capteur à la teneur en chlorophylle des feuilles est linéaire (Figure 18b) [93].

Par rapport à la méthode précédente, le Dualex présente donc l'avantage d'apporter de manière immédiate et non destructive une information supplémentaire : la teneur en polyphénols, autre marqueur du statut azoté de la plante. Cependant, cette technique ne permettra pas non plus une évaluation rapide de l'ensemble de la culture car elle est limitée par le caractère manuel de l'appareil.

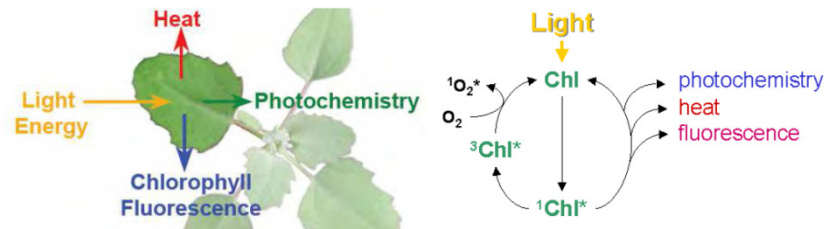


Figure 17 : Origine de la fluorescence de la chlorophylle des feuilles. Tiré de [94]

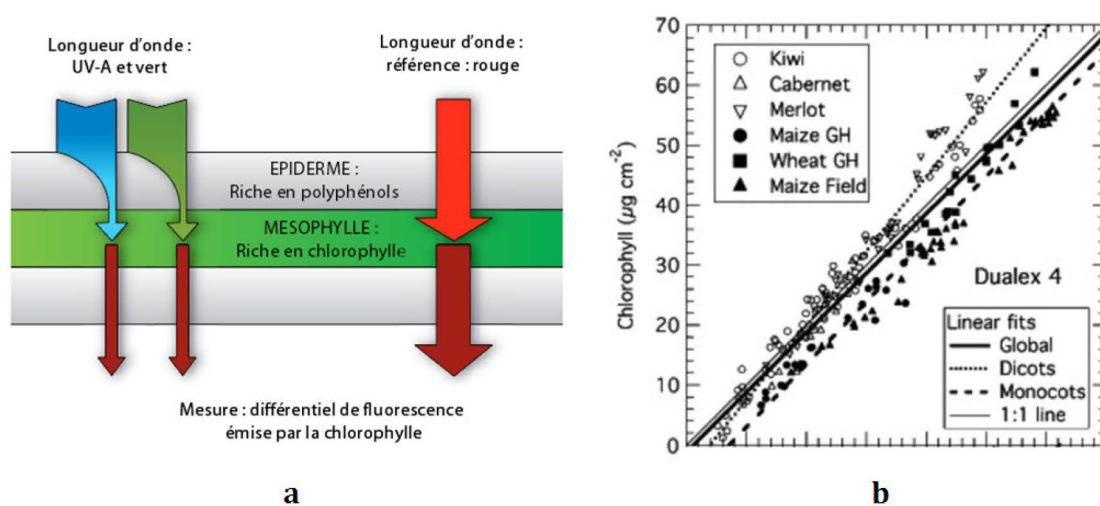


Figure 18 : (a), mécanismes de fluorescence de la chlorophylle exploitée par le Dualex pour déterminer les teneurs en polyphénols et chlorophylle. Tiré de [95]. (b), réponse du Dualex aux variations de concentration surfacique de Chlorophylle. Tiré de [93].



Figure 19: Capteurs de chlorophylle. De gauche à droite : Dualex 4 Scientific (FORCE-A, France), SPAD-502 (Konica Minolta, Japon) et le CCM-200 (Opti-Sciences, Etats-Unis). Tiré de [93]

▪ Mesure des indices spectraux par télédétection

La principale limitation des méthodes par transmittance optique à travers une feuille est qu'elles ne permettent pas de sonder rapidement un grand nombre de plantes sur la parcelle. Pour pallier à ça, des appareils ont été conçus sur le principe d'une mesure de réflectance. La réflectance est une grandeur sans dimension correspondant au rapport d'intensité entre le rayonnement réfléchi par une surface et celle du rayonnement incident [96]. Ces capteurs de réflectance collectent les radiations électromagnétiques réfléchies par la canopée. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet de sonder simultanément et à distance plusieurs feuilles, ce qui représente un gain de temps considérable par rapport aux techniques par transmittance. Les mesures faites avec les premiers modèles variaient avec les conditions d'ensoleillement, la position angulaire du soleil et l'angle de visée de l'appareil par rapport à la canopée [97]. Dans certains cas, ce problème peut être corrigé grâce à des algorithmes et à des nouveaux capteurs actifs émettant leurs propres lumières pour s'affranchir des conditions climatiques.

Les données spectrales enregistrées sont converties en indices de végétation (VI) exploitables pour l'agronome. Les VI découlent de calculs simples à partir des valeurs de réflectances à différentes longueurs d'onde. Le plus répandu est l'indice de végétation par différence normalisé (NDVI), construit à partir des longueurs d'onde rouge (670nm) et proche infrarouge (780nm) :

$$NDVI = \frac{\rho_{NIR} - \rho_R}{\rho_{NIR} + \rho_R} \quad (8)$$

Où ρ_{NIR} est la réflectance dans le proche infrarouge et ρ_R est la réflectance dans le rouge [82].

La végétation verte a un NDVI supérieur à 0,5 tandis que la végétation morte a en général un NDVI inférieur à 0,3 [98]. Par conséquent, l'analyse de réflectance spectrale de la canopée permet une mesure indirecte de la teneur en chlorophylle de la culture. Elle offre une évaluation rapide du statut azoté du blé ainsi que du stress hydrique [82]. Ce stress hydrique est néanmoins source de confusion lorsque l'on tente d'établir des prédictions entre les indices spectraux et la teneur en azote du blé. Ce problème pourrait être surmonté grâce à l'imagerie hyperspectrale. En effet, les capteurs hyperspectraux acquièrent des images dans un grand nombre de bandes spectrales étroites (de l'ordre de 10 nm) par opposition aux imageurs multispectraux qui sont large bande. Ces bandes étroites peuvent mesurer les pics d'absorption spécifiques des pigments végétaux et, par conséquent, fournir des informations liées à la santé végétale (teneur en eau, en azote et en chlorophylle) de manière plus précises que les capteurs large bande [82].

Les résolutions spatiales et temporelles dépendent bien sûr du capteur et du mode de transport sur lequel ils sont embarqués (vecteur) : à pieds, en tracteur, en drone, en avion, ou en satellite. Par exemple, les modèles N-Sensor ALS (Yara International, Norvège) et le GreenSeeker (Trimble, Etats-Unis) sont embarqués à bord d'un tracteur qui adapte en temps réel la quantité de fertilisant épandues grâce aux données collectées (Figure 21a). La société Airinov, issue d'une collaboration avec l'INRA, a elle développé un capteur de réflectance embarqué sur drone. Celui-ci enregistre les gammes spectrales rouge, vert, proche infrarouge et infrarouge qui permettent d'accéder à des informations agronomiques telles que le taux de chlorophylle, la biomasse, la densité foliaire ou encore le stress hydrique. Un luxmètre est également embarqué afin de

mesurer l'intensité, la couleur et l'angle d'incidence de la lumière du soleil et ainsi corriger les données de réflectance. Les images jouissent d'une résolution spatiale impressionnante de 5-30 cm/pixel (Figure 21b). Même si coûteuse, la télédétection aéroportée a longtemps été préférée pour sa bonne résolution spatiale bien adaptée au suivi de la variabilité des cultures à l'échelle d'un champ, contrairement aux capteurs embarqués sur les satellites qui ne pouvaient traiter que des surfaces beaucoup plus grandes. La situation a changé aujourd'hui suite aux nombreux lancements de satellites d'observation embarquant des capteurs multispectraux ayant une résolution spatiale inférieure à 5m [99]. C'est par exemple le cas des satellites FORMOSAT (Organisation spatiale nationale de Taiwan) ou WorldView-4 (DigitalGlobe). Des services sont proposés aux agriculteurs pour exploiter les données issues de nombreux satellites d'observation et générer des conseils de fertilisation tenant compte des variabilités mesurées. C'est le cas de FARMSTAR, projet issu de la collaboration entre Airbus, Arvalis et Terres Inovia. Malgré ses avantages, l'imagerie hyperspectrale est encore peu développée mais la situation devrait évoluer rapidement avec le fort développement de l'imagerie par drone. Le programme spatial allemand Environmental Mapping and Analysis Program (EnMAP) prévoit également le lancement en 2019 d'un satellite embarquant un capteur hyperspectral. Celui-ci possédera une résolution spatiale de 30m qui peut être intéressante pour les grandes cultures [100].

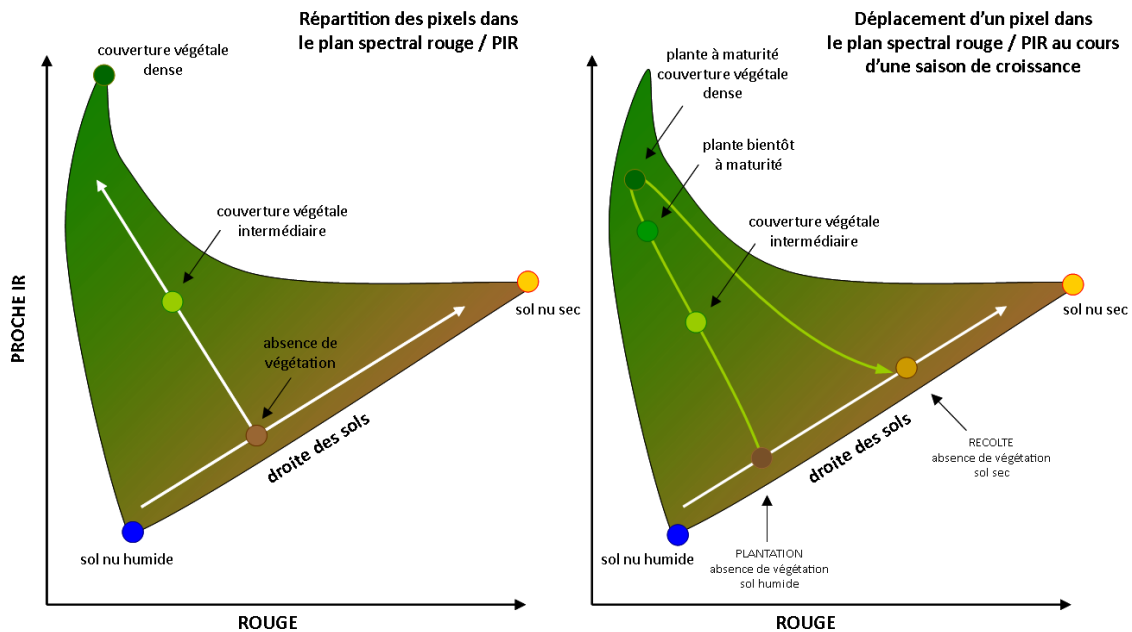


Figure 20 : Répartition spectrale des réflectance dans le rouge et dans le proche infrarouge. Tiré de [96]



Figure 21 : (a), le Yara N-Sensor embarqué à bord d'un tracteur pour un pilotage en temps-réel de la fertilisation. Tiré de [101]. (b), lancement du drone développé par Airinov sur une parcelle. Tiré de [102]

iii. Techniques d'analyse sur site de l'azote du sol

▪ **Bandelettes de test** (nitrate) :

La plupart des produits commercialisés de suivi des nitrates pour une utilisation sur le terrain prennent la forme de bandelettes de test jetables. Similairement au célèbre papier pH, ces bandelettes reposent sur l'évaluation d'un changement de couleur associé à l'introduction de l'échantillon contenant des nitrates. Dans la plupart des cas, ce changement de couleur est réalisé par une variante de la méthode standard de Griess, présentée précédemment, où la colonne de réduction du cadmium est intégrée à la bandelette (Figure 22). Outre leur prix extrêmement abordable, les avantages du système de bandes sont (i) qu'il est « sans réactif » du point de vue de l'utilisateur et donc facile à stocker et manipuler, et (ii) qu'il offre une estimation rapide (<2min) de la teneur en nitrate [71]. En revanche, cette technique n'est pas vraiment automatisable ni utilisable directement dans le sol car elle nécessite de réaliser une dilution du sol dans de l'eau.

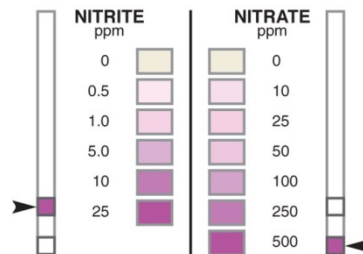


Figure 22 : Nuancier de couleur utilisé après coloration de la bandelette de test pour identifier la concentration de l'échantillon en nitrate. Tiré de [103]

▪ **Spectroscopie proche infra-rouge** (nitrate) :

Si, comme présenté précédemment, l'analyse de l'azote de la plante est aujourd'hui possible grâce à une multitude de capteurs commerciaux, l'accès aux teneurs en nutriments du sol via la mesure par capteurs optiques demeure à un stade de maturité technologique moins avancé. Les recherches se basent le plus souvent sur l'analyse de la réflectance du sol dans le domaine du proche infrarouge (NIR) correspondant aux longueurs d'ondes situées entre 750nm et 2600nm. Deux atomes partageant une liaison moléculaire ont une caractéristique de résonance qui dépend de leur masse et de la liaison qui les lie. On les excite en proche-infrarouge et on mesure la réflexion diffuse issue de l'échantillon dont le spectre renseigne sur les régions d'absorption correspondant aux liaisons moléculaires rencontrées [70]. En l'occurrence, la polarité de la molécule de nitrate NO_3^- donne lieu à quatre modes de vibration dans le domaine infrarouge dont certains harmoniques se manifestent dans le domaine du proche infrarouge [104]. L'analyse spectroscopique de l'azote minéral du sol se fonde donc sur la recherche de cette signature spectrale des nitrates. De nombreuses études mettent en avant de très bonnes corrélations ($R^2 > 0,9$) entre les méthodes standards de détermination de la teneur en nitrate du sol et les mesures de réflectance NIR couplées à des techniques de traitement de signal [104], [105], [106].

Les principaux attraits pour cette méthode proviennent du fait qu'elle est rapide, non-destructive et qu'elle peut être réalisée sur site de manière *in situ*, sans étape de prélèvements de sol [107]. Cependant, un inconvénient mis en avant par la plupart des études est la forte influence du type de sol sur les résultats, nécessitant une calibration préalable pour chaque

parcelle. De plus, de nombreuses molécules ont une signature spectrale pouvant interférer avec la détection des nitrates. C'est par exemple le cas des ions carbonate CO_3^{2-} .

- **Electrophorèse capillaire** (nitrate et ammonium) :

L'électrophorèse capillaire (CE) est une autre technique de séparation d'espèces ioniques dont le principe est proche de celui de la chromatographie. Ici, les ions contenus dans un électrolyte parcourent un capillaire sous l'effet d'un champ électrique appliqué à ses deux extrémités. La vitesse de migration des ions est proportionnelle à leur charge et inversement proportionnelle à leur taille. Les types d'ions sont ainsi séparés au cours de leur migration et sont détectés au cours du temps à proximité de la sortie du capillaire (Figure 23). Similairement à la chromatographie, plusieurs modes de détection sont possibles : spectroscopie visible-UV, fluorescence ou encore électroanalyse (ampérométrie, potentiométrie ou conductimétrie).

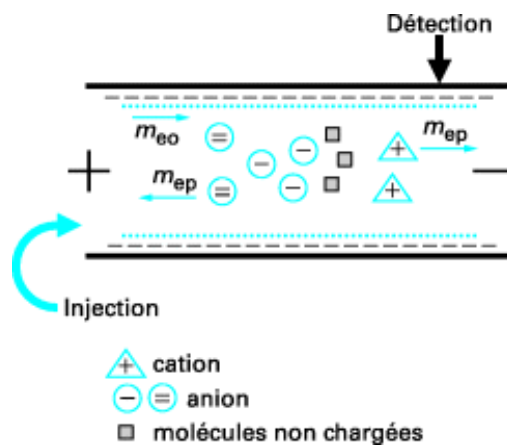


Figure 23 : Principe de séparation en électrophorèse capillaire. Tiré de [108]

La CE est bien adaptée à la portabilité pour de la mesure sur site car seuls un capillaire de séparation, une alimentation haute tension et de petits volumes de solutions tampons sont nécessaires pour effectuer la séparation. Ce n'est pas le cas de la chromatographie liquide qui nécessite des pompes à haute pression difficilement déplaçables en dehors d'un laboratoire [109]. De plus, l'intégration du détecteur peut être effectuée relativement facilement d'un point de vue mécanique et électronique en utilisant une détection par conductimétrie sans contact (C⁴D) [110].

Ainsi, dans le cadre du projet européen OPTIFERT, Smolka *et al.* ont développé une puce microfluidique de CE pour la détermination sur site des concentrations d'ions nitrate, phosphate et potassium dans des extraits de sol. Cette méthode ne permet donc pas de s'affranchir des étapes de prélèvements et d'extraction des ions mais elle offre aux agriculteurs la possibilité d'obtenir des résultats d'analyse précis, à faible coût et sans délais. Ce projet a donné naissance à un produit, le *Metos NPK*, développé par la société Pessl Instruments (Autriche) (Figure 24).

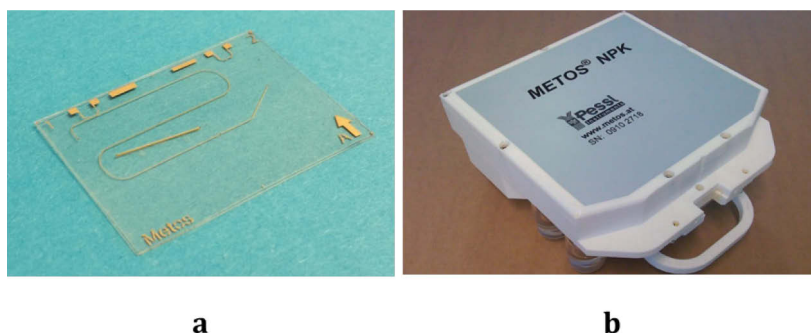


Figure 24 : (a), la puce microfluidique d'électrophorèse capillaire développée dans le cadre du projet OPTIFERT. (b), l'interface de contrôle de la puce faisant l'intermédiaire avec un ordinateur pour la récupération et le traitement des données. Tiré de [111]

c. Systèmes de détection des nutriments du sol sur site basés sur des capteurs électrochimiques à membrane ionosensible

A partir du début des années 1990 et jusqu'à aujourd'hui, plusieurs équipes de recherche ont exploré l'approche consistant à mesurer la teneur en nutriments du sol par des techniques de détection électrochimique, essentiellement en potentiométrie (ISE et ISFET). Cette méthode présente de nombreux avantages pouvant justifier son utilisation pour l'analyse sur site du sol : faible coût, simplicité, portabilité, rapidité de la réponse, capacité à répondre directement à une large gamme de concentrations. Les prochains paragraphes dresseront donc un court historique des principales études scientifiques dédiés à ces capteurs utilisés pour l'analyse des nutriments du sol sur site, et notamment des ions nitrates. Les principes fondamentaux de ces techniques seront détaillés au prochain chapitre.

L'équipe d'Adamchuk figure parmi les principaux contributeurs du développement de systèmes de détection potentiométriques dit « on-the-go », c'est-à-dire embarqué sur un véhicule en déplacement permettant une analyse du sol en temps réel [112]. Ses travaux ont donné naissance à un produit, le *Soil pH Manager*, aujourd'hui commercialisé par la société Veris Technologies basée au Kansas aux Etats-Unis (Figure 25). Ce système prend la forme d'une remorque équipé d'un outil de forage du sol déplacé par un vérin hydraulique. L'échantillon de sol prélevé est mis automatiquement en contact avec l'électrode de mesure à l'aide d'un support d'électrode à ressort assurant une pression de contact constante. Le rinçage de l'électrode est ensuite effectué automatiquement avec de l'eau distillée. L'approche développée par Adamchuk *et al.* repose donc sur une mesure du sol directe contrairement aux travaux proposés par d'autres chercheurs basés sur une analyse d'une solution d'extrait de sol. Cette technique a notamment été appliquée à l'étude de la variabilité du pH, du potassium, des nitrates et du sodium du sol en utilisant des ISE commerciales et en comparant les résultats aux méthodes standard de laboratoire (réduction cadmium-cuivre dans les cas des nitrates) [113]. Les coefficients de corrélation linéaire obtenus (R^2) mettent en avant de fortes disparités selon le type d'ion analysé. La méthode se montre extrêmement prometteuse pour la détermination du pH du sol ($R^2 > 0,93$) mais décroît fortement pour la détection des ions potassium ($0,61 < R^2 < 0,62$), des nitrates ($0,41 < R^2 < 0,51$) et du sodium ($R^2 = 0,11$). Selon les auteurs, ce déclin s'expliquerait plus par la différence du niveau de variabilité des propriétés du sol entre les échantillons utilisés dans l'expérience que par des erreurs propres aux capacités de détection des électrodes. La question de la sélectivité des électrodes n'est toutefois pas soulevée par les auteurs.



Figure 25 : Le *soil pH Manager*, produit commercialisé par Veris Technologies et permettant de cartographier la variabilité du pH sur une parcelle. Tiré de [114]

De 1995 à 2010, Adsett *et al.* ont développé un système de mesure temps-réel et automatisé des nitrates du sol embarqué sur un tracteur (technique « on-the-go »)(Figure 26a) [115]. Alors que le véhicule est en mouvement, ce dispositif électromécanique collecte automatiquement un échantillon de sol à la profondeur [0-15] cm, le mélange à de l'eau et l'analyse directement à l'aide d'une ISE commerciale pendant une durée de seulement quelques secondes. Un système de géoréférencement (GPS) sur le tracteur permet d'associer une information de localisation à chaque échantillon prélevé et de générer *in fine* une cartographie de la teneur en nitrate de la parcelle. Le système a été testé sur champs de blé ou de carottes, et montre une excellente corrélation entre cette méthode et la méthode d'analyse standard des échantillons en laboratoire ($R^2 > 0.9$) (Figure 26b) [116]. A ce jour, ces études sont la meilleure démonstration de la capacité d'un système d'analyse automatique basé sur un capteur potentiométrique à évaluer la variabilité spatio-temporelle des ions NO_3^- du sol.

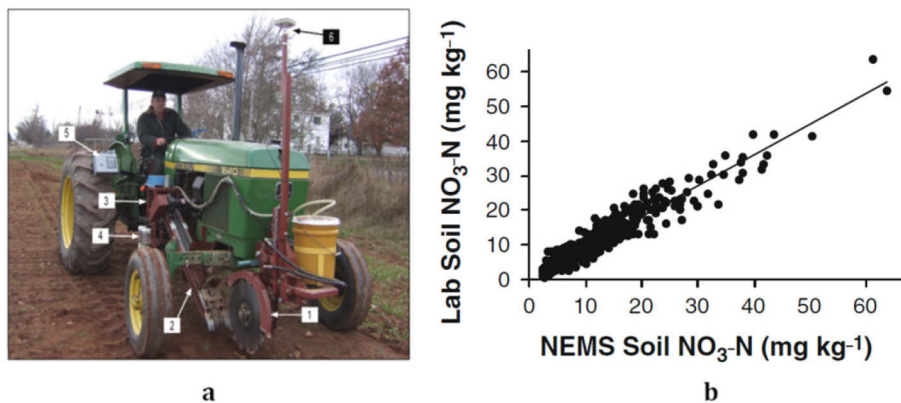


Figure 26 : (a) le système de cartographie des nitrates du sol et ses six sous-unités : (1) l'échantillonneur de sol ; (2) dosage et transport du sol ; extraction et mesure des nitrate ; (4) auto-étalonnage ; (5) contrôle ; (6) système de positionnement (GPS). (b) Corrélation entre la détermination des nitrates par le système on-the-go (NEMS) et par la méthode standard de laboratoire. Adapté de [116]

Au début des années 2000, Artigas *et al.* ont travaillé au développement de pH-, pCa-, pK- et pNO_3 -ISFET élaborés à partir de membrane ionosensibles en uréthane diacrylate et dédiés à l'analyse *in situ* de sols de type loam et tourbe [76]. Les auteurs utilisent un fil de cuivre en guise d'électrode de référence pour les mesures en sol. Alors que la fuite de l'électrolyte interne d'une électrode de référence conventionnelle utilisée dans le sol entraîne une dérive de la mesure, la formation d'un oxyde en surface du fil de cuivre donne lieu à un potentiel électrique relativement stable (dérive de 0,4 mV/h). La durée de vie du pNO_3 -ISFET chute de plus de 7

mois en solution aqueuse à 1 mois dans le sol. Néanmoins, l'étude montre que les microcapteurs « enterrés » sont capables de détecter une variation de concentration consécutive à un ajout de fertilisants.

Puis, en 2002, l'équipe d'Artigas ont proposé une sonde de mesure *in situ* des nitrates du sol composée d'un tube en PVC possédant trois ouvertures permettant d'intégrer les capteurs pour la détection aux profondeurs -15cm, -30cm et -60cm (Figure 27a) [117]. La sonde est équipée d'un module de transmission radio afin d'émettre les données de mesures à distance. Les capteurs intégrés à cette sonde sont des ISE « tout solide » fabriqués par sérigraphie. Une pâte faite d'un mélange de résine époxy et de graphite sert de transducteur à une membrane ionosensible en PVC disposée au-dessus. Des calibrations *in situ* du système sont réalisées dans des sols sablonneux et organiques (Figure 27b). Elles prouvent la capacité de cette sonde à détecter de manière directe des variations de concentrations en nitrate suite à l'apport d'une solution de sodium de nitrate (KNO_3) au sein du sol analysé. La comparaison des mesures avec une méthode standard de laboratoire (méthode de Kjeldahl) montre que les tendances mesurées par ces deux techniques sont similaires.

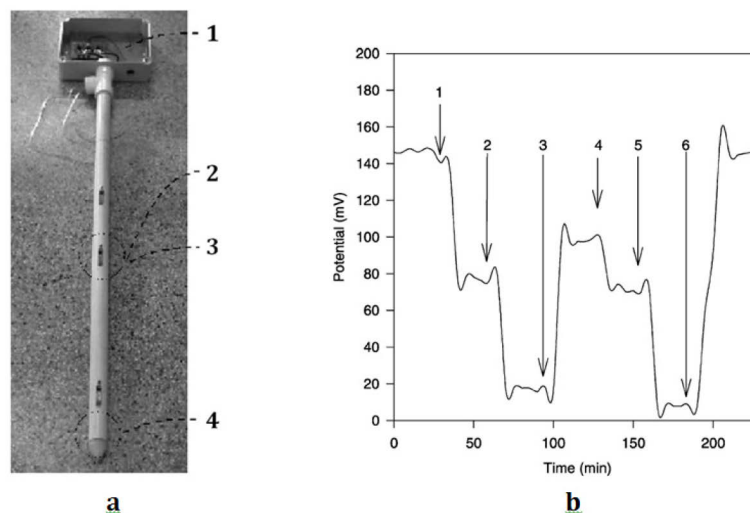


Figure 27 : (a), sonde nitrate développée par Artigas *et al.* (1) Instrumentation et émetteur de données radio ; (2) tube de calibration *in situ* ; (3) capteur nitrate et son électrode de référence associée ; (4) circuit suiveur de courant. (b), Courbe de calibration du capteur -15cm réalisée dans un sol sablonneux. La courbe montre les variations de potentiel suite à l'addition de différentes solutions. (1) 0.001M nitrate de sodium ; (2) 0.01M nitrate de sodium ; (3) eau ; (4) 0.001M nitrate de sodium ; (5) 0.01M nitrate de sodium ; (6) rinçage à l'eau. Tiré de [117]

Simultanément, de 2000 à 2009, une équipe composée de Birrell, Hummel puis Kim étudiaient la conception d'un système d'analyse par injection en flux continu (FIA) utilisant un multi-capteur ISFET (Figure 28) [118]. Les auteurs ont d'abord réalisé de nombreuses membranes PVC sensibles aux ions nitrates et qualifié leurs propriétés de détection pour l'application à l'agriculture [119]. L'étude est une des premières à réellement s'intéresser à la sélectivité de ces membranes, notamment envers les ions chlorures qui sont susceptibles d'être présents en quantité importante dans le sol. Les auteurs se sont également penchés sur la capacité à extraire en solution les nutriments contenus dans un échantillon de sol et à les mesurer rapidement. Bien que les nitrates puissent être extraits à l'eau déionisée, ils ont regardé l'influence de différentes solutions d'extraction sur le pNO_3 -ISFET, ce qui permettrait d'extraire en une seule fois l'ensemble des ions à analyser par le multi-capteur [120]. Une solution d'extraction composée de sulfate de cuivre CuSO_4 à 0,01 M était le candidat idéal compte tenu

des propriétés de sélectivité du pNO_3 -ISFET. Le système ISFET/FIA réussit à déterminer la teneur en nitrates dans des solutions d'extrait de sol obtenues manuellement ($R^2=0.90$) en temps réel (environ 1,25s) avec un débit inférieur à 0,2 mL/s. Cependant, le prototype de système automatisé d'extraction des sols n'a pas toujours fourni d'échantillons analysables par le système ISFET/FIA, en raison de blocages dans le processus de filtration.

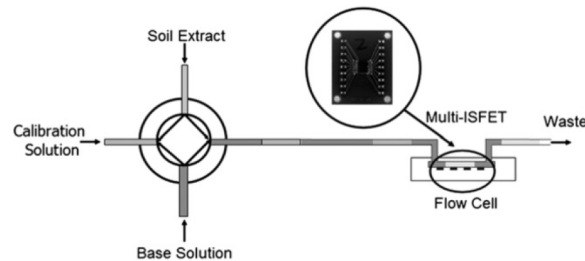


Figure 28 : Schéma d'un système FIA basé sur une analyse par un multi-capteur ISFET. Tiré de [107]

En 2012, Futagawa *et al.* ont fabriqué un composant en silicium intégrant plusieurs capteurs : un ISFET pour la mesure du pH, deux électrodes en platine pour la mesure de conductivité électrique ainsi qu'une diode p-n utilisée comme capteur de température (Figure 29b) [121]. Ce multi-capteur était destiné au suivi *in situ* des solutions nutritives contenues dans les pots de tomates cultivées en hydroponie. Dans cette étude, le milieu d'analyse n'est donc pas réellement du sol mais de la laine de roche. Il s'agit néanmoins d'un premier exemple d'un multi-capteur « tout solide » intégrant plusieurs fonctions destinées au suivi long terme de paramètres liés à la culture de plantes.

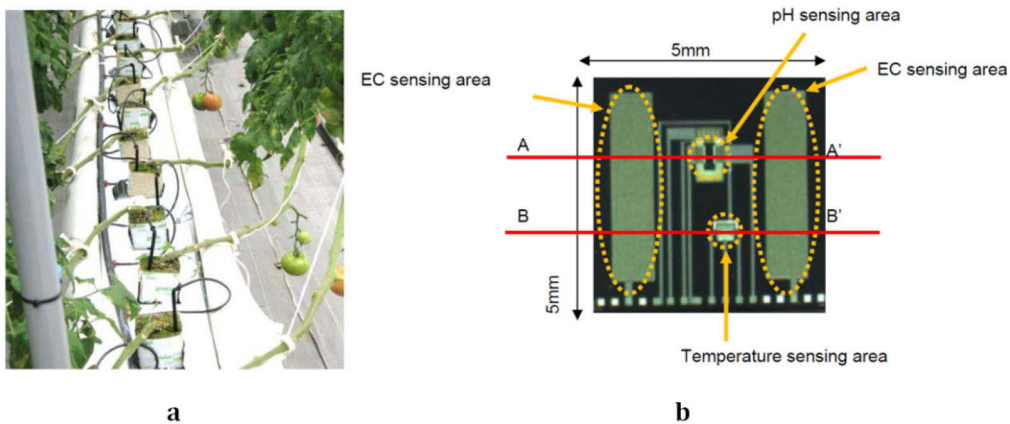


Figure 29 : (a), plants cultivés dans de la laine de roche. Chaque pot est équipé d'un capteur. (b), photo de la puce silicium intégrant un capteur pH, un capteur de température et un capteur de conductivité électrique. Tiré de [121]

Dans une étude de Tully et Weil datant de 2014, une analyse des nitrates est réalisée directement sur des champs de maïs au Kenya et en Tanzanie au moyen de lysimètres et d'une ISE commerciale [122]. Les lysimètres, fabriqués ici à partir de céramique microporeuse et de tube en PVC, permettent d'extraire la solution liquide du sol lorsqu'ils sont mis au vide. Une fois extraite, la solution est analysée avec l'ISE sur place et les résultats sont comparés à la méthode colorimétrique (réduction cadmium). La corrélation entre ces deux méthodes est excellente ($R^2=0,96$). Ainsi, les auteurs mettent en avant le fait que la détection potentiométrique sur site associée à un prélèvement par lysimètre permet d'évaluer la variabilité spatio-temporelle des nitrates du sol de manière précise et extrêmement simple. Même si cette méthode reste manuelle, elle génère un gain de temps et d'argent considérable pour les agriculteurs disposant

de parcelles éloignées des laboratoires d'analyse du sol car les capteurs sont peu coûteux et le temps de latence entre la collecte et l'analyse est réduit au maximum.

En 2014, Zhong *et al.* ont exploité une technique de potentiométrie à balayage, la *scanning ion-selective electrode technique* (SIET) afin d'étudier les variations des flux de nitrates et d'ammonium à travers les racines du blé [123]. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une méthode d'analyse du sol sur site, cette technique est d'une telle élégance scientifique qu'il semblait acceptable de l'intégrer à cette partie du manuscrit. Pour effectuer le suivi des flux racinaires de NH_4^+ et NO_3^- , les racines de blé sont d'abord excisées. Les gradients ioniques proches de la surface de la racine sont ensuite mesurés en déplaçant une microélectrode spécifique entre deux positions séparées d'une distance de 30 μm . Une si faible surface peut être sondée car les microélectrodes spécifiques ammonium et nitrate disposent d'une ouverture de seulement 2-4 μm . Cette technique permet d'identifier quelles zones de la racine sont le siège des principaux flux et comprendre a posteriori les mécanismes d'assimilation de l'azote par le blé dans le but d'optimiser la fertilisation.

En 2015-2016, Messadeq *et al.* ont développé un capteur nitrate constitué d'une membrane PVC disposant d'une très bonne sélectivité [124] [125]. Au contraire de tous les capteurs présentés dans cette partie, celui-ci fonctionne en impédancemétrie à une tension de 1V et à la fréquence de 1 kHz (Figure 30). C'est le premier capteur de ce type à être utilisé de manière *in situ* pour le suivi de la concentration des nitrates dans le cadre de la culture en pépinières forestières [126]. La sonde était insérée dans le milieu classiquement utilisé pour la culture de *Picea glauca*. Il s'agit d'un mélange de mousses et de vermiculites saturé en eau. Là encore, les résultats obtenus s'accordent bien avec la méthode colorimétrique standard de détermination de la teneur en nitrates (réduction cadmium). De plus, l'évaluation pendant un mois de la stabilité du capteur dans ce milieu de culture a montré des résultats prometteurs quant à l'application visée.

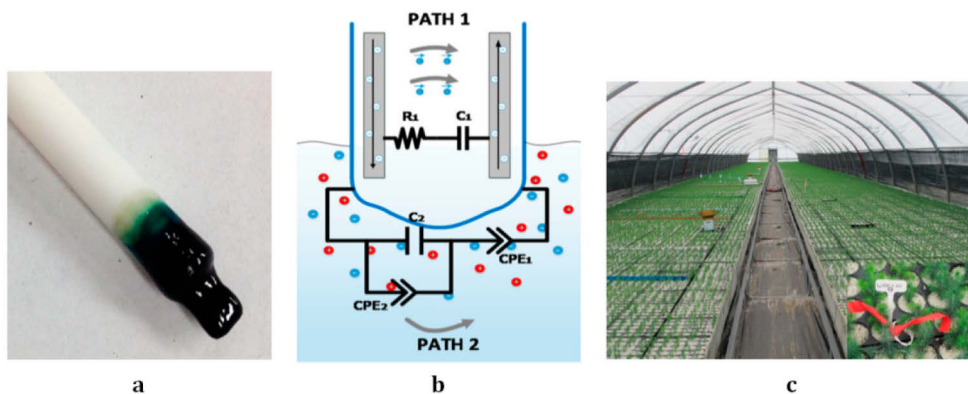


Figure 30 : (a), photo du capteur nitrate en membrane PVC. (b), schéma des principaux chemins de conduction ionique, l'un à travers la membrane polymérique ionosensible et l'autre au sein du milieu d'analyse. (c), production en pépinière de jeunes pousses de *Picea glauca*. Tiré de [126]

En 2017, Jiang *et al.* ont conçu un dispositif de suivi *in situ* et en temps réel de l'absorption des nutriments (nitrate et phosphore) par le riz cultivé en hydroponie [127]. L'approche est originale car le plant de riz est cultivé directement au sein d'une cavité microfluidique sur le dispositif qui intègre des ISE nitrate et dihydrogénophosphate (H_2PO_4^-) miniatures « tout solide » (Figure 31). La cavité contient la solution nutritive essentielle à la croissance de la plante. Au fur et à mesure que les racines absorbent les nutriments, les capteurs

enregistrent une diminution de la concentration d'ions nutritifs dans ce milieu. Cette diminution indique l'absorption des nutriments par la plante. Par conséquent, une surveillance en temps réel de l'efficacité de l'utilisation des nutriments peut être réalisée sur ce laboratoire sur puce. Ce suivi a été effectué avec succès pendant 15 jours dans le cadre de cette étude.

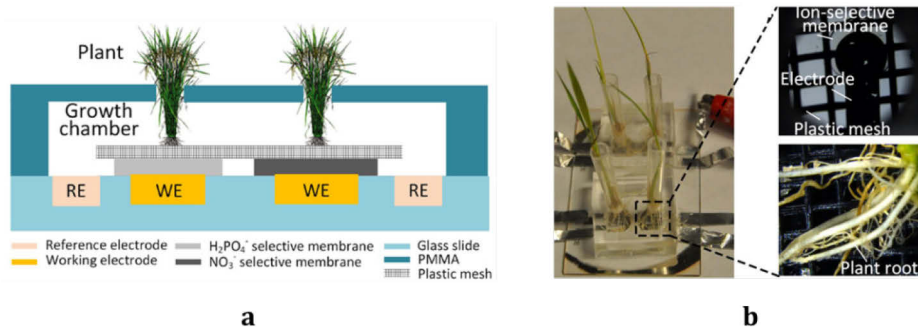


Figure 31 : (a), vue en coupe de la puce microfluidique intégrant la plante, une chambre de culture et les capteurs électrochimiques. (b), Photos générale du dispositif ainsi que de la chambre de culture et des capteurs intégrés. Tirés de [127].

d. Approches d'intégration système et positionnement du projet

Les technologies optiques de mesure de réflectance embarquée sont les plus matures mais elles reposent sur une mesure du couvert végétal et ne permettent par conséquent pas d'évaluer les reliquats azotés. Il est pourtant nécessaire de les prendre en compte lors de l'élaboration du bilan prévisionnel de l'azote. Parmi les autres systèmes d'analyse embarqués, les systèmes FIA tels que celui développé par Birrell et al. [120] présentent également le gros avantage de pouvoir sonder de manière automatique la totalité de l'azote du sol et pas seulement les espèces dissoutes dans la solution du sol, grâce à l'utilisation de solutions d'extraction. De plus, ce type de système pourra évoluer aisément vers l'analyse d'un plus grand nombre d'espèces ioniques à mesure que de nouveaux capteurs potentiométriques deviendront matures. Néanmoins, le manque de fiabilité mécanique de ce genre de systèmes est encore problématique.

Parmi tous les systèmes d'analyse automatique présentés dans ce chapitre, on peut distinguer essentiellement deux approches pour la mesure de l'azote sur site :

- Mesure par un capteur en déplacement
- Mesure par un réseau de capteurs autonomes communicants fixes

L'approche retenue lors de la conception d'un système aura un impact sur la résolution temporelle et spatiale de la grandeur mesurée ainsi que l'autonomie de la mesure du point de vue de l'utilisateur. Dans le cas des capteurs en déplacement, les résolutions temporelles et spatiales dépendent fortement du type de vecteur : piétons, tracteurs, drones, satellites (Figure 32). Ceci s'explique évidemment par le fait qu'il n'est pas réaliste pour un agriculteur de se déplacer à pieds quotidiennement en de multiples points de la parcelle pour effectuer une mesure alors qu'un satellite survolera automatiquement la parcelle au bout de quelques jours. A l'inverse, l'exemple de l'imagerie satellite permet de constater que les capteurs embarqués jouissant d'une bonne résolution temporelle souffrent souvent d'une moins bonne résolution spatiale.

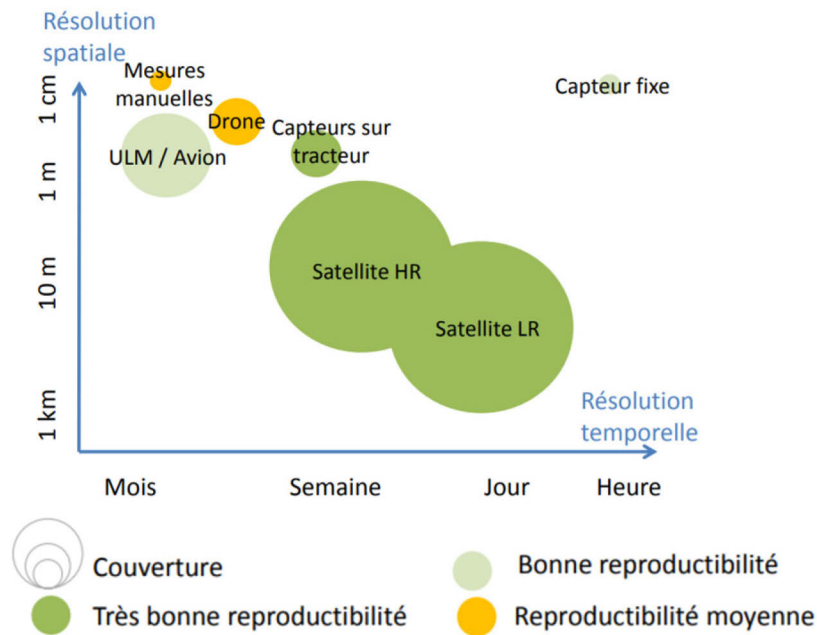


Figure 32 : Résolution spatiale et temporelle en fonction du type de vecteur pour les capteurs embarqués. Adapté de [128]

Avec l'arrivée sur le marché de nouvelles technologies et services de communication sans fil, telles que LoRa ou Sigfox, l'évaluation de la variabilité du sol par un réseau de capteurs autonomes communicants est une approche de plus en plus attractive. Ce type d'architecture permet d'effectuer un véritable suivi en temps réel avec une bonne résolution spatiale à condition que le coût unitaire du capteur soit suffisamment bas pour qu'il reste rentable de déployer un réseau dense de systèmes sur la parcelle. Cette condition peut être respectée dans le cas des capteurs potentiométriques de type ISE « tout solide » et ISFET, qui bénéficient des avantages de la fabrication collective à bas coût par les procédés des microtechnologies.

L'architecture générique d'un capteur autonome communicant se compose de quatre principales unités : l'unité de pilotage du système, l'unité de mesure (capteur), l'unité responsable de l'énergie (stockage, gestion dans le système et éventuellement récupération), et enfin l'unité radio permettant la transmission sans fil des données vers d'autres appareils (Figure 33). La contrainte énergétique est forte sur ce genre de systèmes puisqu'une fois la batterie déchargée, ils deviennent hors-service. Dans le cas du suivi environnemental, les capteurs sont déployés sur de grandes surfaces souvent isolées rendant l'opération de remplacement d'une batterie complexe et coûteuse. Afin de respecter la contrainte de temps liée à l'application visée (durée de la mission, fréquence de mesure), la consommation énergétique peut être optimisée en plaçant le système dans un état de repos où il ne consomme qu'une quantité infinitésimale d'énergie [129]. Le système est réveillé périodiquement pour, par exemple, effectuer une mesure et transmettre la donnée. La contrainte énergétique est donc le principal facteur déterminant la résolution temporelle de ce type de système.

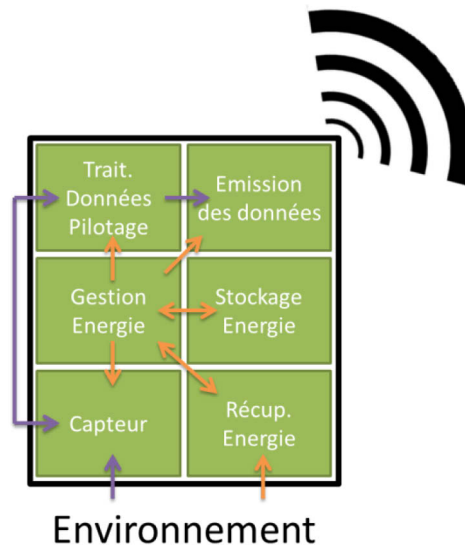


Figure 33 : Architecture générale d'un capteur autonome communicant

Dans le cadre du projet INNOOPERF-blé, nous souhaitons effectuer le suivi de la teneur en azote minéral du sol durant une période s'étalant approximativement de décembre à mai-juin. Cette durée englobe la période précédant le semis du blé dur jusqu'à peu avant sa récolte. En s'appuyant sur l'expertise de l'équipe MICA du LAAS-CNRS dans la conception de micro-systèmes d'analyse pour l'environnement ainsi que sur les services dont dispose la plateforme de micro-fabrication du LAAS-CNRS, nous développerons un système multi-capteur basé sur la technologie des microcapteurs chimiques ISFET. Il sera composé in-fine de :

- Un pH-ISFET
- Un pNH_4 -ISFET pour la détection des ions ammonium
- Un pNO_3 -ISFET pour la détection des ions nitrates
- Une électrode de référence

L'approche réseaux de capteurs autonomes communicants a été retenue. Nous avons fait le choix d'un système implanté de manière permanente dans le sol et effectuant une mesure *in situ* quasiment en continu. Cette méthode permet d'observer l'évolution du paramètre de mesure avec une excellente résolution temporelle en partant du postulat que si la sonde est localisée judicieusement sur une zone homogène de la parcelle, l'évolution de ce paramètre suivra globalement la même tendance au sein de cette zone. Contrairement aux systèmes « on-the-go », nous faisons donc ici le choix de diminuer la résolution spatiale de l'information au bénéfice d'un meilleur suivi temporel. La densité de nœuds du réseau de capteurs pourra toutefois être augmentée selon le coût final du dispositif.

Pour être fonctionnels, les microcapteurs ISFET devront répondre au moins aux critères suivant :

- durée de vie dans le sol suffisante (>5mois) malgré la présence de nombreuses sources de dégradation (biocontaminations, vibrations causées par les machines agricoles, variations d'humidité...)
- propriétés de détection (sensibilité, sélectivité, limite de détection) adaptées aux concentrations typiques de la solution des sols cultivés

- capacité à mesurer directement dans le sol en l'absence d'un milieu purement liquide
- capacité à détecter de faibles dynamiques de variation du paramètre mesuré au regard de la dérive temporelle du signal intrinsèque au capteur

Bibliographie

- [1] P. R. Shewry and S. J. Hey, "The contribution of wheat to human diet and health," *Food Energy Secur.*, vol. 4, no. 3, pp. 178–202, Oct. 2015.
- [2] D. Lafiandra, G. Riccardi, and P. R. Shewry, "Improving cereal grain carbohydrates for diet and health," *J. Cereal Sci.*, vol. 59, no. 3, pp. 312–326, May 2014.
- [3] K. Khan and P. R. Shewry, Eds., *WHEAT: Chemistry and Technology*, Fourth Edition. 3340 Pilot Knob Road, St. Paul, Minnesota 55121, U.S.A.: AACCI International, Inc., 2009.
- [4] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), "FAOSTAT." [Online]. Available: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. [Accessed: 10-May-2017].
- [5] Comité Français de la Semoulerie Industrielle (CFSI), "Les chiffres clés - CFSI." [Online]. Available: http://www.cfsi-sifpaf.com/cfsi_c3.php. [Accessed: 18-Aug-2017].
- [6] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), "How to Feed the World in 2050," 2009. [Online]. Available: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf. [Accessed: 18-Aug-2017].
- [7] W. M. Stewart and T. L. Roberts, "Food Security and the Role of Fertilizer in Supporting it," *Procedia Eng.*, vol. 46, pp. 76–82, Jan. 2012.
- [8] M. Andrews, J. A. Raven, and P. J. Lea, "Do plants need nitrate? The mechanisms by which nitrogen form affects plants," *Ann. Appl. Biol.*, vol. 163, no. 2, pp. 174–199, Sep. 2013.
- [9] M. Hawkesford *et al.*, "Chapter 6 - Functions of Macronutrients," in *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)*, P. Marschner, Ed. San Diego: Academic Press, 2012, pp. 135–189.
- [10] A. G. Owen and D. L. Jones, "Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition," *Soil Biol. Biochem.*, vol. 33, no. 4, pp. 651–657, Apr. 2001.
- [11] B. Heidari *et al.*, "Protein phosphatase 2A B55 and A regulatory subunits interact with nitrate reductase and are essential for nitrate reductase activation," *Plant Physiol.*, vol. 156, no. 1, pp. 165–172, May 2011.
- [12] C. Masclaux-Daubresse, F. Daniel-Vedele, J. Dechorgnat, F. Chardon, L. Gaufichon, and A. Suzuki, "Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture," *Ann. Bot.*, vol. 105, no. 7, pp. 1141–1157, Jun. 2010.
- [13] M.-E. Deroche, "Relations entre la photosynthèse et l'assimilation de l'azote," *Bull. Société Bot. Fr. Actual. Bot.*, vol. 130, no. 1, pp. 85–98, Jan. 1983.
- [14] COMIFER, "Le Bilan azote: calcul de la fertilisation azotée," 2013. [Online]. Available: <http://www.comifer.asso.fr/index.php/fr/bilan-azote.html>. [Accessed: 15-Aug-2017].
- [15] "Blé dur: assurer un rendement et un taux de protéines élevés," *ARVALIS-infos.fr*. [Online]. Available: <http://www.arvalis-infos.fr:443/assurer-un-rendement-et-un-taux-de-proteines-eleves-@/view-14784-arvarticle.html>. [Accessed: 15-Aug-2017].
- [16] H. J. Di and K. C. Cameron, "Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies," *Nutr. Cycl. Agroecosystems*, vol. 64, no. 3, pp. 237–256, Nov. 2002.
- [17] R. Lan, J. T. S. Irvine, and S. Tao, "Synthesis of ammonia directly from air and water at ambient temperature and pressure," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. srep01145, Jan. 2013.
- [18] J. Raymond, J. L. Siefert, C. R. Staples, and R. E. Blankenship, "The Natural History of Nitrogen Fixation," *Mol. Biol. Evol.*, vol. 21, no. 3, pp. 541–554, Mar. 2004.
- [19] F. B. Simpson and R. H. Burris, "A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase," *Science*, vol. 224, no. 4653, pp. 1095–1097, Jun. 1984.
- [20] J. R. Postgate and F. R. S., "The nitrogen cycle - Biological nitrogen fixation: fundamentals," *Phil Trans R Soc Lond B*, vol. 296, no. 1082, pp. 375–385, Jan. 1982.
- [21] P. Duchaufour, *Introduction à la science du sol: sol, végétation, environnement*. Dunod, 2001.
- [22] K. L. Wells, J. L. Sims, and M. S. Smith, "Nitrogen in Kentucky Soils." [Online]. Available: <http://www2.ca.uky.edu/agcomm/pubs/agr/agr43/agr43.htm>. [Accessed: 11-Aug-2017].

- [23] G. P. Robertson and P. M. Groffman, "Nitrogen Transformations," in *Soil microbiology, ecology and biochemistry*, Academic Press., Burlington, Massachusetts, USA, 2015, pp. 421–446.
- [24] Linn, D.M and Doran, J.W., "Effect of Water Filled Pore Space on Carbon Dioxide and Nitrous Oxide Production in Tilled and Non-Tilled Soils," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 48, no. 6, pp. 1267–1272, 1984.
- [25] S. W. Watson, F. W. Valois, and J. B. Waterbury, "The Family Nitrobacteraceae," in *The Prokaryotes*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1981, pp. 1005–1022.
- [26] K. L. Marsh, G. K. Sims, and R. L. Mulvaney, "Availability of urea to autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as related to the fate of ¹⁴C- and ¹⁵N-labeled urea added to soil," *Biol. Fertil. Soils*, vol. 42, no. 2, pp. 137–145, Nov. 2005.
- [27] H. Lees, "The biochemistry of the nitrifying organisms. 1. The ammonia-oxidizing systems of Nitrosomonas," *Biochem. J.*, vol. 52, no. 1, pp. 134–139, Sep. 1952.
- [28] C. Grunditz and G. Dalhammar, "Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of nitrosomonas and nitrobacter," *Water Res.*, vol. 35, no. 2, pp. 433–440, Feb. 2001.
- [29] M. S. M. Jetten, "The microbial nitrogen cycle," *Environ. Microbiol.*, vol. 10, no. 11, pp. 2903–2909, Nov. 2008.
- [30] C. A. Francis, J. M. Beman, and M. M. M. Kuypers, "New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation," *ISME J.*, vol. 1, no. 1, pp. 19–27, May 2007.
- [31] A. H. Treusch, S. Leininger, A. Kletzin, S. C. Schuster, H.-P. Klenk, and C. Schleper, "Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling," *Environ. Microbiol.*, vol. 7, no. 12, pp. 1985–1995, Dec. 2005.
- [32] R. G. Silva, K. C. Cameron, H. J. Di, N. P. Smith, and G. D. Buchan, "Effect of macropore flow on the transport of surface-applied cow urine through a soil profile," *Soil Res.*, vol. 38, no. 1, pp. 13–24, 2000.
- [33] T. N. Gamble, M. R. Betlach, and J. M. Tiedje, "Numerically Dominant Denitrifying Bacteria from World Soils," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 33, no. 4, pp. 926–939, Apr. 1977.
- [34] J. W. Erisman, M. A. Sutton, J. Galloway, Z. Klimont, and W. Winiwarter, "How a century of ammonia synthesis changed the world," *Nat. Geosci.*, vol. 1, no. 10, pp. 636–639, 2008.
- [35] V. Smil, "Nitrogen and Food Production: Proteins for Human Diets," *AMBIO J. Hum. Environ.*, vol. 31, no. 2, pp. 126–131, Mar. 2002.
- [36] W. M. Stewart, D. W. Dibb, A. E. Johnston, and T. J. Smyth, "The Contribution of Commercial Fertilizer Nutrients to Food Production," *Agron. J.*, vol. 97, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2005.
- [37] Z. Liang, K. F. Bronson, K. R. Thorp, J. Mon, M. Badaruddin, and G. Wang, "Cultivar and N Fertilizer Rate Affect Yield and N use Efficiency in Irrigated Durum Wheat," *Crop Sci.*, vol. 54, no. 3, p. 1175, 2014.
- [38] J. Roger-Estrade, "Méthode du bilan prévisionnel," *Gestion des peuplements végétaux et des ressources du milieu*. [Online]. Available: https://tice.agroparistech.fr/coursenligne/courses/SIAFEEAGRONOMIE5bd9/document/peuplements/sol/part2_N_bilan.htm. [Accessed: 15-Aug-2017].
- [39] Arvalis, "Teneur en proteines des bles: relever le double defi agronomique et economique." [Online]. Available: https://www.arvalisinstitutduvegetal.fr/arvalis-se-mobilise-pour-relever-la-teneur-en-proteines-des-bles-francais-@/_plugins/WMS_BO_Gallery/page/getElementStream.html?id=23905&prop=file. [Accessed: 15-Aug-2017].
- [40] Union des Industrielles de la Fertilisation (UNIFA), "Blé." [Online]. Available: <http://fertilisation-edu.fr/cultures-fiches-pratiques/ble.html>. [Accessed: 17-Aug-2017].
- [41] S. Kant, Y.-M. Bi, and S. J. Rothstein, "Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency," *J. Exp. Bot.*, vol. 62, no. 4, pp. 1499–1509, Feb. 2011.

- [42] W. R. Raun and G. V. Johnson, "Improving Nitrogen Use Efficiency for Cereal Production," *Agron. J.*, vol. 91, no. 3, pp. 357–363, 6/01 1999.
- [43] R. Sylvester-Bradley and D. R. Kindred, "Analysing nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency," *J. Exp. Bot.*, vol. 60, no. 7, pp. 1939–1951, 2009.
- [44] A. Hodge, D. Robinson, and A. Fitter, "Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen?," *Trends Plant Sci.*, vol. 5, no. 7, pp. 304–308, Jul. 2000.
- [45] P. Benincasa, M. Guiducci, and F. Tei, "The Nitrogen Use Efficiency: Meaning and Sources of Variation—Case Studies on Three Vegetable Crops in Central Italy," *HortTechnology*, vol. 21, no. 3, pp. 266–273, Jun. 2011.
- [46] A. E. Lawniczak, J. Zbierska, B. Nowak, K. Achtenberg, A. Grześkowiak, and K. Kanas, "Impact of agriculture and land use on nitrate contamination in groundwater and running waters in central-west Poland," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 188, 2016.
- [47] A. E. Lawniczak, S. Güsewell, and J. T. A. Verhoeven, "Effect of N:K supply ratios on the performance of three grass species from herbaceous wetlands," *Basic Appl. Ecol.*, 2009.
- [48] C. A. Shapiro and C. S. Wortmann, "Corn Response to Nitrogen Rate, Row Spacing, and Plant Density in Eastern Nebraska," *Agron. J.*, 2006.
- [49] J. K. Ladha, H. Pathak, T. J. Krupnik, J. Six, and C. Van Kessel, "Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects," *Adv. Agron.*, 2005.
- [50] G. Billen, J. Garnier, and L. Lassaletta, "The nitrogen cascade from agricultural soils to the sea: modelling nitrogen transfers at regional watershed and global scales," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 368, no. 1621, Jul. 2013.
- [51] G. Billen, A. Beusen, L. Bouwman, and J. Garnier, "Anthropogenic nitrogen autotrophy and heterotrophy of the world's watersheds: Past, present, and future trends," *Glob. Biogeochem. Cycles*, vol. 24, no. 4, p. GB0A11, Dec. 2010.
- [52] "OMS | Les maladies liées à l'eau," *WHO*. [Online]. Available: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/methaemoglob/fr/. [Accessed: 14-Sep-2017].
- [53] OECD, "Environmental Indicators for Agriculture; Methods and Results," vol. 3, p. 409, 2001.
- [54] "Report COM(2002)407 - Environment - European Commission." [Online]. Available: <http://ec.europa.eu/environment/water/water-nitrates/reports.html>. [Accessed: 11-May-2017].
- [55] C. d'agriculture France, "Directive nitrates," 22-Mar-2017. [Online]. Available: <http://www.chambres-agriculture.fr/agriculteur-et-politiques/politiques-environnementales/directive-nitrates/>. [Accessed: 10-May-2017].
- [56] "EUR-Lex - 31991L0676 - EN - EUR-Lex." [Online]. Available: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A31991L0676>. [Accessed: 10-May-2017].
- [57] D. Auvergne-Rhône-Alpes, "Mesure 3 : Equilibre de la fertilisation à compter du 1er septembre 2014," 29-Feb-2016. [Online]. Available: <http://draaf.auvergne-rhone-alpes.agriculture.gouv.fr/Mesure-3-Equilibre-de-la>. [Accessed: 21-Aug-2017].
- [58] European Environment Agency, "Exposure of ecosystems to acidification, eutrophication and ozone," *European Environment Agency*. [Online]. Available: <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/exposure-of-ecosystems-to-acidification-3/assessment-2>. [Accessed: 21-Aug-2017].
- [59] *Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles*. 2001.
- [60] R. 05 US EPA, "Human Health - water ingestion only Fact Sheet for Nitrate: (Human Health Noncarcinogen - water ingestion only), New York State Department of Environmental Conservation." [Online]. Available: <https://www.epa.gov/gliclearinghouse/human-health-water-ingestion-only-fact-sheet-nitrate-human-health-noncarcinogen>. [Accessed: 10-May-2017].

- [61] G. Pepin, "L'échantillonnage des sols et des eaux," presented at the Séminaire "Sols Pollués," 1997, p. 9–17 + annexes.
- [62] A. R. C. Jr, Ed., "Soil and Soil Solution Sampling, Sample Transport, and Storage," in *Introduction to Soil Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2014, pp. 135–158.
- [63] United States Department of Agriculture (USDA), "Sampling Soils for Nutrient Management | NRCS Montana." [Online]. Available: https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/mt/newsroom/factsheets/?cid=nrcs144p2_056890. [Accessed: 23-Aug-2017].
- [64] D. G. Maynard, Y. P. Kalra, and J. A. Crumbaugh, *Nitrate and exchangeable ammonium nitrogen (chapter 6)*. 2007.
- [65] M. Pansu and J. Gautheryrou, *L'analyse du sol, minéralogique, organique et minéral*. Springer, 2003.
- [66] S. ADAMOWICZ, C. Otto, S. MARS, and N. BALLINO, "Comparaison de différentes méthodes de dosage des nitrates dans les extraits de sols. Influence du milieu d'extraction," *Agronomie*, vol. 2, no. 4, pp. 359–364, 1982.
- [67] S. Kaneko, M. Inagaki, and T. Morishita, "A simple method for the determination of nitrate in potassium chloride extracts from forest soils.," *Proc. 19th World Congr. Soil Sci. Soil Solut. Chang. World Brisb. Aust. 1-6 August 2010 Work. Group 32 For. Soil Process. Change*, pp. 4–7, 2010.
- [68] R. J. Norman, J. C. Edberg, and J. W. Stucki, "Determination of Nitrate in Soil Extracts by Dual-wavelength Ultraviolet Spectrophotometry," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 49, no. 5, pp. 1182–1185, 10/01 1985.
- [69] R. J. Norman and J. W. Stucki, "The Determination of Nitrate and Nitrite in Soil Extracts by Ultraviolet Spectrophotometry," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 45, no. 2, pp. 347–353, 4/01 1981.
- [70] J. V. Sinfield, D. Fagerman, and O. Colic, "Evaluation of sensing technologies for on-the-go detection of macro-nutrients in cultivated soils," *Comput. Electron. Agric.*, vol. 70, no. 1, pp. 1–18, Jan. 2010.
- [71] R. Desai, M. Marti Villalba, N. S. Lawrence, and J. Davis, "Green Approaches to Field Nitrate Analysis: An Electroanalytical Perspective," *Electroanalysis*, vol. 21, no. 7, pp. 789–796, Apr. 2009.
- [72] J. E. Harwood and D. J. Huyser, "Some aspects of the phenol-hypochlorite reaction as applied to ammonia analysis," *Water Res.*, vol. 4, no. 7, pp. 501–515, Jul. 1970.
- [73] W. A. O'Deen and L. K. Porter, "Devarda's alloy reduction of nitrate and tube diffusion of the reduced nitrogen for indophenol ammonium and nitrogen-15 determinations," *Anal. Chem.*, vol. 52, no. 7, pp. 1164–1166, Jun. 1980.
- [74] M. Debliquy, "Capteurs chimiques," *Techniques de l'ingénieur*, 2010. [Online]. Available: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/capteurs-et-methodes-de-mesure-42419210/capteurs-chimiques-r420/>. [Accessed: 28-Aug-2017].
- [75] P. Bergveld, "Thirty years of ISFETOLGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 88, no. 1, pp. 1–20, 2003.
- [76] J. Artigas *et al.*, "Application of ion sensitive field effect transistor based sensors to soil analysis," *Comput. Electron. Agric.*, vol. 31, no. 3, pp. 281–293, May 2001.
- [77] B. Ismail and S. S. Nielsen, "Basic Principles of Chromatography," in *Food Analysis*, Springer, Boston, MA, 2010, pp. 473–498.
- [78] S. Klein, "Measurement of Ammonium by Ion Chromatography In High Sodium Concentration," *J. Undergrad. Res.*, vol. 4, no. 1, p. 11, 2006.
- [79] W. A. Dick and M. A. Tabatabai, "Ion Chromatographic Determination of Sulfate and Nitrate in Soils," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 43, no. 5, pp. 899–904, 10/01 1979.
- [80] R. Michalski and I. Kurzyca, "Determination of Nitrogen Species (Nitrate, Nitrite and Ammonia Ions) in Environmental Samples by Ion Chromatography.," *Pol. J. Environ. Stud.*, vol. 15, no. 1, 2006.
- [81] P. Zwaenepoel and J.-M. Le Bars, "L'agriculture de précision," *Ingénieries-EAT*, no. 12, p. p–67, 1997.

- [82] M. Diacono, P. Rubino, and F. Montemurro, "Precision nitrogen management of wheat. A review," *Agron. Sustain. Dev.*, vol. 33, no. 1, pp. 219–241, Jan. 2013.
- [83] D. Xiong *et al.*, "SPAD-based leaf nitrogen estimation is impacted by environmental factors and crop leaf characteristics," *Sci. Rep.*, vol. 5, Aug. 2015.
- [84] C. W. Wood, D. W. Reeves, and D. G. Himelrick, "Relationships between chlorophyll meter readings and leaf chlorophyll concentration, N status, and crop yield: a review," in *Proceedings of the Agronomy Society of New Zealand*, 1993, vol. 23, pp. 1–9.
- [85] S. T. Ata-Ul-Karim, Q. Cao, Y. Zhu, L. Tang, M. I. A. Rehmani, and W. Cao, "Non-destructive Assessment of Plant Nitrogen Parameters Using Leaf Chlorophyll Measurements in Rice," *Front. Plant Sci.*, vol. 7, 2016.
- [86] M. A. Ortuzar-Iragorri, A. Alonso, A. Castellón, G. Besga, J. M. Estavillo, and A. Aizpurua, "N-Tester Use in Soft Winter Wheat," *Agron. J.*, vol. 97, no. 5, pp. 1380–1389, Sep. 2005.
- [87] B. Bojović and A. Marković, "Correlation between nitrogen and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.)," *Kragujev. J. Sci.*, vol. 31, pp. 69–74, 2009.
- [88] P. Debaeke, P. Rouet, and E. Justes, "Relationship Between the Normalized SPAD Index and the Nitrogen Nutrition Index: Application to Durum Wheat," *J. Plant Nutr.*, vol. 29, no. 1, pp. 75–92, Jan. 2006.
- [89] J. Uddling, J. Gelang-Alfredsson, K. Piikki, and H. Pleijel, "Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings," *Photosynth. Res.*, vol. 91, no. 1, pp. 37–46, Jan. 2007.
- [90] "How the MC-100 Works." [Online]. Available: <https://www.apogeeinstruments.co.uk/how-the-mc-100-works/>. [Accessed: 29-Aug-2017].
- [91] K. Maxwell and G. N. Johnson, "Chlorophyll fluorescence—a practical guide," *J. Exp. Bot.*, vol. 51, no. 345, pp. 659–668, Apr. 2000.
- [92] R. Muñoz-Huerta, R. Guevara-Gonzalez, L. Contreras-Medina, I. Torres-Pacheco, J. Prado-Olivarez, and R. Ocampo-Velazquez, "A Review of Methods for Sensing the Nitrogen Status in Plants: Advantages, Disadvantages and Recent Advances," *Sensors*, vol. 13, no. 8, pp. 10823–10843, Aug. 2013.
- [93] Z. G. Cerovic, G. Masdoumier, N. B. Ghazlen, and G. Latouche, "A new optical leaf-clip meter for simultaneous non-destructive assessment of leaf chlorophyll and epidermal flavonoids," *Physiol. Plant.*, vol. 146, no. 3, pp. 251–260, Nov. 2012.
- [94] A. N. Misra, M. Misra, and R. Singh, *Chlorophyll fluorescence in plant biology*. INTECH Open Access Publisher, 2012.
- [95] Force-A, "Plaquette DUALEX SCIENTIFIC™ – ForceA." [Online]. Available: http://www.force-a.com/dt_benefits/dualex-scientific/. [Accessed: 30-Aug-2017].
- [96] B. Anselme and S. Gadal, "ENVCAL-Suivi de l'environnement par télédétection." [Online]. Available: <http://e-cours.univ-paris1.fr/modules/uved/envcal/html/vegetation/indices/principe.html>. [Accessed: 30-Aug-2017].
- [97] L. Murdock, D. Call, and J. James, "Comparison and use of chlorophyll meters on wheat (reflectance vs. transmittance/absorbance)," *Coop. Ext. Serv. Univ. Ky.-Coll. Agric. AGR-181*, 2004.
- [98] Y. P. Dang, M. J. Pringle, M. Schmidt, R. C. Dalal, and A. Apan, "Identifying the spatial variability of soil constraints using multi-year remote sensing," *Field Crops Res.*, vol. 123, no. 3, pp. 248–258, Sep. 2011.
- [99] W. S. Lee, V. Alchanatis, C. Yang, M. Hirafuji, D. Moshou, and C. Li, "Sensing technologies for precision specialty crop production," *Comput. Electron. Agric.*, vol. 74, no. 1, pp. 2–33, Oct. 2010.
- [100] "Welcome to EnMAP." [Online]. Available: <http://www.enmap.org/?q=mission/?q=mission>. [Accessed: 31-Aug-2017].
- [101] "Yara N-Sensor Brochure | Yara UK." [Online]. Available: <http://www.yara.co.uk/crop-nutrition/knowledge/literature/n-sensor/>. [Accessed: 01-Sep-2017].
- [102] "Airinov démocratise le drone agricole," *Natura Sciences*, 01-Mar-2017..
- [103] "Nitrite Nitrate Test Strip," *Precision Laboratories*..

- [104] M. R. Ehsani, S. K. Upadhyaya, D. Slaughter, S. Shafii, and M. Pelletier, "A NIR Technique for Rapid Determination of Soil Mineral Nitrogen," *Precis. Agric.*, vol. 1, no. 2, pp. 219–236, Sep. 1999.
- [105] B. R. Jahn and S. K. Upadhyaya, "Determination of Soil Nitrate and Organic Matter Content Using Portable, Filter-Based Mid-Infrared Spectroscopy," in *Proximal Soil Sensing*, Springer, Dordrecht, 2010, pp. 143–152.
- [106] R. Linker, M. Weiner, I. Shmulevich, and A. Shaviv, "Nitrate Determination in Soil Pastes using Attenuated Total Reflectance Mid-infrared Spectroscopy: Improved Accuracy via Soil Identification," *Biosyst. Eng.*, vol. 94, no. 1, pp. 111–118, May 2006.
- [107] H.-J. Kim, K. A. Sudduth, and J. W. Hummel, "Soil macronutrient sensing for precision agriculture," *J. Environ. Monit. JEM*, vol. 11, no. 10, pp. 1810–1824, Oct. 2009.
- [108] M. Taverna, I. Le Potier, and P. Morin, "Électrophorèse capillaire - Principe - Principe général et grandeurs fondamentales," 12-Oct-2003. [Online]. Available: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/analyse-des-macromolecules-biologiques-42380210/electrophorese-capillaire-p3365/principe-general-et-grandeurs-fondamentales-p3365niv10001.html>. [Accessed: 16-Sep-2017].
- [109] P. Kubáň, H. T. A. Nguyen, M. Macka, P. R. Haddad, and P. C. Hauser, "New Fully Portable Instrument for the Versatile Determination of Cations and Anions by Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection," *Electroanalysis*, vol. 19, no. 19–20, pp. 2059–2065, Oct. 2007.
- [110] A. J. Zemann, "Capacitively coupled contactless conductivity detection in capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 24, no. 12–13, pp. 2125–2137, Jun. 2003.
- [111] "Nutrition Management," *Pessl Instruments*, 11-Jan-2017. [Online]. Available: <http://www.pesslinstruments.com/nutrition-management/>. [Accessed: 16-Sep-2017].
- [112] V. I. Adamchuk, M. T. Morgan, and D. R. Ess, "automated sampling system for measuring soil pH," *Trans. ASAE*, 1999.
- [113] V. I. Adamchuk, E. D. Lund, B. Sethuramasamyraja, M. T. Morgan, A. Dobermann, and D. B. Marx, "Direct measurement of soil chemical properties on-the-go using ion-selective electrodes," *Comput. Electron. Agric.*, vol. 48, no. 3, pp. 272–294, Sep. 2005.
- [114] "Soil pH Manager (MSP)." [Online]. Available: <https://www.veristech.com/the-sensors/msp>. [Accessed: 16-Sep-2017].
- [115] K. J. Sibley, G. R. Brewster, J. F. Adsett, P. C. Struik, and T. Astatkie, *In-field measurement of soil nitrate using an ion-selective electrode*. INTECH Open Access Publisher, 2010.
- [116] K. J. Sibley, T. Astatkie, G. Brewster, P. C. Struik, J. F. Adsett, and K. Pruski, "Field-scale validation of an automated soil nitrate extraction and measurement system," *Precis. Agric.*, vol. 10, no. 2, p. 162, Apr. 2009.
- [117] J. Artigas, C. Jimenez, S. G. Lemos, A. R. A. Nogueira, A. Torre-Neto, and J. Alonso, "Development of a screen-printed thick-film nitrate sensor based on a graphite-epoxy composite for agricultural applications," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 88, no. 3, pp. 337–344, Feb. 2003.
- [118] S. J. Birrell and J. W. Hummel, "Real-time multi ISFET/FIA soil analysis system with automatic sample extraction," *Comput. Electron. Agric.*, vol. 32, no. 1, pp. 45–67, 2001.
- [119] S. J. Birrell and J. W. Hummel, "Membrane selection and ISFET configuration evaluation for soil nitrate sensing," *Trans. ASAE*, vol. 43, no. 2, p. 197, 2000.
- [120] H.-J. Kim, J. Hummel, and S. Birrell, "Evaluation of Ion-Selective Membranes for Real-Time Soil Nutrient Sensing," *Agric. Biosyst. Eng. Conf. Proc. Present.*, Jul. 2003.
- [121] M. Futagawa, T. Iwasaki, H. Murata, M. Ishida, and K. Sawada, "A Miniature Integrated Multimodal Sensor for Measuring pH, EC and Temperature for Precision Agriculture," *Sensors*, vol. 12, no. 6, pp. 8338–8354, Jun. 2012.
- [122] K. L. Tully and R. Weil, "Ion-Selective Electrode Offers Accurate, Inexpensive Method for Analyzing Soil Solution Nitrate in Remote Regions," *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, vol. 45, no. 14, pp. 1974–1980, Aug. 2014.

- [123] Y. Zhong, W. Yan, J. Chen, and Z. Shangguan, "Net ammonium and nitrate fluxes in wheat roots under different environmental conditions as assessed by scanning ion-selective electrode technique," *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 7223, Nov. 2014.
- [124] M. M. Ardakani, A. Dastanpour, and M. Salavati-Niasari, "A highly selective nitrate electrode based on a tetramethyl cyclotetra-decanato-nickel(II) complex," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 568, pp. 1–6, Jul. 2004.
- [125] S. A. Ghaffari *et al.*, "Electrochemical Impedance Sensors for Monitoring Trace Amounts of NO₃ in Selected Growing Media," *Sensors*, vol. 15, no. 7, pp. 17715–17727, Jul. 2015.
- [126] W.-O. Caron, M. S. Lamhamedi, J. Viens, and Y. Messaddeq, "Practical Application of Electrochemical Nitrate Sensor under Laboratory and Forest Nursery Conditions," *Sensors*, vol. 16, no. 8, p. 1190, Jul. 2016.
- [127] H. Jiang, M. A. Ali, Y. Jiao, B. Yang, and L. Dong, "In-situ, real-time monitoring of nutrient uptake on plant chip integrated with nutrient sensor," in *2017 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS)*, 2017, pp. 289–292.
- [128] C. Desbourdes, "Agriculture de précision et capteurs," Velaine-en-Haye, 11-May-2015.
- [129] K. Al Agha, "Réseaux de capteurs - Contraintes dans la conception d'un réseau de capteurs," 10-Oct-2010. [Online]. Available: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/technologies-de-l-information-th9/internet-des-objets-42612210/reseaux-de-capteurs-h8500/contraintes-dans-la-conception-d-un-reseau-de-capteurs-h8500niv10002.html>. [Accessed: 20-Sep-2017].

Chapitre 2 :

Théorie des capteurs électrochimiques potentiométriques

Ce chapitre débute avec une description théorique du fonctionnement des capteurs potentiométriques basés sur les membranes ionosensibles. Les modèles qui seront présentés fournissent un support théorique utile à l'analyse de la réponse d'un capteur en cours de développement. L'évaluation de ses propriétés de détection passe par la détermination de la sensibilité, de la sélectivité et de la limite de détection du capteur. Ces concepts seront expliqués, de même que les méthodes expérimentales permettant d'obtenir ces informations. Enfin, les éléments constituant les membranes sensibles seront décrits et il sera vu comment, à partir de l'état de l'art, il est possible de réaliser des membranes pour la détection potentiométrique des ions nitrates et ammonium.

1. Modèles théoriques de la réponse d'une membrane ionosensible

Plusieurs modèles théoriques décrivent la réponse des capteurs potentiométriques basés sur des membranes polymériques ionosensibles. Ils ont été résumés par Bobacka *et al.* [1]. Le plus simple d'entre eux est le modèle « Phase Boundary » (PB) qui se base sur deux principales hypothèses:

- (1) L'électroneutralité. Les potentiels de diffusion causés par la migration de deux espèces de mobilités ioniques différentes sont ignorés ($E_D = 0$) (Figure 34b). La réponse de la membrane est donc gouvernée uniquement par le potentiel d'interface entre deux phases solides ou liquides.
- (2) L'équilibre électrochimique. Pour tout ion capable de traverser l'interface entre deux phases, la différence de potentiel chimique est compensée par la différence de potentiel électrique. A l'exception des interfaces, les différences de potentiels électriques et de concentrations ioniques sont indépendantes de la distance et du temps (Figure 34a et b)

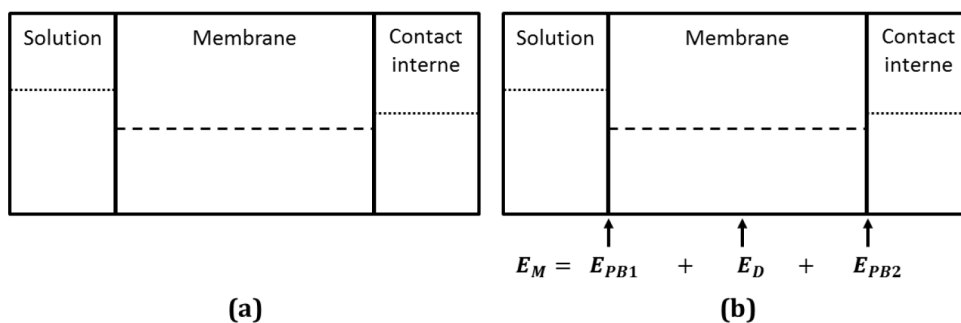


Figure 34 : Profils des concentrations (a) et du potentiel électrique (b) décrits dans le modèle Phase boundary. Adapté de [1]

A partir de ces deux hypothèses, le concept de potentiel électrochimique a été développé par Guggenheim en 1928 [2] où, pour un ion I, on a :

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + z_i F \varphi = \mu_i^0 + RT \ln(a_i) + z_i F \varphi \quad (9)$$

où représentent :

- $\tilde{\mu}_i$: le potentiel électrochimique de I dans la phase considérée
- μ_i : le potentiel chimique
- μ_i^0 : le potentiel chimique en conditions normales de température et de pression
- z_i : la valence de l'ion
- φ : le potentiel électrique

- a_i : l'activité de l'ion I
- R, T, F : la constante des gaz parfaits, la température absolue et la constante de Faraday, respectivement.

Pour discuter du potentiel de la membrane en exploitant ce formalisme, on considère un système symétrique composé d'une solution (à gauche) en contact avec une membrane perméable à l'ion I^+ (à droite) (Figure 35).

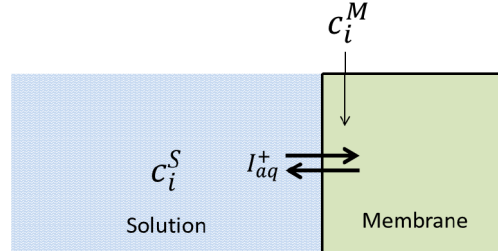


Figure 35 : Interface membrane/solution considérée pour la présentation du modèle PB.
La membrane n'est perméable qu'à l'ion I^+

Il est possible de relier la différence de potentiel E_{PB} à l'interface membrane ionosensible / solution liquide à la concentration c_i d'ions I^+ , à condition d'admettre quelques hypothèses supplémentaires [3]:

- La membrane a une sélectivité idéale : elle ne laisse passer que l'ion I^+ ,
- Les deux phases sont immiscibles et possèdent des propriétés chimiques différentes ($\mu_i^{0S} \neq \mu_i^{0M}$),
- Le transfert d'ions est rapide et réversible,
- La concentration ionique c_i et l'activité ionique a_i sont égales,
- Il n'y a pas de flux de la solution liquide à travers la membrane.

$$\tilde{\mu}_i^S = \tilde{\mu}_i^M \quad (10)$$

D'après (1),
$$\mu_i^{0S} + RT \ln(c_i^S) + z_i F \varphi_S = \mu_i^{0M} + RT \ln(c_i^M) + z_i F \varphi_M \quad (11)$$

$$E_{PB} = \varphi_M - \varphi_S = \frac{\mu_i^{0S} - \mu_i^{0M}}{z_i F} + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^S}{c_i^M}\right) \quad (12)$$

$$E_{PB} = \varphi_M - \varphi_S = const + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^S}{c_i^M}\right) \quad (13)$$

L'équation (13) est de forme « Nernstienne ». Le potentiel à l'interface des deux phases ne dépend que du logarithme de la concentration en ion I^+ dans la phase aqueuse à condition que c_i^M soit constante. Cette condition peut être remplie grâce à l'ajout dans la membrane d'additifs ioniques. Leur fonctionnement sera détaillé prochainement au cours de ce chapitre.

Le concept de sélectivité de la membrane ionosensible a ensuite été introduit dans ce modèle par Nikolskii en 1937 à travers la réaction d'échange à l'interface membrane/solution entre l'ion cible I^+ et un ion interférent J^+ [4]:



avec la constante d'équilibre suivante :

$$K_{ij} = \frac{c_i^S c_j^M}{c_i^M c_j^S} \quad (15)$$

On injecte (15) dans (13):

$$\begin{aligned} E_{PB} &= const + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^S}{c_i^M}\right) = const + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^S (c_i^M + c_j^M)}{c_i^M (c_i^M + c_j^M)}\right) = \\ &const + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^S + \frac{c_i^S c_j^M}{c_i^M}}{(c_i^M + c_j^M)}\right) = const + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^S + K_{ij} c_j^S}{(c_i^M + c_j^M)}\right) \end{aligned}$$

$$\text{Or,} \quad c_i^M + c_j^M = const \quad (16)$$

$$\text{Finalement,} \quad E_{PB} = const + \frac{RT}{z_i F} \ln(c_i^S + K_{ij} c_j^S) \quad (17)$$

Trente ans plus tard, Eisenman reprend l'équation laissée par Nikolskii et y introduit la notion de mobilité ionique, supprimant ainsi l'hypothèse du potentiel de diffusion nul ($E_D = 0$) présente dans la version originale du modèle PB [5]. Le potentiel de membrane E_M s'écrit alors :

$$E_M = E_{PB} + E_D = const' + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(c_i^S + \frac{u_j}{u_i} K_{ij} c_j^S\right) \quad (18)$$

où u_i et u_j sont les mobilités ioniques des ions I^+ et J^+ , respectivement. On peut constater que pour $u_i = u_j$, on retrouve bien l'équation (17).

Néanmoins, ce modèle ne permet pas de résoudre analytiquement la situation où l'ion cible I^+ et l'ion interférent J^+ n'ont pas la même charge ($z_i \neq z_j$). Cette situation a été résolue de manière empirique par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC, en anglais) à travers l'équation dite de Nikolskii-Eisenman [6]:

$$E_M = const + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(c_i^S + K_{ij}^{pot} c_j^S \frac{z_i}{z_j}\right) \quad (19)$$

Malgré ses approximations, le modèle PB fournit le support théorique de base nécessaire aux applications pratiques des capteurs. Aujourd'hui encore, il offre une compréhension intuitive des principes sous-jacents à la réponse des capteurs potentiométriques les plus récents, comme les microélectrodes spécifiques à contact solide. Cependant, le modèle PB ne permet pas d'expliquer certains phénomènes observés expérimentalement en régime transitoire voire en régime permanent, liés par exemple au rôle non négligeable du potentiel de diffusion.

Le modèle dit de Nernst-Planck-Poisson (NPP) est bien plus complexe mathématiquement mais offre une solution générale décrivant les profils de concentrations et de potentiels électriques en fonction du temps t et de la distance x . Il permet de traiter tous les cas de figure et d'analyser de nombreux paramètres : temps nécessaire pour atteindre le régime permanent, influence de l'épaisseur de la membrane, influence de la mobilité ionique des ions ou de la valence des ions interférents... Le modèle NPP se base sur un système de trois équations différentielles partielles non linéaires couplées [7]. Tout d'abord, le flux $f_i(x, t)$ d'ions i est décrit par l'équation de Nernst-Planck :

$$f_i(x, t) = -D_i \left[\frac{\partial c_i(x, t)}{\partial x} - z_i c_i(x, t) \left(\frac{F}{RT} \right) E(x, t) \right] \quad (20)$$

où $E(x, t)$ est le champ électrique et D_i le coefficient de diffusion de l'ion i .

La seconde équation du système est la loi de conservation de la masse :

$$\frac{\partial c_i(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial f_i(x, t)}{\partial x} \quad (21)$$

On ajoute finalement l'équation de Poisson exprimée en fonction de la densité totale de courant I :

$$I(x, t) = F \sum_i z_i f_i(x, t) + \varepsilon \frac{\partial E(x, t)}{\partial t} \quad (22)$$

avec ε , la permittivité de la solution.

Aujourd'hui, de nombreux logiciels permettent la résolution de ces équations par des méthodes de calcul numérique par éléments finis et différences finies. En 2003, Sokalski *et al.* ont exploité les modèles PB et NPP pour modéliser la réponse d'une configuration solution/membrane/solution interne assimilable à la structure d'une électrode spécifique (ISE) classique dédiée à la détection d'un ion M^+ en présence d'un ion interférent N^+ (Figure 36) [7]. Alors que le modèle PB montre une baisse de potentiel électrique entièrement située à l'interface solution/membrane, le modèle NPP montre clairement que le potentiel global de la membrane est le résultat de trois contributions : la différence de potentiel à l'interface solution/membrane, le potentiel de diffusion ainsi que la différence de potentiel à l'interface membrane/solution interne.

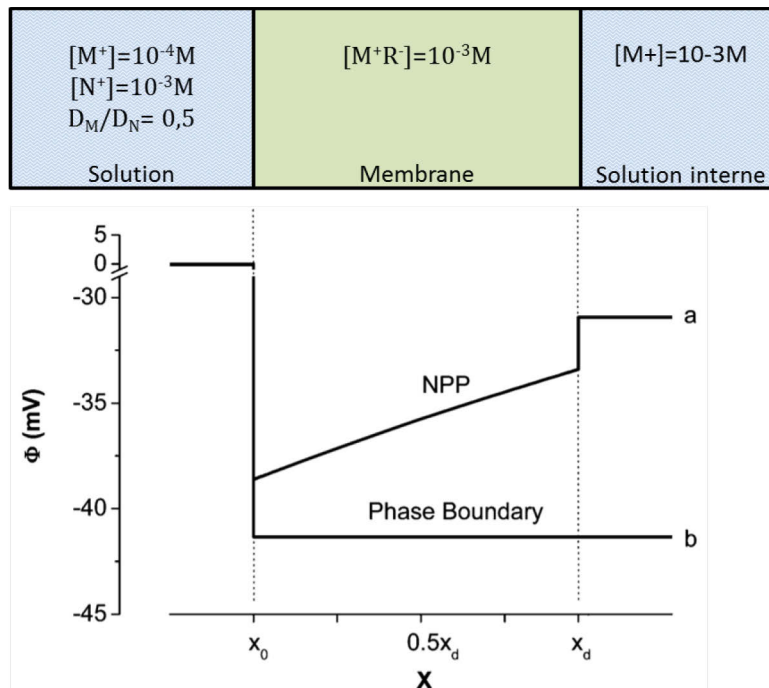


Figure 36 : Profils du potentiel électrique en régime permanent calculé par les modèles NPP et PB. Adapté de [1]

Les quelques éléments théoriques introduits dans cette première sous-partie seront utiles pour la description théorique des principales configurations de transducteur ion/électron qui feront l'objet des paragraphes suivants. En effet, si l'objectif de ces travaux de thèse était le

développement de pH-, pNO_3^- , et pNH_4^- -ISFET, le développement des membranes sensibles et électrodes de référence associés à ces ISFET a fait intervenir d'autres types de transduction « tout solide ».

2. Modes de transduction Ion-Electron

a. L'ion-Selective Electrode (ISE) conventionnelle

Avant de se consacrer à l'étude des capteurs à contact solide de type ISFET ou ISE, le cas classique de la mesure potentiométrique en laboratoire sera d'abord considéré à travers le montage à deux électrodes composé d'une ISE conventionnelle et d'une électrode de référence (Figure 37). Ce cas permettra de comprendre par quelle méthode expérimentale il est possible de mesurer le potentiel de membrane E_M afin de remonter à la concentration de l'ion cible I présent dans l'échantillon. Ce sera également l'occasion d'introduire quelques concepts clés de la potentiométrie comme le rôle de l'électrode de référence ou l'apparition de potentiels de jonction à l'interface entre deux électrolytes.

La différence de potentiel aux bornes des connecteurs en cuivre de deux électrodes est mesurée à courant nul grâce à un voltmètre disposant d'une très grande impédance. Cette condition particulière supprime la contribution des pertes ohmiques V_{ohm} qui seraient causées par le passage d'un courant électrique à travers les conducteurs ioniques ou électriques. Ainsi, en négligeant les potentiels de diffusion, la tension mesurée correspond uniquement à la somme des potentiels d'interface entre chaque phase de la cellule électrochimique {électrode sélective/échantillon/électrode de référence}. Ces potentiels comprennent des interfaces de différents types : interfaces métal-métal, métal-sel, sel-liquide et liquide-liquide (Figure 37, en bas). Ils ne peuvent pas être mesurés indépendamment les uns des autres.

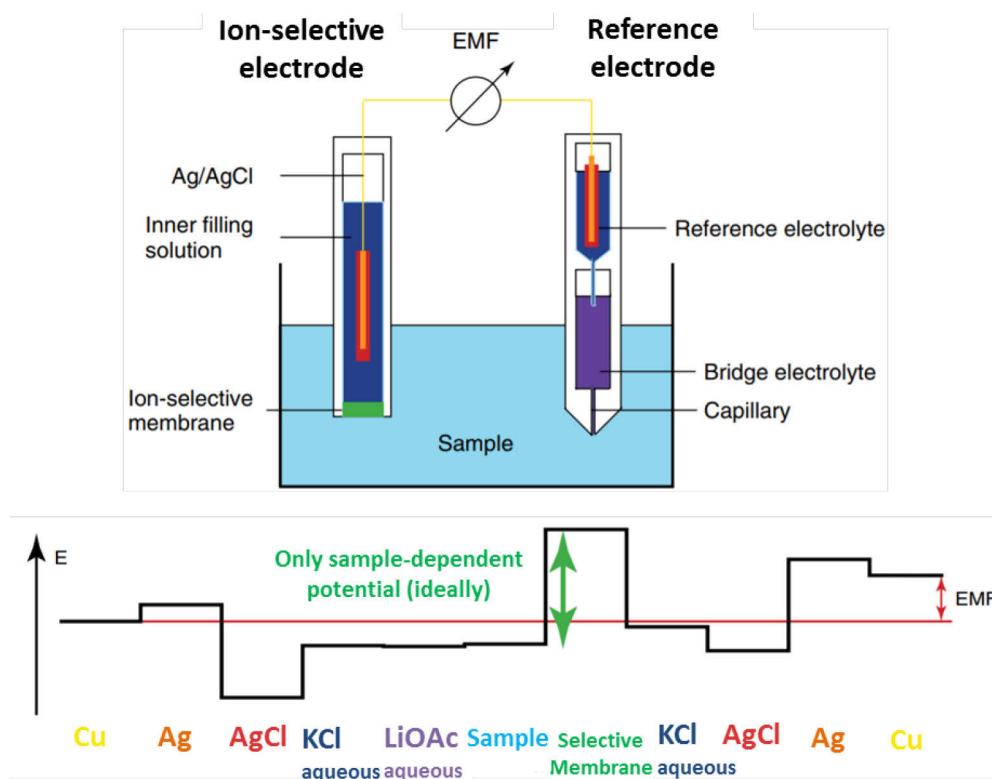
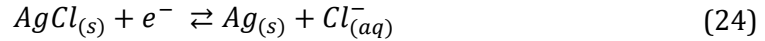


Figure 37 : (haut), schéma d'un montage potentiométrique incluant une ISE et une électrode de référence. (bas), schéma des potentiels à l'interfaces des différentes phases impliquées dans ce montage. Adapté de [8]

On a ainsi :

$$EMF = \sum_i E_{PBi} \quad (23)$$

Dans cet exemple, à la fois pour l'ISE et l'électrode de référence, la transduction ion/électron est réalisée au niveau d'une électrode de type argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) qui baigne dans une solution interne de chlorure de potassium KCl. L'électrode Ag/AgCl est de loin le type d'électrode de référence le plus couramment utilisé dans l'industrie et la recherche en raison de la simplicité de sa construction [9]. La réaction de transduction impliquée est ici :



à laquelle on ajoute la réaction de dissolution de l'AgCl dans la solution interne :



Cette réaction est caractérisée par le produit de solubilité K_s :

$$K_s = [Ag^+][Cl^-] \quad (26)$$

Le potentiel à l'équilibre de l'électrode s'exprime à travers l'équation:

$$E_{Ag/AgCl,Cl^-} = E_0 + \frac{RT}{z_i F} \ln \left(\frac{a_{AgCl}}{a_{Ag} a_{Cl^-}} \right) + \frac{RT}{F} \ln(K_s) \quad (27)$$

Le chlorure d'argent et l'argent sont des solides, leur activité est donc égale à 1. Ainsi, l'équation (27) peut finalement être réécrite :

$$E_{Ag/AgCl,Cl^-} = const - \frac{RT}{z_i F} \ln(a_{Cl^-}) \quad (28)$$

L'électrode de référence et l'ISE disposent d'un réservoir interne rempli d'un volume de solution de KCl fortement concentrée et dont la diffusion vers les autres compartiments peut être négligée dans notre exemple. L'activité a_{Cl^-} est donc constante. Par conséquent, le potentiel de l'électrode de référence $E_{Ag/AgCl,Cl^-}$ est également constant et ne varie pas avec la composition de la solution dans laquelle l'électrode est en contact.

Sur la Figure 37, on peut voir que l'électrode de référence dispose en fait de deux compartiments internes communicants entre eux par l'intermédiaire d'un élément poreux. Le premier est rempli de KCl et le second d'acétate de lithium CH_3COOLi . Le rôle de ce second électrolyte est d'éviter la contamination directe de l'échantillon par les ions K^+ et Cl^- qui sont généralement plus susceptibles d'interférer avec les membranes ionosensibles que les ions CH_3COO^- et Li^+ . L'inconvénient de cette approche est qu'on multiplie le risque d'apparition de potentiel de jonction entre les électrolytes. En effet, lorsque deux électrolytes de compositions ioniques différentes sont mis en contact, la diffusion des ions de part et d'autre de l'interface dépend notamment de leur mobilité ionique. Cela entraîne une séparation des charges et le développement d'une différence de potentiel entre les deux solutions. La différence de potentiel entre les deux solutions, notée S et P, peut être modélisée pour N ions par l'équation généralisée de Henderson [10]:

$$E^S - E^P = \left(\frac{RT}{F} \right) S_F \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i a_i^P}{\sum_{i=1}^N z_i^2 u_i a_i^S} \right) \quad (29)$$

avec

$$S_F = \frac{\sum_{i=1}^N [z_i u_i (a_i^S - a_i^P)]}{\sum_{i=1}^N [z_i^2 u_i (a_i^S - a_i^P)]} \quad (30)$$

où u_i correspond à la mobilité de l'ion i .

En l'occurrence, le choix de l'acétate de lithium et du chlorure de potassium comme électrolyte interne permet de minimiser cet effet car ces ions possèdent une mobilité ionique relative proche (Tableau 2).

Ion	K ⁺	Cl ⁻	Li ⁺	CH ₃ COO ⁻
Mobilité relative	1,000	1,0382	0,526	0,556

Tableau 2 : Valeurs de mobilités ioniques relatives [11]

On reprend l'équation (23) :

$$EMF = \sum_i E_{PBi} \quad (23)$$

$$EMF = E_{Cu/Ag} + E_{Ag/AgCl,Cl^-} + E_{KCl/m1} + E_{m2/S} + E_{S/LiOAc} + E_{LiOAc/KCl} + E_{AgCl,Cl^-/Ag} + E_{Ag/Cu} \quad (31)$$

Où $m1$ et $m2$ sont les indices de la membrane correspondant respectivement aux interfaces membrane/électrolyte interne (KCl) et membrane/échantillon. S est l'indice correspondant à l'échantillon contenant l'ion cible I dont on veut déterminer la concentration. KCl est l'indice attribué à l'électrolyte interne de l'ISE.

Pour les raisons évoquées au-dessus, de nombreux termes sont constants et l'équation (31) se réécrit :

$$EMF = const + E_{KCl/m1} + E_{m2/S} \quad (32)$$

D'après (1),

$$\tilde{\mu}_i^{KCl} = \mu_i^{KCl} + z_i F \varphi_{KCl} = \mu_i^{0KCl} + RT \ln(c_i^{KCl}) + z_i F \varphi_{KCl} \quad (33)$$

$$\tilde{\mu}_i^{m1} = \mu_i^{m1} + z_i F \varphi_{m1} = \mu_i^{0m1} + RT \ln(c_i^{m1}) + z_i F \varphi_{m1} \quad (34)$$

Or à l'équilibre électrochimique, $\tilde{\mu}_i^{KCl} = \tilde{\mu}_i^{m1}$, et donc on a à l'interface électrolyte interne/membrane :

$$E_{KCl/m1} = \varphi_{KCl} - \varphi_{m1} = \frac{\mu_i^{0m1} - \mu_i^{0KCl}}{z_i F} + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^{m1}}{c_i^{KCl}}\right) \quad (35)$$

Un raisonnement équivalent s'applique à l'interface membrane/échantillon :

$$E_{m2/S} = \varphi_{m2} - \varphi_S = \frac{\mu_i^{0S} - \mu_i^{0m2}}{z_i F} + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^S}{c_i^{m2}}\right) \quad (36)$$

En injectant les équations (35) et (36) dans (32), on obtient :

$$EMF = const' + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^{m1}}{c_i^{m2}}\right) + \frac{RT}{z_i F} \ln(c_i^S) - \frac{RT}{z_i F} \ln(c_i^{KCl}) \quad (37)$$

En choisissant une solution interne de l'ISE suffisamment concentrée en KCl et en s'assurant de maintenir cette concentration constante, le terme $-\frac{RT}{z_i F} \ln(c_i^{KCl})$ devient lui-même constant. Cette condition est facilement respectée au laboratoire lorsque les mesures sont réalisées à court ou moyen terme. La fiabilité d'une ISE passe en effet en grande partie par une bonne maintenance. Remplacer régulièrement la solution de remplissage qui diffuse ou peut s'évaporer au cours du temps selon ses conditions de stockage permet ainsi de maintenir c_i^{KCl} constant. Il existe aujourd'hui des ISE dont la solution de remplissage est remplacée par un électrolyte solide sous forme de gel. Les risques de diffusion et d'évaporation sont alors fortement diminués et la maintenance de ce type d'ISE est aussi moins contraignante.

De plus, comme cela a déjà été évoqué précédemment, une membrane ionosensible fonctionnelle doit assurer les conditions $c_i^{m1} = const.$ et $c_i^{m2} = const.$ Cela signifie que la concentration de l'ion I libre est constante dans la membrane.

Finalement, l'équation (37) décrivant la différence de potentiel aux bornes de l'ISE et de l'électrode de référence devient :

$$EMF = const'' + \frac{RT}{z_i F} \ln(c_i^S) \quad (38)$$

Pour un ion I monovalent et à la température ambiante ($T=25^\circ\text{C}$), on obtient :

$$EMF(V) = const'' + 0,059 \log(c_i^S) \quad (39)$$

La seule variable présente dans l'équation (39) est c_i^S , la concentration de l'ion I dans l'échantillon. La différence de potentiel mesurée aux bornes de l'ISE et de l'électrode de référence suit donc la loi de Nernst : sa variation est proportionnelle au logarithme de la concentration de l'ion I dans l'échantillon. La sensibilité de l'ISE est de 59mV/pI ($pI = -\log I$) dans le cas d'une membrane idéale à 25°C.

L'ISE conventionnelle possède quelques inconvénients qui la rendent peu adaptée à l'analyse environnementale à long terme : fragilité, contraintes de maintenance, prix relativement élevé (de l'ordre de plusieurs centaines d'euros), intégration-système compliquée par ses grandes dimensions... La plupart de ces défauts est lié à la présence d'une solution interne dans l'ISE. Les prochains paragraphes se focaliseront donc sur deux autres modes de transduction « tout solide » pouvant apparaître comme une solution à ces problèmes : les ISE miniatures à contact solide et l'ISFET.

b. L'ISE à contact solide

L'ISE conventionnelle est un dispositif qu'on qualifie de symétrique car la membrane ionosensible est en contact de part et d'autre avec une solution liquide. Ce n'est pas le cas des ISE « tout solide » et ISFET qui sont des dispositifs asymétriques : la membrane est déposée directement sur un contact solide (Figure 38).

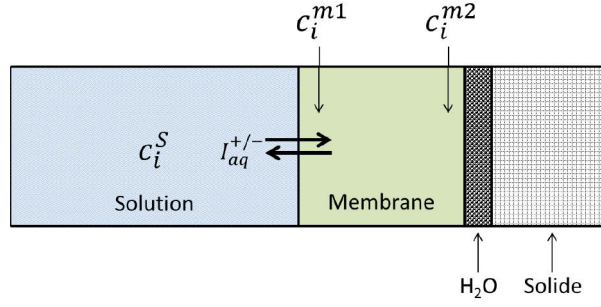


Figure 38 : structure asymétrique, type ISE à contact solide ou ISFET. La demi-pile de référence n'est pas représentée.
Adapté de [12]

Le modèle PB est à nouveau utilisé pour modéliser la réponse de la structure représentée à la Figure 38. On fait l'hypothèse d'une membrane idéale uniquement perméable aux ions cibles I. Au niveau de l'interface solution/membrane, on a en condition d'équilibre électrochimique :

$$\tilde{\mu}_i^S = \tilde{\mu}_i^{m1} \quad (40)$$

$$\text{avec} \quad \tilde{\mu}_i^S = \mu_i^S + z_i F \varphi_s = \mu_i^{0S} + RT \ln(c_i^S) + z_i F \varphi_s \quad (41)$$

$$\text{et} \quad \tilde{\mu}_i^{m1} = \mu_i^{m1} + z_i F \varphi_{m1} = \mu_i^{0m1} + RT \ln(c_i^{m1}) + z_i F \varphi_{m1} \quad (42)$$

Ainsi comme pour une ISE conventionnelle, la différence de potentiel à l'interface solution/membrane s'exprime par :

$$E_{S/m1} = \varphi_s - \varphi_{m1} = \frac{\mu_i^{0m1} - \mu_i^{0S}}{z_i F} + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^{m1}}{c_i^S}\right) \quad (43)$$

Le cas de l'interface membrane/solide nécessite d'examiner le potentiel électrochimique de l'ion I dans le contact solide $\tilde{\mu}_i^C$. Pour se placer dans un cas général, on considère que le contact n'est pas un métal en équilibre avec l'ion I qui fait l'objet de cette étude.

$$\tilde{\mu}_i^C = \alpha^{ISM} + z_i F \varphi_C \quad (44)$$

La composante chimique de l'ion I dans le contact solide est virtuelle mais le terme α^{ISM} rend compte de l'instabilité de l'interface membrane/solide, qui est affectée par la présence d'une fine couche d'eau [12]. La différence de potentiel à l'interface membrane/contact solide s'écrit donc :

$$E_{m2/c} = \varphi_{m2} - \varphi_C = \frac{\alpha^{ISM}}{z_i F} - \frac{\mu_i^{0m2}}{z_i F} - \frac{RT}{z_i F} \ln(c_i^{m2}) \quad (45)$$

On a finalement :

$$E_M = E_{S/m1} + E_{m2/c} \quad (46)$$

$$E_M = \frac{\mu_i^{0m1} - \mu_i^{0m2}}{z_i F} + \frac{RT}{z_i F} \ln\left(\frac{c_i^{m1}}{c_i^{m2}}\right) + \frac{\alpha^{ISM}}{z_i F} - \frac{\mu_i^{0S}}{z_i F} - \frac{RT}{z_i F} \ln(c_i^S) \quad (47)$$

$$E_M = \text{const} + \Delta\varphi_{as} + \frac{\alpha^{ISM}}{z_i F} - \frac{RT}{z_i F} \ln(c_i^S) \quad (48)$$

où $\Delta\varphi_{as}$ est un terme traduisant une possible asymétrie de la membrane ionosensible. Une fois encore, le fonctionnement de ce type de structure électrochimique ne sera optimal que si les conditions $c_i^{m1} = \text{const.}$ et $c_i^{m2} = \text{const.}$ sont respectées.

L'équation (48) montre que la réponse de la structure asymétrique sera similaire à celui d'une ISE conventionnelle avec, néanmoins, un facteur d'instabilité α^{ISM} non défini provenant de la couche d'eau intercalée entre la membrane et le contact solide.

Cette théorie de la couche d'eau, dont la composition peut changer en fonction de l'échantillon, pourrait en partie expliquer la mauvaise stabilité du signal des premières ISE à contact solide développées au début des années 70. Il s'agissait alors de fils métalliques simplement enrobés d'une membrane ionosensible. Différents matériaux conducteurs étaient étudiés comme le platine [13] [14], l'argent [15] ou le graphite [15]. Ce type d'interface solide/membrane donne lieu à une transduction purement capacitive sans transfert de charge ion/électron entre la membrane et le métal. Globalement, les performances de ces premières ISE étaient loin de pouvoir rivaliser avec les ISE conventionnelles. Ce n'est plus le cas aujourd'hui suite à de nombreux travaux (Figure 39) qui ont permis de mieux comprendre les mécanismes de transduction, de transport et d'accumulation de l'eau dans la membrane ainsi que d'exploiter de nouveaux matériaux utilisés comme contact solide [16].

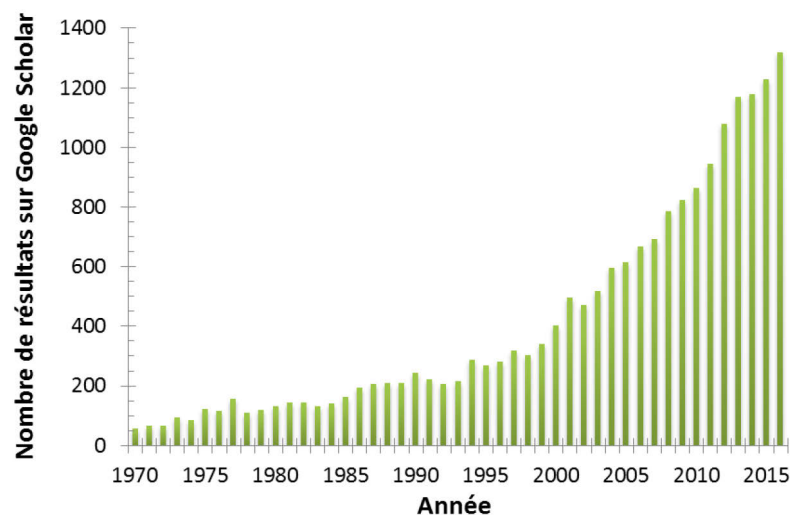


Figure 39 : Nombre de résultats par année pour les termes « solid-state ion-selective electrode » sur le moteur de recherche Google Scholar. Chiffres obtenues avec le site web <https://csullender.com/scholar/>

Nikolskii et Materova ont identifié trois conditions à remplir pour qu'une ISE à contact solide ait un potentiel stable [17]:

- (1) La transition de conductivité ionique à conductivité électrique doit être réversible et stable à l'équilibre,
- (2) les courants d'échange doivent être suffisamment élevés en comparaison avec le courant circulant pendant la mesure (celui-ci est normalement très faible en potentiométrie),
- (3) Il ne doit pas y avoir de réaction secondaire.

L'amélioration de la stabilité et la reproductibilité du potentiel des ISE à contact solide a été possible grâce à la mise en place de deux principales stratégies de transduction ion/électron : la première exploite la capacité redox d'un polymère conducteur, la seconde se base sur l'obtention d'un contact solide disposant d'une forte capacité de double couche.

i. Utilisation d'un polymère conducteur comme contact solide

L'étude de polymères conducteurs employés comme contact solide intercalé entre la membrane ionosensible et le substrat conducteur électronique a débuté dès le début des années 1990 (Figure 40). Dans la famille des polymères conducteurs, les polymères conjugués dopés ont été particulièrement étudiés dans le cadre du développement des ISE à contact solide. La transduction ion/électron dans ce type de matériau, rapide et réversible, est assez similaire à celle opérant à l'interface $\text{AgCl}_{(s)}/\text{KCl}_{(aq)}$ d'une ISE conventionnelle [18] :



L'équation (49) correspond à la réaction de dopage-p d'un polymère conjugué, où CP^+ désigne la forme oxydée du polymère dopé avec le contre-ion A^- . CP^0 correspond au polymère à l'état intrinsèque neutre.

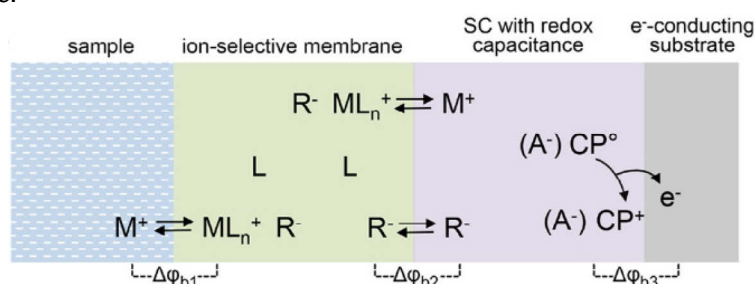


Figure 40 : Schéma du mécanisme de transduction ion/électron d'une ISE à contact solide basé sur un polymère conducteur (CP) dopé (R , A^-). Tiré de [16]

Les polymères conducteurs sont des matériaux électroactifs caractérisés à la fois par une bonne conductivité ionique et électrique ce qui en fait de bons candidats pour la transduction ion/électron à l'état solide. Parmi les polymères conjugués les plus communément utilisés comme contact solide, on trouve notamment le polypyrrole (PPy), le poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT), ou la polyaniline (PANI) représentés à la Figure 41. Ces polymères peuvent être aisément déposés par électrodéposition sur un substrat conducteur électronique ou par enduction du contact avec une solution de polymère. Ils forment d'ailleurs un contact ohmique s'ils sont déposés sur un métal noble comme l'or ou le platine [18].

Néanmoins, dans une certaine mesure, les ISE à contact solide réalisées avec des polymères conducteurs restent marquées par des problèmes de stabilité causés par l'existence de réactions redox parasites et/ou par la sensibilité au dioxyde de carbone CO_2 , au dioxygène O_2 ainsi qu'à la lumière [19].

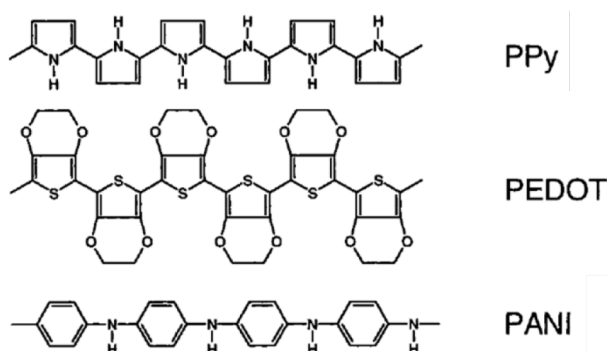


Figure 41 : Représentation des principaux polymères conducteurs utilisés comme contact solide dans les ISE. Adapté de [20]

ii. Augmentation de la capacité de double couche

Pour surmonter ces inconvénients, de nouveaux matériaux ont récemment été proposés comme transducteurs ion/électron. Contrairement aux électrodes filaires enrobées présentées précédemment, ces matériaux sont micro- ou nano-structurés afin d'offrir une très grande surface de contact, ce qui augmente la capacité de double-couche. A l'interface membrane/contact solide, le transfert direct des ions est bloqué du fait de l'absence de conduction ionique au sein du matériau solide. Il apparaît donc une séparation des charges avec, d'un côté, les cations ou anions et, de l'autre, les électrons ou trous. Cette répartition asymétrique des charges est assimilable à un condensateur, d'où le terme capacité de double-couche (Figure 42). Le potentiel $\Delta\varphi_{c2}$ à l'interface membrane/contact solide repose sur la quantité de charges dans cette double-couche. L'électrode présente le même potentiel qu'un condensateur chargé galvaniquement et la dérive temporelle s'exprime [16] :

$$\frac{\Delta E}{\Delta t} = \frac{i}{C} \quad (50)$$

D'après (50), on voit qu'une capacité d'électrode suffisamment grande est nécessaire pour obtenir une stabilité du potentiel satisfaisante, bien que le courant résiduel soit extrêmement faible en potentiométrie.

Par ailleurs, l'utilisation de matériaux hydrophobes permet de s'affranchir du problème de la couche d'eau pouvant s'intercaler entre la membrane et le contact électrique et qui est source d'instabilité et dérive du signal. Enfin, ces matériaux doivent faire preuve d'une grande stabilité chimique afin d'éviter qu'une réaction viennent parasiter le procédé de transduction ion/électron [21].

Depuis le début des années 2010, de nombreuses études sur les ISE se tournent vers les matériaux nano-structurés à base de carbone, qui sont de bons candidats puisqu'ils réunissent la plupart des propriétés désirées pour le contact solide. Des ISE ont été fabriquées à partir de noir de carbone, un matériau massivement produit par l'industrie pétrochimique, qui existe naturellement sous formes de nanoparticules formant des agrégats de 100 à 800nm [22] [23] [24]. De nombreux travaux portent également sur les nanotubes de carbone directement dispersés dans la membrane ionosensible [25] ou dans un solvant formant une encre déposée sur l'électrode [26] [27] [28]. Des études similaires ont également été menées en utilisant du graphène [29] [30] ou oxyde de graphène [31]. Hu *et al.* ont réalisé un contact solide en carbone constitué d'un réseau interconnecté de pores de 24nm de diamètre obtenu en carbonisant l'empreinte d'une solution colloïdale de nanoparticules de silices dans du brai [32]. La dérive temporelle du signal de l'ISE-K⁺ réalisée avec cette technique a été étudiée pendant 70h et s'élève à 1,3μV/h, un résultat particulièrement remarquable.

Des ISE à contact solide disposant d'une bonne stabilité du signal ont aussi été obtenues avec des métaux nobles nanostructurés tels que des nanoparticules de platine [33] ou d'or [34].

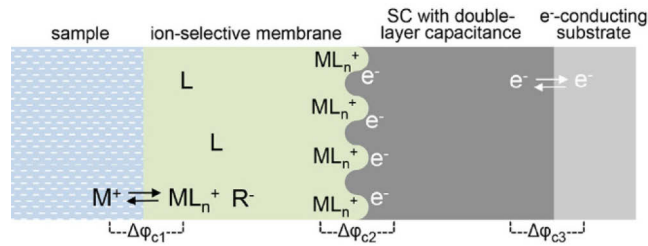


Figure 42 : Schéma du mécanisme de transduction ion/électron d'une ISE à contact solide. Une grande surface de contact donne lieu à une grande capacité de double couche. Ici, la membrane est perméable à l'ion M^+ et contient l'ionophore neutre L ainsi que le site ionique R^- . Tiré de [16]

c. Ion Sensitive Field Effect Transistor (ISFET)

Le dernier mode de transduction ion/électron présenté dans ce manuscrit est l'Ion Sensitive Field Effect Transistor (ISFET). L'ISFET est la brique technologique retenue pour le système final d'analyse du sol développé dans le cadre du projet INNOPEF-blé. La description de son fonctionnement fera donc l'objet d'une attention particulière dans les prochains paragraphes.

Un transistor à effet de champ à grille métal-oxyde (MOSFET) à canal n est constitué d'un oxyde pris en sandwich entre un substrat semi-conducteur, le silicium dopé p dans notre cas, et une électrode de grille métallique (g). Le canal de conduction situé dans le silicium, sous l'oxyde, est séparé de deux zones dopées n : la source (s) et le drain (d) (Figure 43).

Développé dans les années 1970 à l'initiative de P. Bergveld [35], l'ISFET peut être vu comme un MOSFET dont l'électrode de grille aurait été séparée du composant pour être remplacée par une électrode de référence plongée dans un liquide lui-même en contact avec l'oxyde de grille ou un isolant ionosensible recouvrant l'oxyde de grille (Figure 43). Le principe de fonctionnement de l'ISFET est donc analogue à celui du MOSFET. Le cas particulier d'un MOSFET à canal n sera tout d'abord considéré ici.

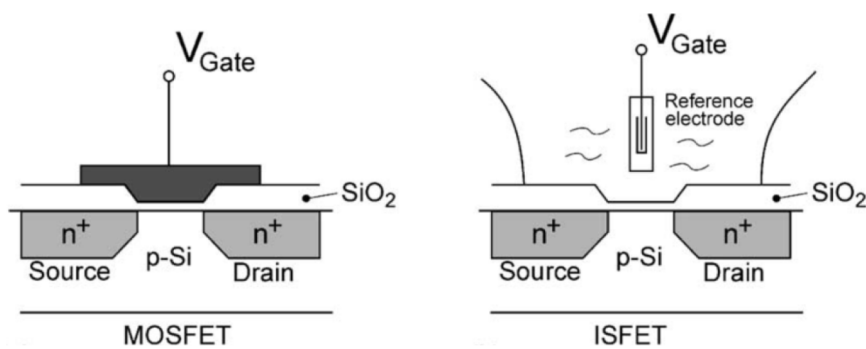


Figure 43 : Représentation schématique d'un MOSFET et d'un ISFET à canal n avec une membrane sensible en oxyde de silicium SiO_2 . Tiré de [35]

On introduit souvent le MOSFET en le présentant comme une résistance variable pilotée en tension. En effet, la densité de charges dans le canal est modulée par la tension V_{gs} appliquée entre l'électrode de grille et le semi-conducteur, séparés par l'oxyde de grille. En particulier :

- Si $V_{gs} < 0V$: régime d'accumulation. Le transistor est bloqué, il n'y a pas de conduction entre drain et source. Les trous, porteurs majoritaires, saturent le canal.

- Si $V_t > V_{gs} > 0V$: régime de déplétion. Les trous sont repoussés du canal vers le substrat. Il n'y a pas de charges libres dans le canal donc pas de courant circulant entre source et drain.
- Si $V_{gs} > V_t$ et $V_{ds} < (V_{gs} - V_t)$: régime d'inversion en mode linéaire. La tension de grille est supérieure à une tension « de seuil » V_t . Le transistor est passant. Les électrons du substrat sont attirés au voisinage de l'oxyde et conduisent le courant entre le drain et la source.
- Si $V_{gs} > V_t$ et $V_{ds} \geq (V_{gs} - V_t)$: régime d'inversion en mode saturé. Le transistor est passant mais le courant traversant le canal ne dépend plus de la tension V_{ds} mais uniquement de V_{gs} .

En mode linéaire, l'expression générale du courant I_{ds} traversant le canal d'un MOSFET entre ses zones source et drain est :

$$I_{ds} = K \left[(V_{gs} - V_t)V_{ds} - \frac{1}{2}V_{ds}^2 \right] \quad (51)$$

avec
$$K = C_{ox}\mu \frac{W}{L} \quad (52)$$

où :

- C_{ox} : la capacité de l'oxyde de grille, par unité de surface
- μ : la mobilité des électrons dans le canal n
- W et L : la largeur et longueur du canal, respectivement
- V_{gs} : la tension entre la grille et la source
- V_{ds} : la tension entre le drain et la source
- V_t : la tension de seuil du transistor MOSFET

Et V_t s'exprime :
$$V_t = \frac{\Phi_M - \Phi_{Si}}{q} - \frac{Q_{ox} + Q_{ss} + Q_{Si}}{C_{ox}} + 2\phi_f \quad (53)$$

avec :

- Φ_M : le travail de sortie du métal de grille
- Φ_{Si} : le travail de sortie du silicium
- q : la charge élémentaire ($q = 1.6 \times 10^{-19} C$)
- Q_{ox} : la densité surfacique de charge dans l'oxyde
- Q_{ss} : la densité surfacique de charge à l'interface oxyde/silicium
- Q_{Si} : la densité surfacique de charge dans le silicium
- ϕ_f : le potentiel représentant le niveau de Fermi par rapport à la bande de conduction dans le silicium

En mode saturé, I_{ds} s'exprime :

$$I_{ds} = \frac{K}{2} (V_{gs} - V_t)^2 \quad (54)$$

Dans le cas de l'ISFET, l'expression du courant drain-source I_{ds} en mode linéaire est égale à celle du MOSFET donnée à l'équation (51) mais la tension de seuil tient cette fois compte de la présence de charges ioniques adsorbées à la surface du matériau sensible:

$$V_t = E_{ref} - \Psi_0 + \chi^{sol} - \frac{\Phi_{Si}}{q} - \frac{Q_{ox} + Q_{ss} + Q_{Si}}{C_{ox}} + 2\phi_f \quad (55)$$

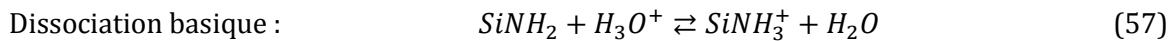
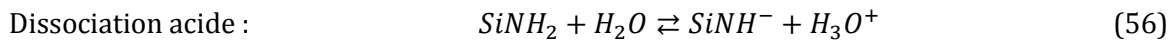
avec :

- E_{ref} : le potentiel de l'électrode de référence
- Ψ_0 : le potentiel de surface à l'interface isolant ionosensible/solution, résultant d'une réaction chimique de piégeage des ions de la solution à la surface de l'isolant ionosensible
- χ^{sol} : le potentiel de surface du solvant

Dans l'équation (55), les termes $-\frac{\Phi_{Si}}{q} - \frac{Q_{ox}+Q_{ss}+Q_{Si}}{C_{ox}} + 2\phi_f$ ne contiennent que des paramètres propres à la technologie de fabrication de l'ISFET. Ils sont donc potentiellement constants. Le terme E_{ref} correspondant au potentiel de l'électrode de référence est lui aussi, par définition, constant. De même, la valeur de χ^{sol} est constante pour un solvant donné. Finalement, la tension de seuil de l'ISFET V_t ne fait apparaître qu'une unique variable : le potentiel électrochimique Ψ_0 représentatif de la composition ionique de la solution. Ainsi, en recouvrant l'oxyde de grille par un isolant ionosensible, l'ISFET, associé à une électronique adaptée, permet de mesurer linéairement la concentration ionique de l'ion d'intérêt en solution.

La suite de cette partie sera consacrée à la mesure du pH avec l'ISFET. Il existe plusieurs matériaux sensibles au pH utilisables pour une détection par un ISFET : oxyde de silicium SiO_2 , nitrure de silicium Si_3N_4 , alumine Al_2O_3 , ou encore oxyde de tantale Ta_2O_5 . Les terminaisons amine NH_2 ou hydroxyle OH de ces matériaux leur confèrent des propriétés amphotères à leur surface, c'est-à-dire la capacité de pouvoir à la fois fournir et capter un proton H^+ (Figure 44). Le potentiel Ψ_0 dépend de la charge électrique surfacique σ_0 à l'interface isolant/électrolyte, résultat des interactions acido-basiques de surface. Ces propriétés de piégeage ont été modélisées par Bousse *et al.* via la théorie dite du « site binding » qui suppose qu'il existe une quantité discrète de sites d'interaction à la surface de l'isolant [36].

Comme le montre la Figure 44, on a, dans le cas du nitrure de silicium Si_3N_4 , les réactions acido-basiques suivantes :



On associe une constante d'équilibre K_a et K_b à ces réactions de dissociation acide et basique, respectivement :

$$K_a = \frac{[SiNH^-][H_3O^+]_s}{[SiNH_2]} \quad (58)$$

$$K_b = \frac{[SiNH_3^+]}{[SiNH_2][H_3O^+]_s} \quad (59)$$

où $[H_3O^+]_s$ représente la concentration d'ion H_3O^+ à la surface isolant/électrolyte.

$[H_3O^+]_s$ est reliée à la concentration $[H_3O^+]$ dans la solution par une équation issue de la statistique de Boltzmann :

$$[H_3O^+]_s = [H_3O^+]e^{(-q\Psi_0/kT)} \quad (60)$$

où k est la constante de Boltzmann ($k = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) et T la température absolue (K).

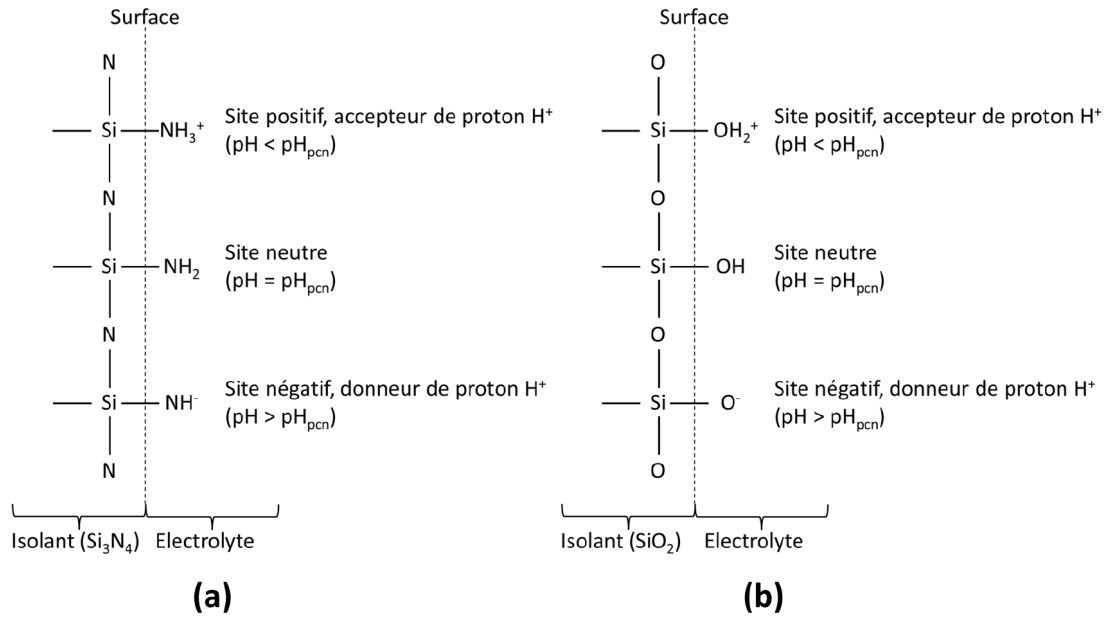


Figure 44 : Schématisation des deux types de terminaisons amphotères donnant lieu à des interactions acido-basiques à l'interface isolant/électrolyte. (a) à la surface du nitrure de silicium Si₃N₄, et (b), à la surface de l'oxyde de silicium SiO₂

Bousse *et al.* ont établi une relation reliant le pH de la solution au potentiel électrochimique Ψ_0 ainsi qu'à la charge surfacique σ_0 :

$$\ln(10) (pH_{pcn} - pH) = \frac{q\Psi_0}{kT} + \text{Argsh} \left(\frac{\sigma_0}{2qN_s} \sqrt{\frac{K_b}{K_a}} \right) \quad (61)$$

avec :

- N_s : le nombre de sites surfaciques
- pH_{pcn} : le pH de la solution pour lequel la charge surfacique σ_0 est nulle, et donc $\Psi_0 = 0$. Cette condition est réalisée lorsque le nombre de sites négatifs est égal au nombre de sites positifs, c'est-à-dire lorsque $[SiNH^-] = [SiNH_3^+]$. Le pH de la solution correspondant à cette situation est alors :

$$pH_{pcn} = -\frac{1}{2} \log \left(\frac{K_a}{K_b} \right) \quad (62)$$

Initiée par Helmholtz en 1853 [37], le modèle de la double-couche électrique de Gouy-Chapman-Stern décrit la distribution des ions à proximité d'une surface chargée électriquement exposée à un liquide, en l'occurrence proche de l'interface isolant/électrolyte. La double-couche est divisée en deux zones. La première se situe entre la surface de l'isolant et le plan interne d'Helmholtz (IHP) (Figure 45). Dans cette zone, les ions sont séparés de leur sphère de solvatation et peuvent donc s'adsorber à la surface de l'isolant. La seconde zone s'établit du plan IHP jusqu'à la première couche d'ions totalement solvatés, le plan externe d'Helmholtz (OHP) qui marque la limite extérieure de la double-couche. Au-delà du plan OHP, les ions se situent dans la couche diffuse dans laquelle leur distribution suit la statistique de Boltzmann. Ces zones se comportent donc comme des capacités en série. Ainsi, en tenant compte des phénomènes chimiques de surface propres à l'isolant et des phénomènes électrostatiques influant sur la

distribution ionique des ions à sa proximité, Bousse *et al.* ont établi une loi, similaire à la loi de Nernst :

$$\Psi_0 = \ln(10) \frac{kT}{q} \left(\frac{\beta}{\beta + 1} \right) [pH_{pcn} - pH] \quad (63)$$

avec

$$\beta = \frac{2q^2 N_s}{kT C_{eq}} \sqrt{\frac{K_{a1}}{K_{a2}}} \quad (64)$$

où C_{eq} représente la capacité équivalente par unité de surface de la jonction isolant/électrolyte.

L'introduction du terme β rend compte de la qualité intrinsèque de la couche sensible au pH. Ce terme variera selon l'isolant choisi, alumine, nitrure de silicium, oxyde de tantale, etc... En pratique, la sensibilité au pH d'un capteur ISFET est donnée à 25°C par cette dernière relation (en mV) :

$$S = \frac{d\Psi_0}{dpH} = 59,2 \left(\frac{\beta}{\beta + 1} \right) \quad (65)$$

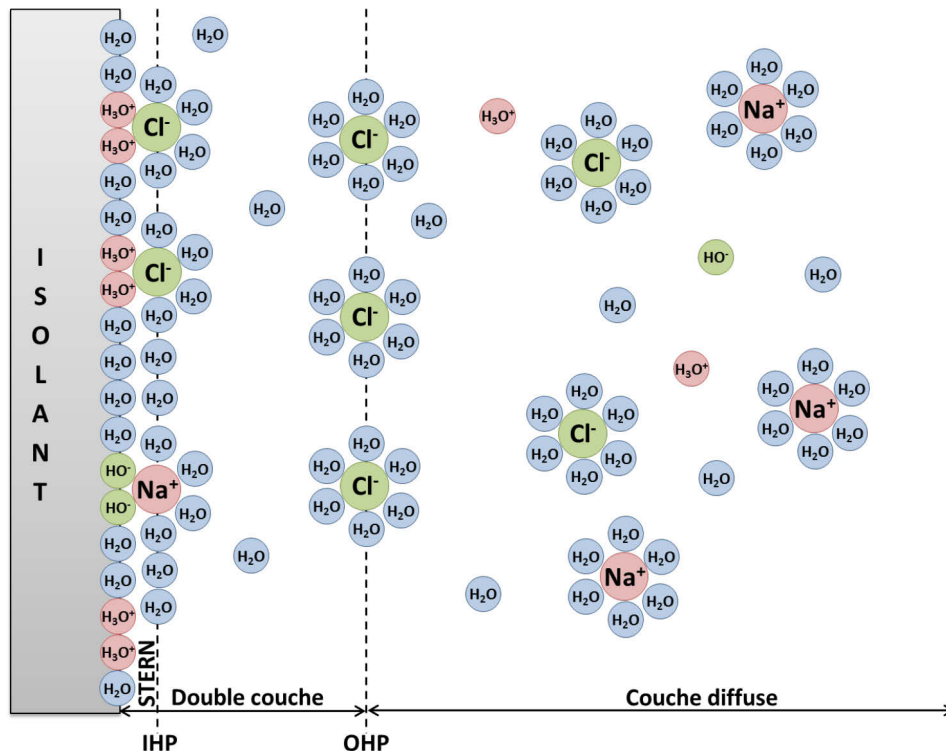


Figure 45 : Redistribution des charges à l'interface électrolyte/solide

3. Propriétés de détection

a. Sensibilité et limite de détection (LOD)

La courbe d'étalonnage d'un capteur potentiométrique représente le signal de sortie (en V ou mV) en fonction du logarithme de l'activité (ou de la concentration) de l'ion primaire (Figure 46). La sensibilité du capteur s'obtient ensuite en calculant la pente de la partie linéaire de la courbe d'étalonnage.

En dessous d'une certaine concentration en ion primaire, la pente de la réponse du capteur diminue progressivement avec la baisse de concentration, jusqu'à devenir nulle.

Plusieurs méthodes existent pour déterminer la limite de détection (LOD) des capteurs potentiométriques. La plus simple et largement acceptée est définie comme le point d'intersection des extrapolations des deux parties linéaires de la courbe de calibration (Figure 46).

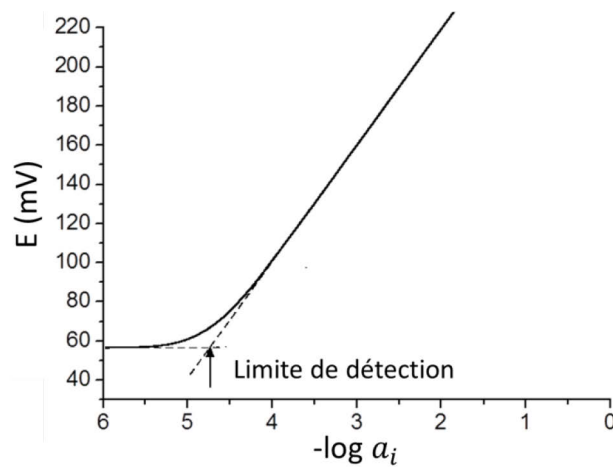


Figure 46 : Définition de la limite de détection d'un capteur potentiométrique

La baisse de sensibilité avec la diminution de concentration peut s'expliquer par une perturbation locale de la concentration de la solution engendrée par la membrane à l'interface membrane/solution. Cette perturbation peut être causée par le relargage d'une faible quantité d'ions primaires de la membrane vers la solution, créant une concentration d'ions primaires non nulle à l'interface. L'abaissement de la sensibilité peut également être causé par l'interférence des autres ions contenus dans la solution dont la concentration n'est alors plus négligeable [38].

Dans le cas d'une ISE conventionnelle, des flux d'ions sont générés à l'intérieur de la membrane en raison des différences de concentrations des solutions de part et d'autre de la membrane. En incitant le profil de concentration des ions primaires contenus dans la membrane à diminuer vers la solution interne, leur extraction vers l'analyte peut être évitée et la limite de détection améliorée. Dans le cas d'un capteur ISFET ou ISE à contact solide, il n'y a pas de réservoir interne d'ions pour maintenir les conditions d'équilibre du gradient de concentration. Il est néanmoins possible d'introduire temporairement de tels gradients en conditionnant un capteur ISFET/ISE à contact solide dans une solution qui contient seulement des ions interférents et aucun ion primaire. Ce type de conditionnement entraîne un échange entre les ions primaires de la membrane et les ions interférents de la solution. Après conditionnement, lorsque le capteur est à nouveau mis en contact avec une solution contenant peu d'ions primaires, un processus inverse se produit avec un flux d'ions primaires dirigé de la solution vers la membrane. Cela se traduit par une meilleure limite de détection [39].

b. Sélectivité

La sélectivité caractérise la capacité du capteur à distinguer l'ion primaire des autres ions. Cette propriété est particulièrement essentielle dans le cadre du projet INNOPERF-Blé puisqu'il est évident que le sol est toujours composé d'un vaste nombre d'ions présents en quantité variable. La modification de la réponse d'un capteur potentiométrique engendrée par un ion interférent dépend de la nature et de la concentration de ce dernier. Il est important que l'évaluation de la sélectivité d'un ion donné se fasse par une méthode reproductible autorisant la comparaison des résultats obtenus par différentes équipes de recherches travaillant sur

différentes membranes. Ceci est particulièrement vrai dans le cadre du développement d'une membrane afin de déterminer si les améliorations de sélectivité souhaitées ont été atteintes [40].

Dans le but de faciliter la communication scientifique, l'IUPAC a recommandé des méthodes pour la détermination d'un coefficient de sélectivité K_{ij}^{pot} témoignant de l'interférence d'un ion J sur la détermination de l'activité de l'ion primaire I [6]. Ces recommandations se basent sur l'équation étendue de Nikolskii-Eisenman:

$$E_M = const + \frac{RT}{z_i F} \ln \left(a_i + K_{ij}^{pot} a_j^{z_i/z_j} \right) \quad (66)$$

D'après l'équation (66), la sélectivité doit être quantifiée à partir de l'activité ionique. Or, dans la littérature scientifique, les changements induits par les variations de force ionique sont très souvent négligés lors de la détermination des coefficients de sélectivité [40]. Dans la pratique, ils sont donc souvent calculés directement à partir des valeurs de concentration.

De plus, les recommandations de l'UICPA insistent sur le fait que les coefficients de sélectivité ne sont vraiment significatifs que lorsque l'électrode présente une réponse quasi-Nernstienne aux ions primaires et interférents.

Il existe un grand nombre de méthodes pour la détermination des coefficients de sélectivité. L'usage d'une méthode plutôt qu'une autre fait encore débat dans la communauté scientifique. Certaines publications récentes proposent encore de nouvelles méthodes pour corriger l'influence de certains paramètres comme le temps ou le conditionnement du capteur [41]. Dans cette partie, seules les méthodes proposées par l'IUPAC seront présentées. Ces méthodes peuvent être regroupées en deux catégories :

- « Fixed Interference Methods » (FIM) : la détermination de la sélectivité se fait dans une solution contenant simultanément l'ion primaire et l'ion interférent.
- « Separate Solution Methods » (SSM) : la détermination de la sélectivité se fait successivement dans des solutions où l'ion primaire et l'ion interférent sont séparés.

i. Fixed Interference Method (FIM)

La réponse du capteur est mesurée dans une solution contenant un ion interférent dont l'activité a_j est constante tandis que l'on fait varier l'activité a_i de l'ion primaire. On trace ensuite la variation du potentiel électrique mesuré en fonction du logarithme de l'activité de l'ion primaire a_i . L'intersection de l'extrapolation des parties linéaires de cette courbe indique la valeur de a_i à utiliser pour calculer K_{ij}^{pot} à partir de l'équation (Figure 47):

$$K_{ij}^{pot} = \frac{a_i}{a_j^{z_i/z_j}} \quad (67)$$

où z_i et z_j sont respectivement la valence de l'ion primaire et de l'ion interférent.

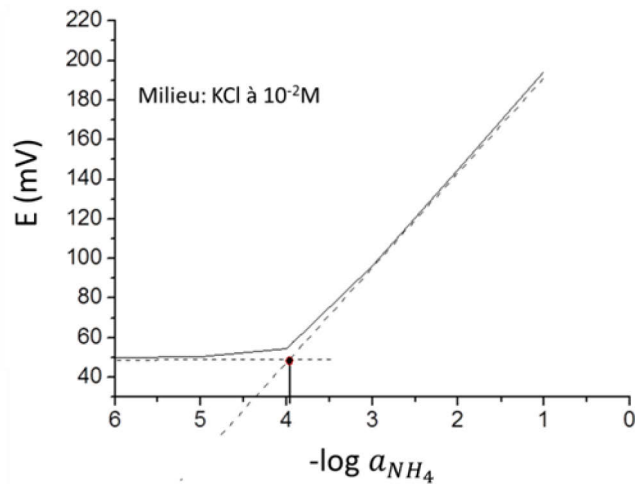


Figure 47 : Exemple de la détermination du coefficient de sélectivité envers l'ion chlorure Cl⁻ pour un capteur d'ammonium

Dans la présentation des coefficients obtenus avec cette méthode, il est important de spécifier quelle était l'activité de l'ion interférent.

ii. Separate Solution Method (SSM)

Le potentiel électrique E_i du capteur est mesuré successivement dans une solution contenant uniquement l'ion primaire I d'activité a_i . Le potentiel électrique E_j est ensuite mesuré dans une autre solution contenant uniquement l'ion interférent J d'activité a_j , telle que $a_j = a_i$. Le logarithme du coefficient de sélectivité K_{ij}^{pot} peut alors être calculé à partir de l'équation suivante :

$$\log K_{ij}^{pot} = \frac{(E_j - E_i)z_i F}{2,303RT} + \left(1 - \frac{z_i}{z_j}\right) \log a_i \quad (68)$$

iii. Separate Solution Method (SSM) II

Le potentiel électrique E_i du capteur est d'abord mesuré dans une solution contenant uniquement l'ion primaire I d'activité a_i . Puis, le capteur est placé dans une solution contenant uniquement l'ion interférent J dont on fait varier l'activité a_j jusqu'à obtention d'un potentiel E_j tel que $E_j = E_i$. Après avoir déterminé la valeur de l'activité a_j donnant lieu à cette égalité, on peut calculer le coefficient K en utilisant l'équation ci-dessous :

$$K_{ij}^{pot} = \frac{a_i}{a_j^{z_i/z_j}} \quad (69)$$

Quelques éléments théoriques ont été introduits dans ce chapitre afin de décrire le comportement électrique attendu d'une structure ISE ou ISFET recouverte d'un matériau ionosensible pouvant être une membrane polymérique ou un matériau inorganique tel que le nitrure de silicium Si₃N₄. Les prochaines parties tenteront d'expliquer plus concrètement comment réaliser une membrane polymérique ionosensible disposant de propriétés de détection satisfaisantes. Pour rappel, dans le cadre du projet INNOPERF-blé, nous souhaitons développer des microcapteurs ISFET pour la détection du pH, de l'ion ammonium NH₄⁺ et de l'ion nitrate NO₃⁻ du sol. La détection de ses deux derniers ions est réalisée par

fonctionnalisation des puces génériques pH-ISFET en déposant une membrane polymérique ionosensible.

4. Les constituants d'une membrane polymérique ionosensible

Dans les années 1960, Moore et Pressman découvrent que le transport du potassium K^+ à travers la membrane lipidique de mitochondries est assuré par un agent complexant, la valinomycine [42] (Figure 48a). Cette décennie est également marquée par de grandes avancées en synthèse de nouvelles molécules de reconnaissance moléculaire basées sur des interactions non covalentes. Les travaux de Pedersen sur les éther couronnes sont notamment récompensés par le prix Nobel de chimie [43]. Ces découvertes ouvrent la voie à la détection potentiométrique d'ions que les ISE de l'époque, faites de verre ou de composés cristallins (chlorure d'argent $AgCl$, trifluorure de lanthane LaF_3), ne pouvaient pas analyser. Les premières membranes ionosensibles sont alors réalisées en faisant infuser un matériau poreux dans un solvant organique contenant l'ionophore [8].

Les membranes polymériques ionosensibles présentées dans cette partie se basent toutes sur une détection réversible par un ionophore incorporé avec des sites ioniques au sein d'une matrice de polymère non miscible à l'eau (Figure 48b). Les rôles de ces différents constituants seront détaillés dans les prochains paragraphes.

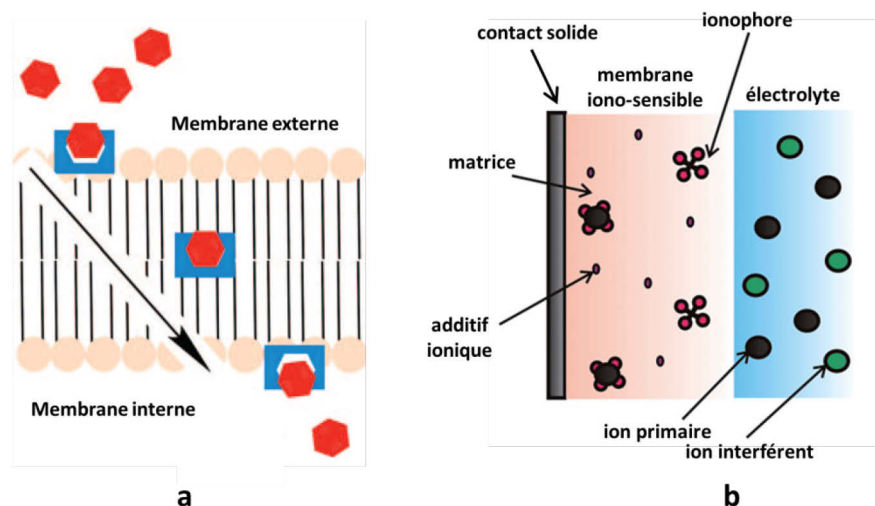


Figure 48 : (a) Composition schématique d'une membrane ionosensible. Adapté de [44]. (b) Illustration du mécanisme de transport ionique transmembranaire par un ionophore comme la valinomycine. Adapté de [45]

a. Matrice et plastifiants

Pour être fonctionnelle, la membrane ionosensible doit être dans un état pseudo-liquide ou caoutchouteux. La matrice doit former une solution dans laquelle l'ionophore, dans sa forme libre et complexée à l'ion cible, ainsi que les additifs ioniques sont dissouts [46]. Leur précipitation dans la matrice doit être évitée [8]. Toutes ces molécules doivent pouvoir se déplacer librement dans la matrice, comme elles le font dans un solvant organique non miscible à l'eau. D'autre part, la capacité de la matrice à éviter l'éluion de ses constituants actifs est primordiale pour garantir une membrane ionosensible de durée de vie suffisante.

Le polychlorure de vinyle (PVC) est, de loin, le polymère le plus communément employé comme matrice d'accueil de l'ionophore. Le PVC a une température de transition vitreuse de l'ordre de $80^{\circ}C$. Sa rigidité à température ambiante ne permet pas de bonnes mobilités ionique

et moléculaire, ce qui ne le rend pas adéquat, en tant que tel, à l'élaboration de membranes ionosensibles. Le PVC retrouve des propriétés physiques compatibles lorsqu'il est mélangé à un plastifiant. Les plastifiants sont des liquides de plus faible poids moléculaire et complètement miscibles dans le PVC. Ils sont utilisés pour diminuer sa température de transition vitreuse. Typiquement, les pourcentages massiques pour la réalisation d'une matrice adaptée sont de 33%_m de PVC contre 66%_m de plastifiant [47]. Les plastifiants les plus couramment employés dans les membranes-PVC sont le 2-nitrophenyl octyl ether (o-NPOE) et le dioctyl sebacate (DOS) (Figure 49).

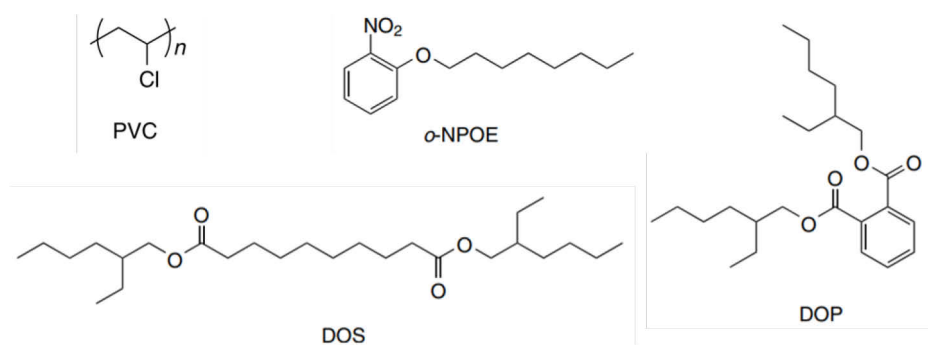


Figure 49 : PVC et plastifiant utilisés dans l'élaboration des membranes ionosensibles en matrice PVC

Le PVC est le polymère standard pour la fabrication de membranes ionosensibles pour les ISE, cependant, son adhésion sur l'isolant de grille des ISFET n'est pas bonne. Le décollement de la membrane réduit fortement la durée de vie des ISFET en matrice PVC à seulement quelques jours voire quelques heures [48]. Différents polymères ont donc été étudiés pour remplacer l'usage du PVC, notamment le polysiloxane, le polyacrylate ou le polyuréthane (Figure 50).

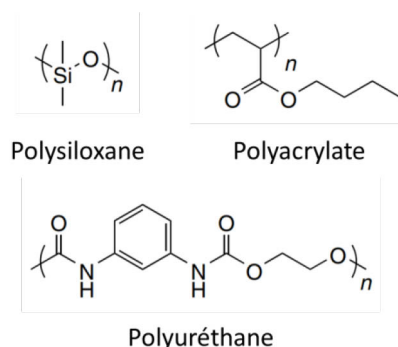


Figure 50 : Les matrices de polymères communément employées pour l'élaboration des membranes sensibles. Adapté de [8]

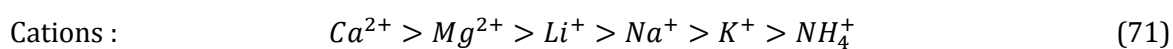
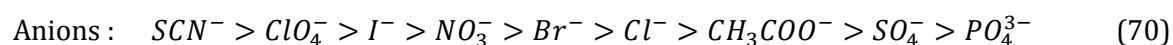
Par ailleurs, le choix d'un polymère, et si besoin d'un plastifiant, n'agit pas seulement sur les propriétés mécaniques de la membrane sensible. Il impacte également sa constante diélectrique et cela se répercute sur ses propriétés de sélectivité. La constante diélectrique ϵ caractérise la capacité d'un matériau à se polariser en réponse à l'application d'un champ électrique. Plus un polymère est polaire, plus sa constante diélectrique est grande. La géométrie de ses chaînes détermine en grande partie la polarité d'un polymère selon que les moments dipolaires se renforcent ou s'annulent [49]. Le PVC est relativement polaire ($\epsilon \approx 3,2$) mais ce sont les propriétés diélectriques du plastifiant, présent à plus de 60%_m dans la matrice, qui influenceront surtout la sélectivité. Ainsi, Mendrecki *et al.* ont montré qu'un changement de

plastifiant, ou liquide ionique utilisé comme plastifiant, permet de modifier la constante diélectrique de membranes PVC d'un facteur pouvant aller jusqu'à plus de 10 (Tableau 3) [50]. En conséquence, les auteurs ont exploité cette propriété comme levier pour modifier les coefficients de sélectivité des membranes envers l'ion iodure I⁻.

Composition de la membrane	Constante diélectrique
33% PVC, 66% DOS	13 ± 1
33% PVC, 66% o-NPOE	23,6 ± 0,5
33% PVC, 66% [P _{6,6,6,14}][DBS]	40,0 ± 0,4

Tableau 3 : Constante diélectrique de la membrane ionosensible en fonction du plastifiant. [P_{6,6,6,14}][DBS] correspond au liquide ionique trihexyl(tetradecyl)phosphoniumdodecyl benzenesulfonate. Valeurs tirées de [50]

Ce lien entre sélectivité et propriétés diélectriques de la matrice provient du fait que l'énergie d'hydratation des ions augmente suivant l'ordre établi par la série d'Hofmeister (Equations (70) et (71)) [51] [52] [53]. Le rapport taille / charge ionique dicte la taille de la couche d'hydratation. Les membranes à faible valeur de constante diélectrique favorisent l'extraction d'ions plus lipophiles tels que les perchlorates ClO₄⁻. Lorsque l'hydrophilie globale de ces membranes augmente (ϵ supérieure), la réponse sélective favorise les ions plus hydrophiles. Une constante diélectrique entre 4 et 15 serait à priori souhaitable pour séparer significativement les paires d'ions à l'interface solution/membrane [48].



Il est possible de modifier la constante diélectrique d'un polymère ne nécessitant pas de plastifiant, comme le polysiloxane, en jouant sur le type de groupes fonctionnels. Par exemple, en remplaçant, un groupe méthyle CH₃ du polydiméthylsiloxane (PDMS) par le groupe polaire trifluoropropyl CH₂CH₂CF₃, la constante diélectrique à 100Hz du polymère passe de 2,86 à 6,85 (Figure 51a et b) [54]. On obtient alors un fluorosilicone, dont les propriétés ne doivent pas être confondues avec celles des fluoropolymères. Dans le premier cas, le groupe fluoré polaire ajouté entraîne l'augmentation globale de la polarité et de l'hydrophilie du polymère alors que les fluoropolymères, tel que le polytétrafluoroéthylène (PTFE, Figure 51c), comptent eux parmi les phases condensées connues les moins polaires et les plus hydrophobes [55]. Ces propriétés des fluoropolymères proviennent de leur extrême symétrie locale faisant intervenir des liaisons C-F très peu polarisables. L'utilisation de composés perfluorés comme membrane sensible a notamment été étudiée par Boswell *et al.* comme moyen de réduire la biocontamination dans le cadre des applications environnementales ou médicales [55]. Le terme biocontamination désigne le phénomène de formation de biofilm à la surface de matériau, qui, dans le cas des capteurs, peut nuire à leur capacité de détection.

Enfin, la conductivité électrique de la matrice doit être suffisamment grande pour, qu'*in fine*, le temps de réponse du capteur ne soit pas trop long. La conductivité peut néanmoins être augmentée par l'ajout de sites ioniques dans la matrice.

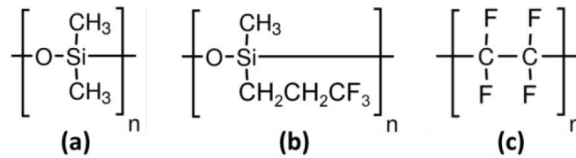


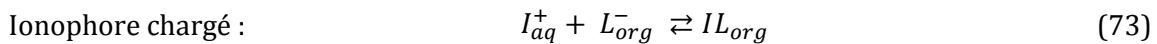
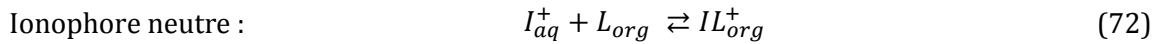
Figure 51 : (a) le polydiméthylsiloxane (PDMS), (b) le polytrifluoropropylméthylsiloxane et (c), le polytétrafluoroéthylène (PTFE)

Sur la base des travaux de thèse de Monsieur Arnaud Cazalé, nous avons choisi d'élaborer les membranes ionosensibles du projet INNOPERF-Blé avec une matrice en fluoropolysiloxane [12]. Ce type de polymère possède une excellente adhésion sur la grille des pH-ISFET tout en garantissant un faible temps de réponse.

b. Ionophore

L'ionophore, littéralement « porteur d'ion », est le principal responsable de la sensibilité et de la sélectivité de la membrane ionosensible. Les ionophores sont des récepteurs moléculaires qui forment des complexes réversibles avec une espèce ionique spécifique, anion ou cation. Il en existe deux principales catégories : les ionophores neutres et les ionophores chargés (Figure 52a et b). Ils prennent généralement la forme d'un composé macrocyclique contenant des cavités ou des semi-cavités qui entourent l'ion cible. La sélectivité provient en partie des différences de force de liaison entre l'ionophore et les ions complexés [56].

Pour un ionophore L_{org} situé dans la membrane et un ion I_{aq}^+ dans la phase aqueuse, on a ainsi les réactions de complexation suivante :



On peut ajouter une troisième catégorie : les composés sensibles échangeurs d'ions. Il s'agit de sels ioniques se présentant sous forme d'un ion hydrophobe polyatomique non-échangeable relié à un contre-ion hydrophile échangeable (Figure 52c). Ces derniers ne sont pas des ionophores à proprement parler car il n'y a pas d'interaction d'inclusion spécifique de l'ion à détecter. La sélectivité de la réponse de la membrane dépend alors uniquement des énergies d'hydratation des ions en solution suivant les séries d'Hofmeister (Equations (70) et (71)).

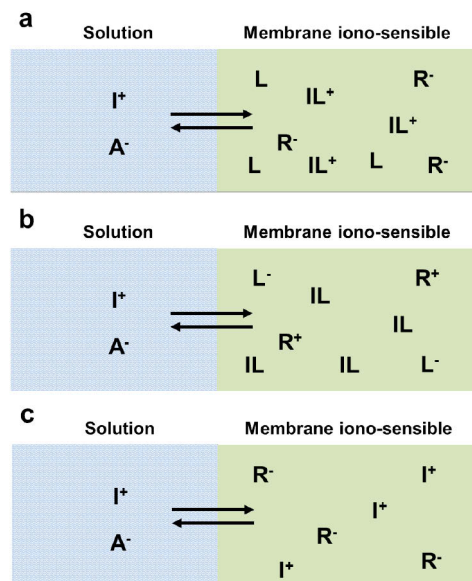


Figure 52 : Schéma de l'équilibre solution/membrane sensible dans le cas d'une détection cationique par un ionophore neutre (a), par un ionophore chargé (b), ou par une membrane échangeuse d'ion (c). Adapté de [47]

i. Ionophores de l'ion ammonium NH_4^+

Découvert dans les années 1960, l'ionophore de l'ion ammonium NH_4^+ le plus utilisé aujourd'hui est la nonactine (Figure 53a), aussi appelé « ammonium ionophore I » [57]. Il s'agit d'un antibiotique de structure macrocyclique naturellement produit par des bactéries mais que l'on sait également synthétiser [58]. La nonactine est un porteur neutre pouvant notamment se complexer avec les cations alcalins potassium K^+ et sodium Na^+ . La sélectivité à ces ions est respectivement 10 fois et 100 fois inférieure à celle de l'ammonium [8]. La forte interférence avec les ions K^+ s'explique par le fait que K^+ et NH_4^+ ont un rayon ionique très similaire.

Plusieurs équipes ont travaillé sur la synthèse de nouveaux ionophores dans le but de diminuer l'interférence des ions alcalins lors de la détection de l'ammonium [59][60][61]. Les résultats les plus remarquables ont été obtenus avec l'ionophore TD19C6, également appelé « ammonium ionophore III » dans la littérature scientifique, ainsi qu'avec l'ionophore TD20C6. Tous deux ont été synthétisés par K. Suzuki *et al.* au début des années 2000 [62] [63]. Ces ionophores sont des molécules macrocycliques de type éther couronne. La couronne a une dimension adaptée à l'accueil de l'ion NH_4^+ . L'amélioration de la sélectivité provient de la présence d'unités de blocage moléculaire qui empêchent la formation d'un complexe ion-ionophore avec les ions alcalins de taille différente à celle de l'ammonium (Figure 53b et c). Ces unités augmentent également le caractère lipophile de la molécule assurant une meilleure intégration à la matrice polymérique.

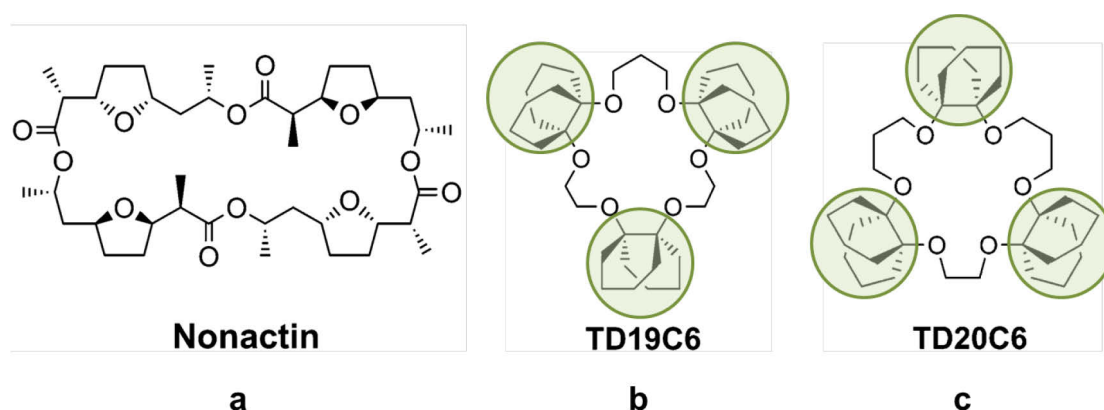


Figure 53 : Les ionophores nonactine (a), ainsi que les ionophores TD19C6 et TD20C6 synthétisés par K. Suzuki *et al.* Les unités de blocages permettant l'augmentation de sélectivité sont entourées en vert

Les coefficients de sélectivité obtenus par Suzuki *et al.* en intégrant ces ionophores à des matrices PVC montées sur des ISE conventionnelles ont été comparés à ceux de la nonactine. Ils montrent que (Figure 54) :

- **Ionophore TD19C6** : la sélectivité envers les ions K^+ est restée rigoureusement la même que pour la nonactine. La sélectivité a été améliorée d'environ une décade pour les ions sodium Na^+ et calcium Ca^{2+} . En revanche, elle a baissé de plus d'une décade en ce qui concerne les ions lithium Li^+ .
- **Ionophore TD20C6** : La sélectivité envers les ions K^+ a été améliorée d'environ une demi-décade. Il n'y a pas eu de changement significatif pour les ions Na^+ et magnésium Mg^{2+} . Cependant, la sélectivité des ions Li^+ a chuté de plus de deux décades quand celle des ions Ca^{2+} a été améliorée d'environ une décade.

En vue d'une application à l'agriculture, la sélectivité envers les ions potassium importe beaucoup car c'est un nutriment essentiel pour les cultures. Sa concentration est susceptible de varier au cours du temps suivant l'épandage d'engrais. On constate ici que seul l'ionophore TD20C6 a permis une légère amélioration de la sélectivité envers le potassium. Contrairement au TD19C6, cet ionophore n'est malheureusement pas commercialisé à ce jour. Il y a donc finalement peu d'alternatives à la nonactine pour le développement de membrane sensible à l'ammonium. Nous avons donc choisi pour le projet INNOPERF-Blé de développer les membranes sensibles en utilisant la nonactine.

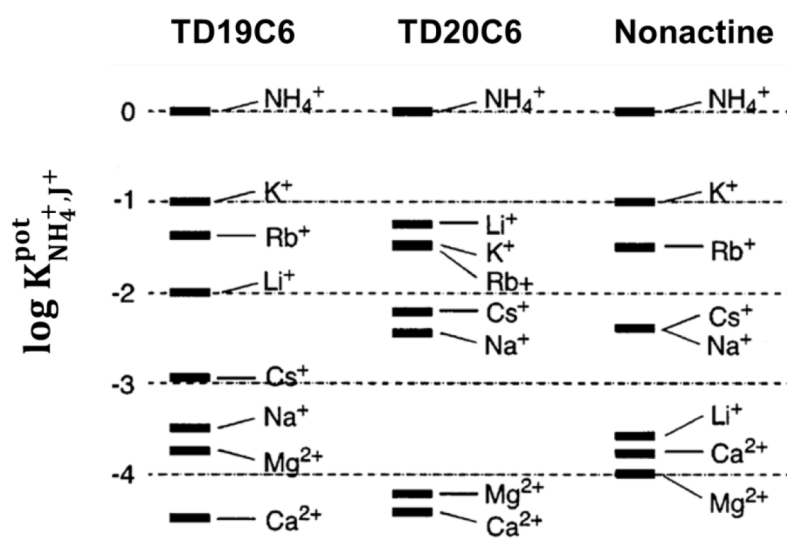


Figure 54 : Coefficients de sélectivité pour les ionophores TD19C6, TD20C6 et nonactine, obtenus par K. Suzuki *et al.* sur des ISE en membrane PVC. Adapté de [62]

ii. Ionophores de l'ion nitrate NO_3^-

Contrairement à l'ion ammonium NH_4^+ , il existe une multitude de composés sensibles pour la réalisation de membranes sensibles à l'ion nitrate NO_3^- , incluant des ionophores neutres ou des sels ioniques échangeurs d'ions. De très nombreux capteurs potentiométriques ont été développés en utilisant ces composés, notamment des années 1990 à aujourd'hui. Devant ce large panel d'études scientifiques, une sélection non-exhaustive est proposée en Tableau 4. Ces travaux ont été choisis, soit en raison de la similitude du domaine d'application par rapport à notre projet, soit en raison de la qualité des résultats obtenus en ce qui concerne la sélectivité ou la durée de vie pour l'application au suivi environnemental des ions nitrates. L'une des principales problématiques dans l'élaboration des membranes sensibles aux nitrates est de minimiser l'interférence des ions chlorures Cl^- . Cette interférence s'explique par leur énergie d'hydratation qui est proche de celle des nitrates NO_3^- . Or les ions Cl^- sont très susceptibles d'être présents en concentrations importantes dans l'environnement.

La plupart des composés échangeurs d'ions (Figure 52c) pour la détection des ions nitrates appartiennent à la famille des sels d'ammonium quaternaires (Figure 55a). Leur structure se caractérise par un atome d'azote chargé positivement attaché de manière covalente à quatre groupes alkyles, et relié à un anion hydrophile échangeable. La complexation avec l'ion nitrate est créée par interaction électrostatique avec l'ammonium quaternaire chargé positivement. Comme précédemment indiqué, la sélectivité obtenue avec ces composés dépend essentiellement de l'énergie d'hydratation des ions en solution. Les sels

tridodecylmethylammonium nitrate et tetradodecylammonium nitrate sont les composés les plus étudiés (Figure 55b et c, respectivement).

La détection spécifique des anions en phase aqueuse est possible à condition de surmonter le mécanisme d'échange ionique basé sur la lipophilie. L'ionophore doit être capable de générer des interactions avec l'ion cible de plus grande amplitude que l'énergie d'hydratation afin de rendre la liaison thermodynamiquement favorable [64]. L'ion nitrate a une faible capacité à former des complexes et la conception d'un ionophore doit donc être basée sur une complémentarité à la fois à la forme et à la taille de l'anion [65]. En 2007, Watt *et al.* sont parvenus à synthétiser un ionophore neutre, la molécule (9,11,20,22-tetrahydrotetrabenzod[f,k,m][1,3,8,10]tetraazacyclotetradecine-10,21-dithione) (Figure 56) [66]. L'arrangement de cette molécule cyclique permet la formation de liaisons hydrogène entre les atomes d'oxygène de l'ion nitrate NO_3^- et les deux groupes fonctionnels thio-urée. De plus, l'ionophore forme une cavité complémentaire à la taille du nitrate. Aussi appelé « Nitrate Ionophore V », c'est aujourd'hui l'ionophore commercialisé qui dispose de la meilleure sélectivité, notamment envers les ions chlorures Cl^- .

Devant ce large choix de molécules sensibles commercialisées, nous avons décidé de réaliser différentes formulations de membranes constituées de Nitrate Ionophore V ou de sels d'ammonium quaternaires. De bonnes propriétés de sélectivité ont déjà été obtenues lorsque ces molécules étaient intégrées à des matrices en PVC (Tableau 4). Nous étudierons s'il est également possible d'obtenir des propriétés satisfaisantes lorsque le PVC est remplacé par du fluoropolysiloxane.

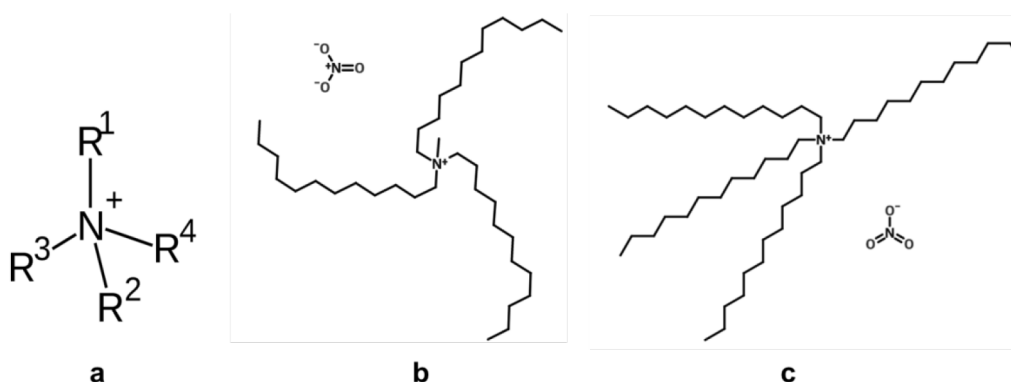


Figure 55 : (a), structure générale d'un ammonium quaternaire (sans son anion) où R est un groupe alkyle, (b), le sel tridodecylmethylammonium nitrate, et (c), le tetradodecylammonium nitrate

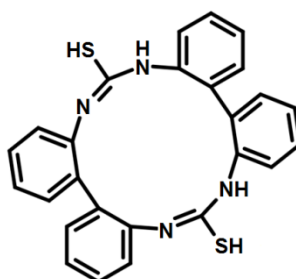


Figure 56 : La molécule (9,11,20,22-tetrahydrotetrabenzod[f,k,m][1,3,8,10]tetraazacyclotetradecine-10,21-dithione) aussi appelé « Nitrate Ionophore V »

Tableau 4 : Sélection de travaux de recherche sur l'élaboration de membranes polymériques pour la détection des nitrates. Les résultats particulièrement marquants sont notés en gras.

Année	Transducteur	Ionophore	Matrice	Additif ionique	Sensibilité (mV/ log[NO ₃ ⁻])	Sélectivité	Limite de détection (M)	Milieu d'étude	Durée de vie (mois)	Auteurs	Réf.
1995	ISFET	tetradodecylammonium nitrate	PVC et Sebacate	/	51.9	FIM Cl ⁻ : -2.9 SO ₄ ²⁻ : -3.9 H ₂ PO ₄ ⁻ : -2.6 NO ₂ ⁻ : -1.7	10μ	eaux de lac et rivière, extraits de sol	> 2	Campanella <i>et al.</i>	[67]
1996	ISFET	tetradodecylammonium bromide	fluoropoly-siloxane	potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate	56.4	FIM Cl ⁻ : -2.7 SO ₄ ²⁻ : -4.4	10μ	/	> 2	Högg <i>et al.</i>	[48]
2000	ISFET	tetradodecylammonium nitrate	PDMS à terminaison silanol	/	NC (>50)	FIM Cl ⁻ : -2.5 SO ₄ ²⁻ : -3.6 PO ₄ ³⁻ : -3.0	NC	/	> 3	Wróblewski <i>et al.</i>	[68]
2004	ISE à contact solide(Fil de platine enrobé)	<u>synthèse</u> d'un complexe tetramethylcyclotetradecanato-nickel(II)	PVC et BEHP	trioctylmethylammonium chloride	57.8	FIM Cl ⁻ : -4.3 SO ₄ ²⁻ : -4.0 NO ₂ ⁻ : -4.5 PO ₄ ³⁻ : -4.2 HPO ₄ ²⁻ : -4.5 Br ⁻ : -3.1	5μ	eaux de rivière et robinet, extraits de sol	> 4	Ardakani <i>et al.</i>	[69]
2007	ISE conventionnelle	<u>synthèse</u> d'un calixarène fonctionnalisé avec des groupée urée	PVC et o-NPOE	tridodecylmethylammonium chloride	72.8	SSM Cl ⁻ : -3.4 SO ₄ ²⁻ : -5.1 Br ⁻ : -0.1	1μ	/	NC	Schazmann <i>et al.</i>	[64]
2007	ISE à contact solide (polyimide couvert d'or puis d'argent)	<u>synthèse</u> d'argent [bis(bathophenanthroline)] nitrate	PVC et o-NPOE	/	55.1	SSM Cl ⁻ : -2 SO ₄ ²⁻ : -3.7 NO ₂ ⁻ : -1.9 PO ₄ ³⁻ : -4.3	0.8.μ	engrais et eaux usées	2	Hassan <i>et al.</i>	[70]
2007	ISE conventionnelle	nitrate Ionophore V	PVC et o-NPOE	tridodecylmethylammonium chloride	47.8	SSM Cl ⁻ : -3.5 SO ₄ ²⁻ : -4.7 NO ₂ ⁻ : -1.8 H ₂ PO ₄ ⁻ : -4.7	5.6μ	/	NC	Watts <i>et al.</i>	[66]

Année	Transducteur	Ionophore	Matrice	Additif ionique	Sensibilité (mV/ log[NO ₃])	Sélectivité	Limite de détection (M)	Milieu d'étude	Durée de vie (mois)	Auteurs	Réf.
2010	ISE à contact solide (Fil enrobé)	tetradodecylammonium bromide	PVC et o-NPOE	/	57.7	SSM Cl ⁻ : -2.42 Br ⁻ : -1.15 SO ₄ ²⁻ : -4.33 H ₂ PO ₄ ⁻ : -3.33 NO ₂ ⁻ : -1.08	0.36μ	eaux agricoles, robinet et puits	NC	Masadome <i>et al.</i>	[71]
2014	ISE à contact solide (NPs de noir de carbone sur électrode en carbone vitreux)	tridodecylmethylammonium nitrate	PVC et o-NPOE	/	>58.5	Cl ⁻ : -2.1 SO ₄ ²⁻ : -2.8 NO ₂ ⁻ : -1.4 PO ₄ ³⁻ : -2.7 CH ₃ COO ⁻ : -3.1	<7μ	/	NC	Paczosa- Bator	[23]
2014	ISE à contact solide (NPs de noir de carbone sur électrode d'or)	nitrate Ionophore V	PVC et o-NPOE	tridodecylmethylammonium chloride	59.08	SSM Cl ⁻ : -3.4 SO ₄ ²⁻ : -4.8 NO ₂ ⁻ : -1.9 CH ₃ COO ⁻ : -4.1	0.3μ	eaux de pluie, robinet et rivière	NC	Paczosa- Bator <i>et al.</i>	[22]
2015	ISE à contact solide (graphène sur électrode en carbone vitreux)	Tetradodecylammonium nitrate	PVC et o-NPOE	/	57.4	SSM Cl ⁻ : -2.4 SO ₄ ²⁻ : -4.4 H ₂ PO ₄ ⁻ : -4.4 HCO ₃ ⁻ : -3.2		extraits de sol et boue	NC	Zhang <i>et al.</i>	[72]
2016	ISE à contact solide (graphène sur électrode en carbone vitreux)	/	polypyrrole dopé aux nitrates (PPy-NO3-)	/	56.2	SSM Cl ⁻ : -2.5 SO ₄ ²⁻ : -4.3 H ₂ PO ₄ ⁻ : -5.1 HCO ₃ ⁻ : -3.7	6.3μ	sol	NC	Pan <i>et al.</i>	[73]

c. Additifs ioniques

Les additifs ioniques, dernier composant des membranes sensibles présenté dans ce manuscrit, ont une fonction cruciale dans l'obtention d'une réponse potentiométrique de type Nernstienne. Pour rappel, le potentiel à l'interface membrane/solution s'exprime comme suit :

$$(11) : \quad E_{PB} = \varphi_M - \varphi_S = const + \frac{RT}{z_i F} \ln \left(\frac{c_i^S}{c_i^M} \right)$$

D'après (11), pour que la réponse soit Nernstienne, l'activité de l'ion d'intérêt au sein de la membrane doit être constante et ne pas dépendre de la solution ($c_i^M = cte$). La seule présence de l'ionophore ne permet pas de garantir cette condition. A l'équilibre, la concentration en ion I^+ non complexé dans la membrane serait en effet directement proportionnelle à la concentration de l'ion I^+ dans la solution aqueuse [8].

Également appelés sites ioniques, les additifs ioniques sont des sels constitués d'un anion/cation hydrophobe et d'un contre-ion hydrophile échangeable. D'après le principe d'électroneutralité, il y a, au sein de la membrane, autant d'ions libres ou complexés aux ionophores que d'ions de charges opposés. Ainsi, en intégrant une concentration suffisante d'ions hydrophobes de charge opposée à l'ion primaire, on autorise alors le passage de ce dernier de la solution aqueuse vers la membrane sans permettre l'extraction simultanée du contre-ion associé [74]. Cette réduction de l'interférence du contre-ion grâce aux additifs ioniques s'appelle « l'exclusion de Donnan ». Etant données les propriétés d'échanges d'ions de ces additifs, il est important d'ajuster précisément leur concentration par rapport à celle de l'ionophore. Pour une quantité d'additif trop importante, la réponse de la membrane se rapprocherait de celle d'une membrane échangeuse d'ions (Figure 52) dont la sélectivité est principalement régie par la série d'Hofmeister.

Les additifs ioniques sont donc absolument nécessaires dans le cas des membranes basées sur des ionophores neutres afin de bloquer l'extraction des contre-ions et ainsi obtenir une réponse conforme à la théorie. En ce qui concerne les membranes à ionophores chargés, l'utilisation d'additifs ioniques reste toutefois conseillée en raison des autres avantages qu'ils apportent aux propriétés de détection [75].

Parmi les autres effets bénéfiques des additifs, il y a la réduction de la résistivité électrique de la membrane, qui contribue à la diminution du temps de réponse du capteur. De plus, les additifs abaissent la barrière d'activation de la réaction d'échange ionique à l'interface membrane/solution ce qui améliore la sensibilité [76]. Enfin, l'incorporation d'une quantité adéquate d'additifs a un impact positif sur la sélectivité de la membrane envers les ions interférents. Par exemple, une sélectivité optimale est obtenue pour la détection d'un ion primaire monovalent avec 50%_{mol} de sites ioniques par rapport à la quantité d'ionophores [47].

En pratique, des sels dérivés de tétraphénylborate sont généralement utilisés pour les membranes dédiées à la détection des cations. Ils sont composés d'un anion organique central de bore entouré de quatre groupes phényles associés à un cation alcalin (Figure 57). Dans le cas de la détection des anions, les membranes sont préparées avec des sels d'ammonium quaternaire. Cette famille de composés a déjà été présentée dans la partie 3.b.ii (p. 76).

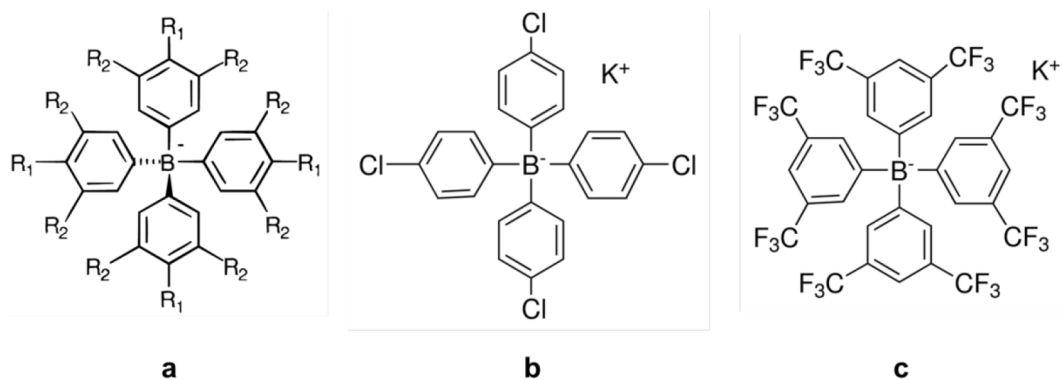


Figure 57 : (a), structure générique des tétraphénylborates utilisés dans les membranes sensibles dédiées à la détection cationique. (b), le potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTpClPB) et, (c), le potassium tetrakis[3,5-bis(trifluorométhyl)phényl]borate (KTFPB)

Conclusion

Nous avons introduit quelques éléments de théorie décrivant les différents types de capteurs potentiométriques, leur principe de fonctionnement ainsi que les méthodes permettant de les caractériser. Ces notions seront réutilisées au cours des chapitres suivants consacrés au développement et à la caractérisation des capteurs.

Trois types de capteurs ont été présentés : l'ISE conventionnelle, l'ISE « tout solide » ainsi que l'ISFET. Le développement d'un système d'analyse implanté de manière permanente sur la parcelle est un des principaux objectifs du projet INNOPERF-Blé. Il en découle une forte problématique quant à l'intégration des capteurs dans ce système. Les ISE conventionnelles ne semblent pas pouvoir y répondre en raison des problèmes de fragilité, de maintenance et de coûts liés à la présence d'un électrolyte interne liquide. En revanche, les ISFET et ISE à contact solide offrent de nombreux avantages en termes de miniaturisation, de maintenance ou encore de coûts de fabrication qui devraient rendre cette intégration possible. Nous avons finalement choisi de travailler avec les ISFET pour bénéficier de l'expertise du LAAS-CNRS concernant la fabrication et l'instrumentation de ces microcapteurs.

Une étude bibliographique a été menée dans le but d'établir les formulations des membranes ionosensibles pour la détection des ions ammonium et nitrates. L'adhésion de la membrane sur la grille du pH-ISFET est cruciale pour la durée de vie du microcapteur. Elle est essentiellement déterminée par la nature du polymère utilisé comme matrice de la membrane. Le choix des polysiloxanes, et notamment les fluoropolysiloxanes, nous paraît alors adapté. Les membranes sensibles à l'ion ammonium seront constituées de nonactine, l'unique ionophore commercialisé présentant des propriétés de sélectivité convenables. Au contraire, face aux grand nombre de molécules sensibles aux ions nitrates, nous étudierons différentes formulations de membranes jusqu'à obtention de propriétés de détection en adéquation avec les contraintes imposées pour le projet INNOPERF-Blé.

Bibliographie

- [1] J. Bobacka, A. Ivaska, and A. Lewenstam, "Potentiometric Ion Sensors," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 329–351, Feb. 2008.
- [2] E. A. Guggenheim, "The Conceptions of Electrical Potential Difference between Two Phases and the Individual Activities of Ions," *J. Phys. Chem.*, vol. 33, no. 6, pp. 842–849, Jan. 1928.
- [3] J. Jasielec, "Modelling of potentiometric ion sensors," Sep. 2013.
- [4] B. Nikolsky, "Theory of the glass electrode. I. Theoretical," *J. Phys. Chem. USSR*, no. 10, pp. 495–503, 1937.
- [11] G. Eisenman, Nat. Bur. Of Standards Spec., Publ. 314; in R.A. Durst; Ion-Selective Electrodes, Washington D.C., 1969.
- [6] R. P. Buck and E. Lindner, "Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (IUPAC Recommendations 1994)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 66, no. 12, pp. 2527–2536, 1994.
- [7] T. Sokalski, P. Lingenfelter, and A. Lewenstam, "Numerical Solution of the Coupled Nernst–Planck and Poisson Equations for Liquid Junction and Ion Selective Membrane Potentials," *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 11, pp. 2443–2452, Mar. 2003.
- [8] P. Bühlmann and L. D. Chen, "Ion-Selective Electrodes With Ionophore-Doped Sensing Membranes," in *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
- [9] M. W. Shinwari, D. Zhitomirsky, I. A. Deen, P. R. Selvaganapathy, M. J. Deen, and D. Landheer, "Microfabricated Reference Electrodes and their Biosensing Applications," *Sensors*, vol. 10, no. 3, pp. 1679–1715, Mar. 2010.
- [10] P. H. Barry, T. M. Lewis, and A. J. Moorhouse, "An optimised 3 M KCl salt-bridge technique used to measure and validate theoretical liquid junction potential values in patch-clamping and electrophysiology," *Eur. Biophys. J.*, vol. 42, no. 8, pp. 631–646, Aug. 2013.
- [11] "Ionic Mobility Tables | School of Medical Sciences." [Online]. Available: <https://medsciences.med.unsw.edu.au/research/research-services/ies/ionicmobilitytables>. [Accessed: 26-Sep-2017].
- [12] A. Cazalé, "Développement de microcapteurs chimiques intégrés pour la détection de l'ion sodium en phase liquide : application au suivi du stress physiologique," Université Toulouse 3 - Paul Sabatier, Toulouse, 2012.
- [13] R. W. Cattrall and H. Freiser, "Coated wire ion-selective electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 43, no. 13, pp. 1905–1906, Nov. 1971.
- [14] R. W. Cattrall, D. M. Drew, and I. C. Hamilton, "Some alkylphosphoric acid esters for use in coated-wire calcium-selective electrodes: Part I. Response characteristics," *Anal. Chim. Acta*, vol. 76, no. 2, pp. 269–277, Jun. 1975.
- [15] A. Hulanicki and M. Trojanowicz, "Calcium-selective electrodes with pvc membranes and solid internal contacts," *Anal. Chim. Acta*, vol. 87, no. 2, pp. 411–417, Dec. 1976.
- [16] J. Hu, A. Stein, and P. Bühlmann, "Rational design of all-solid-state ion-selective electrodes and reference electrodes," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 76, no. Supplement C, pp. 102–114, Feb. 2016.
- [17] B. P. Nikolskii and E. A. Materova, "Solid Contact in Membrane Ion-Selective Electrodes," *Ion-Sel. Electrode Rev.*, vol. 7, pp. 3–39, Dec. 1985.
- [18] J. Bobacka, "Conducting Polymer-Based Solid-State Ion-Selective Electrodes," *Electroanalysis*, vol. 18, no. 1, pp. 7–18, Jan. 2006.
- [19] T. Lindfors, "Light sensitivity and potential stability of electrically conducting polymers commonly used in solid contact ion-selective electrodes," *J. Solid State Electrochem.*, vol. 13, no. 1, pp. 77–89, Jan. 2009.

- [20] J. Bobacka, A. Ivaska, and A. Lewenstam, "Potentiometric Ion Sensors Based on Conducting Polymers," *Electroanalysis*, vol. 15, no. 5–6, pp. 366–374, Apr. 2003.
- [21] T. Yin and W. Qin, "Applications of nanomaterials in potentiometric sensors," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 51, pp. 79–86, Nov. 2013.
- [22] B. Paczosa-Bator, L. Cabaj, M. Raś, B. Baś, and R. Piech, "Potentiometric sensor platform based on a carbon black modified electrodes," *Int J Electrochem Sci*, vol. 9, pp. 2816–2823, 2014.
- [23] B. Paczosa-Bator, "Effects of type of nanosized carbon black on the performance of an all-solid-state potentiometric electrode for nitrate," *Microchim. Acta*, vol. 181, no. 9–10, pp. 1093–1099, Mar. 2014.
- [24] B. Paczosa-Bator, L. Cabaj, R. Piech, and K. Skupień, "Potentiometric Sensors with Carbon Black Supporting Platinum Nanoparticles," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 21, pp. 10255–10261, Nov. 2013.
- [25] J. Zhu, X. Li, Y. Qin, and Y. Zhang, "Single-piece solid-contact ion-selective electrodes with polymer–carbon nanotube composites," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 148, no. 1, pp. 166–172, Jun. 2010.
- [26] D. Yuan *et al.*, "All-Solid-State Potentiometric Sensors with a Multiwalled Carbon Nanotube Inner Transducing Layer for Anion Detection in Environmental Samples," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 17, pp. 8640–8645, Sep. 2015.
- [27] G. A. Crespo, S. Macho, and F. X. Rius, "Ion-Selective Electrodes Using Carbon Nanotubes as Ion-to-Electron Transducers," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 4, pp. 1316–1322, Feb. 2008.
- [28] R. Hernández, J. Riu, and F. Xavier Rius, "Determination of calcium ion in sap using carbon nanotube -based ion-selective electrodes," *Analyst*, vol. 135, no. 8, pp. 1979–1985, 2010.
- [29] R. Liang, T. Yin, and W. Qin, "A simple approach for fabricating solid-contact ion-selective electrodes using nanomaterials as transducers," *Anal. Chim. Acta*, vol. 853, pp. 291–296, Jan. 2015.
- [30] F. Li *et al.*, "All-solid-state potassium-selective electrode using graphene as the solid contact," *The Analyst*, vol. 137, no. 3, pp. 618–623, Feb. 2012.
- [31] R. Hernández *et al.*, "Reduced Graphene Oxide Films as Solid Transducers in Potentiometric All-Solid-State Ion-Selective Electrodes," *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 42, pp. 22570–22578, Oct. 2012.
- [32] J. Hu, X. U. Zou, A. Stein, and P. Bühlmann, "Ion-Selective Electrodes with Colloid-Imprinted Mesoporous Carbon as Solid Contact," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 14, pp. 7111–7118, Jul. 2014.
- [33] B. Paczosa-Bator, L. Cabaj, R. Piech, and K. Skupień, "Platinum nanoparticles intermediate layer in solid-state selective electrodes," *Analyst*, vol. 137, no. 22, pp. 5272–5277, 2012.
- [34] E. Jaworska, M. Wójcik, A. Kisiel, J. Mieczkowski, and A. Michalska, "Gold nanoparticles solid contact for ion-selective electrodes of highly stable potential readings," *Talanta*, vol. 85, no. 4, pp. 1986–1989, Sep. 2011.
- [35] P. Bergveld, "Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 88, no. 1, pp. 1–20, 2003.
- [36] L. Bousse, N. F. D. Rooij, and P. Bergveld, "Operation of chemically sensitive field-effect sensors as a function of the insulator-electrolyte interface," *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 30, no. 10, pp. 1263–1270, Oct. 1983.

- [37] H. Helmholtz, "Ueber einige Gesetze der Vertheilung elektrischer Ströme in körperlichen Leitern mit Anwendung auf die thierisch-elektrischen Versuche," *Ann. Phys.*, vol. 165, no. 6, pp. 211–233, Jan. 1853.
- [38] Z. Szigeti, T. Vigassy, E. Bakker, and E. Pretsch, "Approaches to Improving the Lower Detection Limit of Polymeric Membrane Ion-Selective Electrodes," *Electroanalysis*, vol. 18, no. 13–14, pp. 1254–1265, Jul. 2006.
- [39] A. Bratov, N. Abramova, and C. Domínguez, "Lowering the detection limit of calcium selective ISFETs with polymeric membranes☆," *Talanta*, vol. 62, no. 1, pp. 91–96, Jan. 2004.
- [40] C. Maccà, "The Current Usage of Selectivity Coefficients for the Characterization of Ion-Selective Electrodes. A Critical Survey of the 2000/2001 Literature," *Electroanalysis*, vol. 15, no. 12, pp. 997–1010, Jul. 2003.
- [41] V. V. Egorov, E. A. Zdrachek, and V. A. Nazarov, "Improved Separate Solution Method for Determination of Low Selectivity Coefficients," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 8, pp. 3693–3696, Apr. 2014.
- [42] C. Moore and B. C. Pressman, "Mechanism of action of valinomycin on mitochondria," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 15, no. 6, pp. 562–567, May 1964.
- [43] C. J. Pedersen, "Cyclic polyethers and their complexes with metal salts," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 89, no. 26, pp. 7017–7036, Dec. 1967.
- [44] K. Melzer, A. M. Münzer, E. Jaworska, K. Maksymiuk, A. Michalska, and G. Scarpa, "Selective ion-sensing with membrane-functionalized electrolyte-gated carbon nanotube field-effect transistors," *Analyst*, vol. 139, no. 19, pp. 4947–4954, 2014.
- [45] E. M. Peck and B. D. Smith, "Chapter 1: Applications of Synthetic Receptors for Biomolecules," in *Synthetic Receptors for Biomolecules*, 2015, pp. 1–38.
- [46] R. D. Armstrong and G. Horvai, "Properties of PVC based membranes used in ion-selective electrodes," *Electrochimica Acta*, vol. 35, no. 1, pp. 1–7, Jan. 1990.
- [47] E. Bakker, P. Bühlmann, and E. Pretsch, "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics," *Chem. Rev.*, vol. 97, no. 8, pp. 3083–3132, Dec. 1997.
- [48] G. Högg, O. Lutze, and K. Cammann, "Novel membrane material for ion-selective field-effect transistors with extended lifetime and improved selectivity," *Anal. Chim. Acta*, vol. 335, no. 1–2, pp. 103–109, 1996.
- [49] Z. Ahmad, "Polymer Dielectric Materials," 2012.
- [50] L. Mendecki, N. Callan, M. Ahern, B. Schazmann, and A. Radu, "Influence of Ionic Liquids on the Selectivity of Ion Exchange-Based Polymer Membrane Sensing Layers," *Sensors*, vol. 16, no. 7, Jul. 2016.
- [51] Y. Zhang and P. S. Cremer, "Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 658–663, Dec. 2006.
- [52] Y. Zhang, S. Furyk, D. E. Bergbreiter, and P. S. Cremer, "Specific Ion Effects on the Water Solubility of Macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister Series," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 41, pp. 14505–14510, Oct. 2005.
- [53] M. G. Cacace, E. M. Landau, and J. J. Ramsden, "The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 30, no. 3, pp. 241–277, Aug. 1997.
- [54] M. Andriot *et al.*, "Silicones in industrial applications," *Inorg. Polym.*, pp. 61–161, 2007.
- [55] P. G. Boswell, E. C. Lugert, J. Rábai, E. A. Amin, and P. Bühlmann, "Coordinative Properties of Highly Fluorinated Solvents with Amino and Ether Groups," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 48, pp. 16976–16984, Dec. 2005.

- [56] F. Faridbod, M. R. Ganjali, R. Dinarvand, and P. Norouzi, "The fabrication of potentiometric membrane sensors and their applications," *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 6, no. 25, Jan. 2007.
- [57] B. T. Kilbourn, J. D. Dunitz, L. A. R. Pioda, and W. Simon, "Structure of the K⁺ complex with nonactin, a macrotetrolide antibiotic possessing highly specific K⁺ transport properties," *J. Mol. Biol.*, vol. 30, no. 3, pp. 559–563, Dec. 1967.
- [58] Y. Y. Lee and B. H. Kim, "Total synthesis of nonactin," *Tetrahedron*, vol. 52, no. 2, pp. 571–588, Jan. 1996.
- [59] J. S. Benco, H. A. Nienaber, and W. G. McGimpsey, "Synthesis of an Ammonium Ionophore and Its Application in a Planar Ion-Selective Electrode," *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 1, pp. 152–156, Jan. 2003.
- [60] N. Wanichacheva, "Design and Synthesis of Ionophores and Fluoroionophores for the Detection of Lithium and Ammoniums ions," Worcester Polytechnic Institute, 2006.
- [61] null Chin *et al.*, "A Rational Approach to Selective Recognition of NH₄⁽⁺⁾ over K⁽⁺⁾," *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 38, no. 18, pp. 2756–2759, Sep. 1999.
- [62] S. Sasaki *et al.*, "Comparison of Two Molecular Design Strategies for the Development of an Ammonium Ionophore More Highly Selective than Nonactin," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 18, pp. 4845–4848, Sep. 2002.
- [63] K. Suzuki *et al.*, "Design and Synthesis of a More Highly Selective Ammonium Ionophore Than Nonactin and Its Application as an Ion-Sensing Component for an Ion-Selective Electrode," *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 10, pp. 2200–2205, May 2000.
- [64] B. Schazmann and D. Diamond, "Improved nitrate sensing using ion selective electrodes based on urea – calixarene ionophores," *New J. Chem.*, vol. 31, no. 4, pp. 587–592, 2007.
- [65] L. F. Capitán-Vallvey, E. Arroyo-Guerrero, M. D. Fernández-Ramos, and F. Santoyo-Gonzalez, "Disposable Receptor-Based Optical Sensor for Nitrate," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 14, pp. 4459–4466, Jul. 2005.
- [66] A. S. Watts, V. G. Gavalas, A. Cammers, P. S. Andrada, M. Alajarín, and L. G. Bachas, "Nitrate-selective electrode based on a cyclic bis-thiourea ionophore," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 121, no. 1, pp. 200–207, Jan. 2007.
- [67] L. Campanella, C. Colapicchioni, G. Crescentini, M. P. Sammartino, Y. Su, and M. Tomassetti, "Sensitive membrane ISFETs for nitrate analysis in waters," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 27, no. 1, pp. 329–335, Jun. 1995.
- [68] W. Wróblewski, M. Chudy, and A. Dybko, "Nitrate-selective chemically modified field effect transistors for flow-cell applications," *Anal. Chim. Acta*, vol. 416, no. 1, pp. 97–104, Jul. 2000.
- [69] M. M. Ardakani, A. Dastanpour, and M. Salavati-Niasari, "A highly selective nitrate electrode based on a tetramethyl cyclotetra-decanato-nickel(II) complex," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 568, pp. 1–6, Jul. 2004.
- [70] S. S. M. Hassan, H. E. M. Sayour, and S. S. Al-Mehrezi, "A novel planar miniaturized potentiometric sensor for flow injection analysis of nitrates in wastewaters, fertilizers and pharmaceuticals," *Anal. Chim. Acta*, vol. 581, no. 1, pp. 13–18, Jan. 2007.
- [71] T. Masadome *et al.*, "Microfluidic polymer chip with an embedded ion-selective electrode detector for nitrate-ion assay in environmental samples," *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.*, vol. 26, no. 4, pp. 417–423, 2010.
- [72] Linan Zhang, M. Zhang, H. Ren, P. Pu, P. Kong, and H. Zhao, "Comparative investigation on soil nitrate-nitrogen and available potassium measurement capability by using solid-state and PVC ISE," *Comput. Electron. Agric.*, vol. 112, pp. 83–91, Mar. 2015.

- [73] P. Pan *et al.*, "Preparation and Evaluation of a Stable Solid State Ion Selective Electrode of Polypyrrole/Electrochemically Reduced Graphene/Glassy Carbon Substrate for Soil Nitrate Sensing," *Int J Electrochem Sci*, vol. 11, pp. 4779–4793, 2016.
- [74] M. Mazloum-Ardakani, P. Pourhakkak, M. Salavati-Niasari, M. A. Karimi, and M. H. Mashhadizadeh, "Highly selective and sensitive membrane salicylate electrode based on complex of (1,8-diamino-3,6-dioxaoctane) nickel(II)," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 22, no. 1, pp. 30–37, Jan. 2011.
- [75] U. Schaller, E. Bakker, U. E. Spichiger, and E. Pretsch, "Ionic additives for ion-selective electrodes based on electrically charged carriers," *Anal. Chem.*, vol. 66, no. 3, pp. 391–398, Feb. 1994.
- [76] R. Eugster, P. M. Gehrig, W. E. Morf, U. E. Spichiger, and W. Simon, "Selectivity-modifying influence of anionic sites in neutral-carrier-based membrane electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 63, no. 20, pp. 2285–2289, Oct. 1991.

Chapitre 3 :

Fabrication et caractérisation *in vitro* des microcapteurs électrochimiques

Au cours du premier chapitre, nous avons dressé un état de l'art des technologies existantes de capteurs pour répondre à la difficulté d'évaluer l'efficacité de la fertilisation azotée. Dans ce contexte, nous avons alors exposé la stratégie visée par le projet INNOPERF-Blé pour tenter d'apporter une solution technique à cette problématique. Notre choix se porte sur le développement de capteurs potentiométriques dont nous avons décrit le fonctionnement théorique au chapitre 2. Dans ce nouveau chapitre, nous présenterons les différentes étapes du développement de ces capteurs potentiométriques, de type ISFET, de leur conception à leur caractérisation en conditions *in vitro*.

1. Fabrication des capteurs potentiométriques pour le projet INNOPERF-Blé

a. Présentation des dispositifs développés

i. Puce multi-capteur en technologie silicium

En s'appuyant sur les précédents travaux de l'équipe MICA du LAAS-CNRS, nous avons conçu un nouveau dispositif multi-capteur en technologie silicium. Pour rendre ce composant le plus polyvalent possible et adapté aux évolutions envisageables du projet INNOPERF-Blé, nous avons souhaité intégrer quelques fonctions en plus de la structure ISFET classique. Ces différentes structures ont été réparties sur deux motifs de puces représentés à la Figure 58.

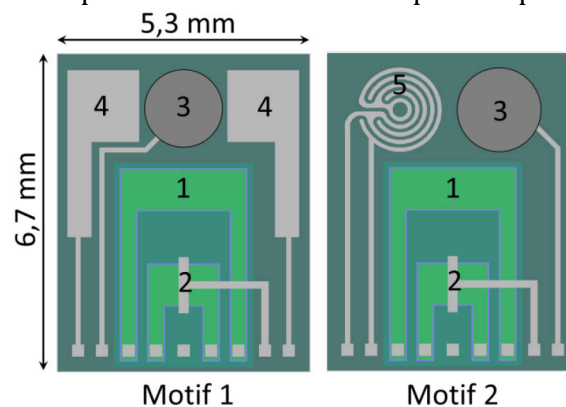


Figure 58 : Vue schématique du dessus du laboratoire sur puce. (1) microcapteur ISFET; (2) capteur de température MOSFET ; (3) électrode de référence miniature; (4) électrodes de platine pour la mesure de conductivité électrique; (5) électrodes de platine interdigitées

En se référant aux numéros indiqués sur la Figure 58, voici un descriptif des différents éléments intégrés au dispositif multi-capteur :

1. Un pH-ISFET

Par défaut au LAAS-CNRS, la grille de l'ISFET est constituée d'un isolant sensible au pH, le nitrure de silicium Si_3N_4 ou l'alumine Al_2O_3 . Cette structure générique peut ensuite être fonctionnalisée en y intégrant une membrane polymérique ionosensible afin de détecter les ions ammonium ou nitrates.

La largeur (W) et la longueur du canal (L) sont respectivement de $845 \mu\text{m}$ et $20 \mu\text{m}$. L'isolant de grille est constitué de 50 nm d'oxyde de silicium et de 50 nm d'isolant sensible au pH, le nitrure de silicium Si_3N_4 ou l'alumine Al_2O_3 . En plus de la passivation électrique à l'échelle du substrat formée par le film Si_3N_4 ou Al_2O_3 sur l'ensemble de la puce, la surface de l'ISFET est recouverte par $50 \mu\text{m}$ d'un film de résine époxy. Cette double-passivation ralentit la diffusion des molécules d'eau au sein du composant. Ces molécules sont responsables de la dégradation des propriétés électriques et de détection de l'ISFET au cours du temps. Une ouverture circulaire

de 1000 μm est réalisée dans ce film au niveau de la zone sensible pour que l'ISFET soit en contact avec la solution à analyser. Par ailleurs, cette ouverture facilite le procédé de fonctionnalisation du microcapteur en formant un puits guidant la goutte de solution polymérique ionosensible à dispenser au centre de la zone sensible.

2. un MOSFET

La présence d'un MOSFET sur chacune des puces apporte plusieurs avantages. Premièrement, le MOSFET permet d'évaluer la qualité du procédé de fabrication en salle blanche. Les paramètres technologiques des transistors MOSFET et ISFET sont identiques en termes de largeur W et longueur L de canal ainsi que de dopage. Ces deux composants partagent d'ailleurs un même caisson d'isolation électrique, de dopage P . Ainsi, la caractérisation électrique du MOSFET apporte des informations sur l'ISFET, dont le comportement « bloqué » lorsqu'il n'est pas polarisé en phase liquide ne permet pas une caractérisation électrique. De plus, il est envisageable que ce MOSFET soit utilisé comme capteur de la température du sol [1], une grandeur physique intéressante du point de vue de l'agronome. En effet, la température du sol affecte directement la germination, la vitesse de croissance des plantes, l'activité des micro-organismes et notamment la nitrification, ainsi que l'humidité du sol [2]. Enfin, sa mesure est nécessaire pour corriger le signal de sortie de l'ISFET, dont la sensibilité est fonction de la température.

3. Une électrode de référence miniature tout solide

A la fin du procédé de fabrication en salle blanche, le dispositif multi-capteur intègre une électrode constituée d'un disque de platine Pt de diamètre 1750 μm . Nous avons étudié plusieurs voies de transformation de cette électrode Pt en électrode de référence. Tout d'abord, nous nous sommes intéressés aux techniques de dépôt des couches argent/chlorure d'argent Ag/AgCl . Ce bicouche forme une pseudo-électrode de référence dont le potentiel dépend de la concentration en ions chlorures de la solution analysée. Nous nous sommes également intéressés au développement d'une véritable électrode de référence tout solide obtenue par l'immobilisation d'un électrolyte solide sur le film de chlorure d'argent. La fabrication d'une telle électrode dédiée à l'analyse environnementale sur le long terme demeure aujourd'hui une problématique scientifique non résolue. La principale raison provient du manque de stabilité du potentiel dont la dérive devient non-négligeable après quelques heures d'utilisation. Cette stabilité est pourtant le principal facteur de qualité d'une électrode de référence. Nous avons, malgré cela, cherché à intégrer cette fonction sur la puce dans le cas où celle-ci serait utilisée pour des analyses rapides d'échantillons de terre en laboratoire, ou directement sur site pour s'affranchir de l'utilisation d'une électrode de référence macroscopique encombrante et coûteuse. Ces développements feront l'objet d'une partie dédiée à la fin de ce chapitre.

4. Deux électrodes planaires en platine

Deux électrodes en platine Pt ayant une surface de 2,8 mm^2 chacune ont été intégrées à la puce en silicium. Elles peuvent servir à mesurer la conductivité de la solution. Cette information présente de l'intérêt lors de l'analyse de solutions d'extrait de sol et permet d'estimer leur force ionique. Il est également possible de mesurer le potentiel d'oxydoréduction de cette même solution d'extrait de sol ou du sol. Le potentiel « redox » s'obtiendrait en mesurant la différence de potentiel entre une des deux électrodes en Pt et l'électrode de référence miniature (Figure 58.3). L'évaluation du potentiel redox du sol est particulièrement

utile pour caractériser l'apparition de conditions réductrices dans un sol causée par un manque d'oxygène et pour interpréter les processus associés tels que la dénitrification ou la dégradation bactérienne [3].

5. Deux électrodes interdigitées en platine

Un autre motif d'électrodes a été conçu. Il s'agit cette fois d'électrodes interdigitées de $0,6 \text{ mm}^2$ de surface chacune.

ii. Electrode planaire miniature

Nous avons conçu un second composant très simple, constitué uniquement d'une électrode de platine dans une configuration planaire (Figure 59a). L'objectif était de pouvoir travailler sur le développement des membranes ionosensibles et des électrodes de référence miniature Ag/AgCl tout solide en disposant d'un composant peu onéreux et bien adapté à l'environnement de caractérisation du LAAS-CNRS. La transduction du type ISE à contact solide, présentée dans le chapitre précédent, a également été étudiée à partir de ce composant.

Cette électrode est constituée d'un disque de platine relié à un contact électrique par une piste isolée du liquide au moyen d'un film sec de résine époxy (DF-1050, Engineered Materials Systems). Ce dernier est laminé sur la partie immergée de l'électrode. La zone active de l'électrode a une surface de $2,27 \text{ mm}^2$. Le contact électrique présente une surface suffisamment large pour pouvoir y connecter facilement une pince crocodile.

Le procédé de fabrication en salle-blanche, en deux étapes, est très simple et peu coûteux (Figure 59b). Le substrat utilisé est une plaquette de silicium, de diamètre 4 pouces, recouverte d'un oxyde de silicium d'environ 600 nm d'épaisseur. Cet oxyde assure l'isolation électrique du silicium semi-conducteur sous-jacent. La première étape de la fabrication consiste à déposer les structures métalliques (zone active de l'électrode, piste et contact électrique) via un procédé lift-off : un bicouche de Ti/Pt d'épaisseur 20/150 nm est déposé par évaporation sur une résine photosensible structurée. Etant donné la faible résolution spatiale des motifs métalliques, l'insolation de la résine est réalisée à travers un masque de photolithographie obtenu en imprimant un film souple (Figure 59c). Lors de l'insolation, ce dernier est fixé avec du ruban adhésif sur une plaque de quartz aux dimensions adaptées à la machine de photolithographie. La deuxième étape correspond au laminage du film sec photosensible (polarité négative) de $50 \mu\text{m}$ d'épaisseur sur la plaquette. Après insolation et développement de ce film, la zone active de l'électrode et la zone de contact électrique sont libérées. A la fin du procédé, la plaquette est découpée à la scie diamantée afin d'individualiser les composants.

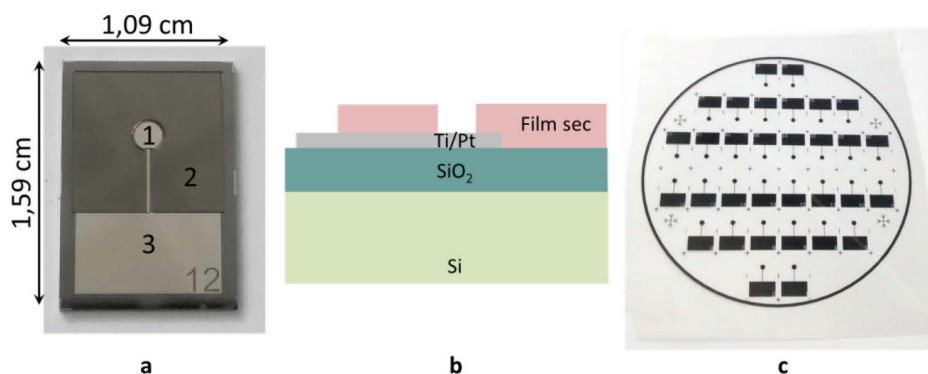


Figure 59 : (a) Photo et dimensions de l'électrode planaire. (1) zone active de l'électrode ; (2) passivation en film sec ; (3) zone de prise de contact électrique. (b) Vue schématique en coupe du composant. (c) photo du film souple imprimé utilisé comme masque de photolithographie

b. Principales étapes du procédé de micro-fabrication du dispositif multi-capteur en salle-blanche

Le procédé de fabrication des ISFET et MOSFET planaires est maîtrisé depuis le début des années 2000 au sein du LAAS-CNRS. Les principales étapes de fabrication seront donc rapidement résumées ici (Figure 60). L'ensemble des étapes est détaillé dans la thèse de Monsieur William Sant [4].

Ce procédé est réalisé sur des plaquettes de silicium de diamètre 4 pouces, dopées N avec une forte résistivité ($\rho > 1 \text{ K}\Omega\cdot\text{cm}$) et d'orientation cristalline (100). Les masques de photolithographies conçus permettent la fabrication en parallèle de 96 puces du motif 1 et 96 puces du motif 2 (Figure 58), soit un total de 192 puces sur une même plaquette.

1. Un oxyde de champ de 800nm est formé par oxydation thermique. Il sert de couche de masquage pour les étapes suivantes du procédé, en particulier lors des implantations ioniques.
2. Une ouverture est réalisée dans cet oxyde grâce à une étape de photolithographie suivie d'une gravure humide au buffer HF. Cette ouverture délimite le caisson d'isolation électrique du composant. Un oxyde de pré-implantation de 40 nm est ensuite formé par oxydation thermique.
3. Le caisson d'isolation de type P est effectué par implantation ionique de bore à travers l'oxyde, suivie par un recuit de redistribution des dopants. Ce recuit corrige également les défauts cristallins engendrés par l'implantation ionique.
4. On réalise une enduction d'une résine photosensible épaisse de 2,6 μm dont les ouvertures définissent les zones de contacts P+. Puis, une seconde implantation ionique de bore est réalisée à travers l'oxyde de pré-implantation. Ces contacts P+ jouent le rôle d'anneaux de garde permettant d'éviter les courants parasites en surface.
5. De manière similaire, une résine de 2,6 μm est déposée puis insolée afin de délimiter les zones source et drain dopées N+. Une implantation ionique d'arsenic est effectuée à travers l'oxyde de pré-implantation, suivie par un recuit de redistribution sous atmosphère oxydante. Un oxyde protecteur d'environ 500 nm croît au cours de cette étape thermique.
6. L'ensemble de la plaquette, exceptée la grille du transistor située au-dessus du canal, est masqué par une résine photosensible. L'ouverture de grille est ensuite effectuée par une attaque de l'oxyde de champ au buffer HF.
7. Un nettoyage RCA est réalisé pour garantir la qualité de l'interface silicium/oxyde. Il est immédiatement suivi par la formation de l'oxyde de grille (50 nm) par oxydation thermique. Puis, 50 nm de matériau sensible au pH sont déposés, par dépôt chimique en phase vapeur sous basse pression (LPCVD) s'il s'agit de Si_3N_4 , ou par atomic layer deposition (ALD) pour l' Al_2O_3 . Cet isolant, déposé sur l'ensemble de la plaquette, joue également le rôle de couche de passivation pour l'utilisation en phase liquide.

8. Les zones d'ouvertures des contacts électriques sont définies par une nouvelle étape de photolithographie. Le Si_3N_4 ou l' Al_2O_3 sont respectivement attaqués par gravure plasma (RIE) ou par gravure chimique au buffer HF. Puis, on élimine l'oxyde par une gravure humide au buffer HF. Une bicouche métallique Titane (Ti)/Platine (Pt) d'épaisseur 20 nm/150 nm est déposée par évaporation via un procédé « lift-off ». Toutes les autres structures métalliques de la puce (électrode de référence, électrodes de conductivité, grille du MOSFET) sont réalisées au même moment au cours de cette étape.
9. Un film sec (DF-1050, Engineered Materials Systems) constitué d'une résine époxy de 50 μm d'épaisseur est laminé sur la plaquette. Une dernière étape de photolithographie permet de définir des ouvertures dans ce film au niveau de la grille de l'ISFET, en vue de la fonctionnalisation, et au niveau des électrodes métalliques en Pt.

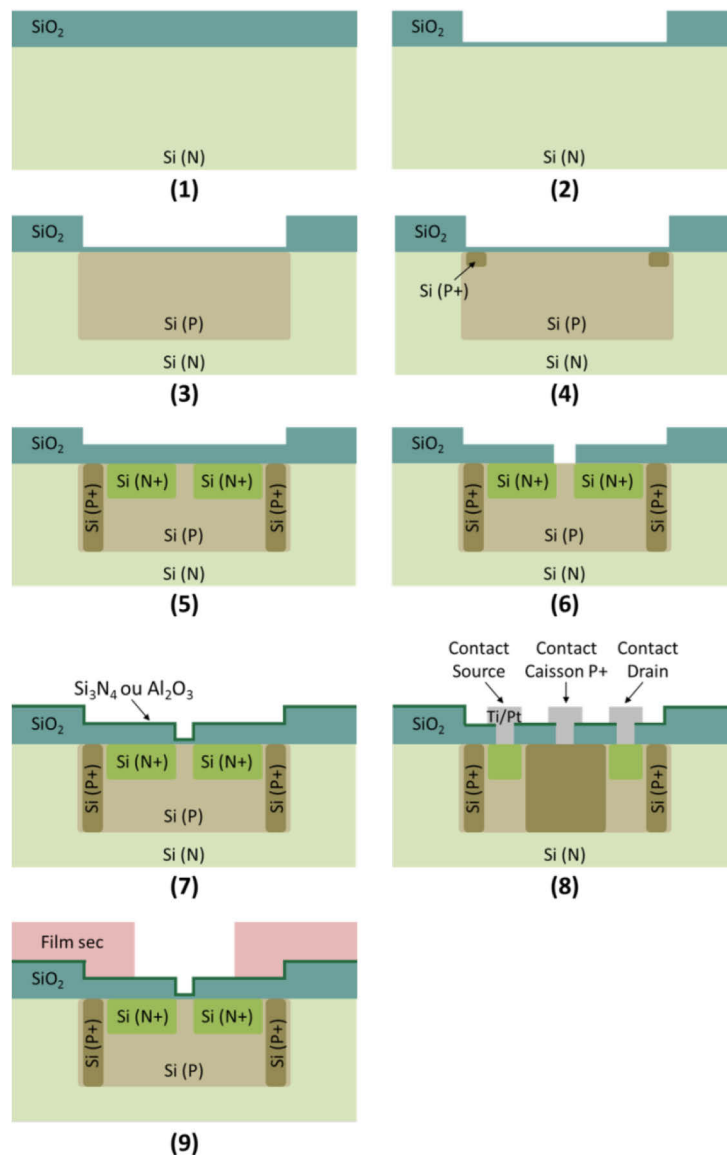
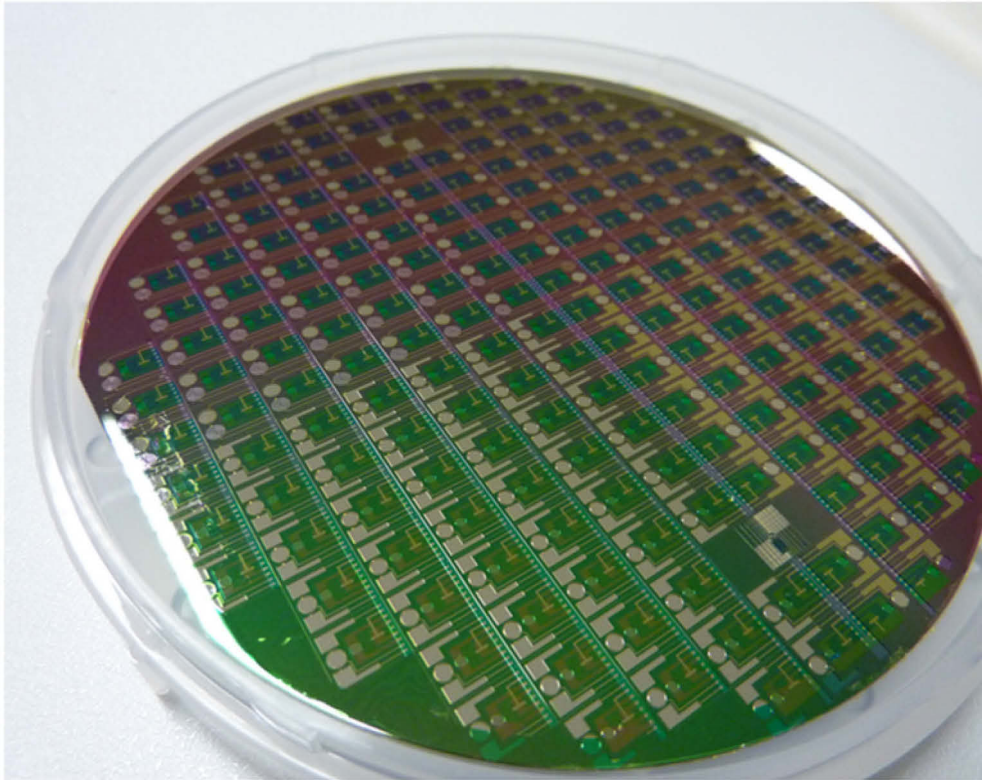
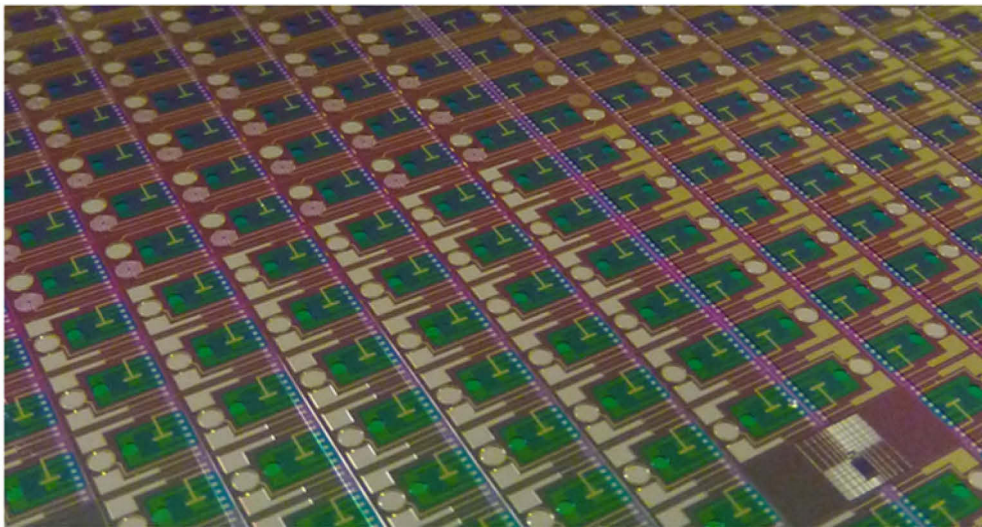


Figure 60 : Schémas des principales étapes de fabrication des ISFET planaires sensibles au pH. Les schémas, non à l'échelle, représentent une coupe transversale au niveau de la grille du transistor, exceptée l'étape 8 de métallisation qui représente une coupe effectuée au niveau des contacts électriques



(a)



(b)

Figure 61 : Photographies d'une plaquette entière à la fin du procédé

c. Assemblage du système multi-capteur

A ce stade des explications, le procédé de fabrication en salle blanche des puces est terminé. L'assemblage est la dernière étape préalable à l'utilisation d'un microcapteur pH-ISFET dans son environnement de mesure. Il s'agit d'assurer la protection du composant afin de maximiser sa durée de vie tout en autorisant son interaction avec l'environnement. Dans le cas du projet INNOPERF-Blé, la contrainte principale provient du caractère liquide du milieu d'étude. L'encapsulation du dispositif doit lui assurer une excellente étanchéité afin d'éviter les courts-circuits entre les différents contacts électriques. Après découpage de la plaquette à la scie

diamantée (Figure 61a), l'assemblage du dispositif INNOPERF-blé suit trois principales étapes (Figure 62) :

1. Collage de la puce sur un circuit imprimé (PCB) avec une colle époxy (Epotek H70E, commercialisé par Epoxy Technology),
2. Microsoudures entre les plots de contact de la puce et les pistes en or du PCB,
3. Encapsulation des parties conductrices (microsoudures, tranches de la puce) réalisée en dispensant un glob-top en silicone (R-1400, commercialisé par Nusil).

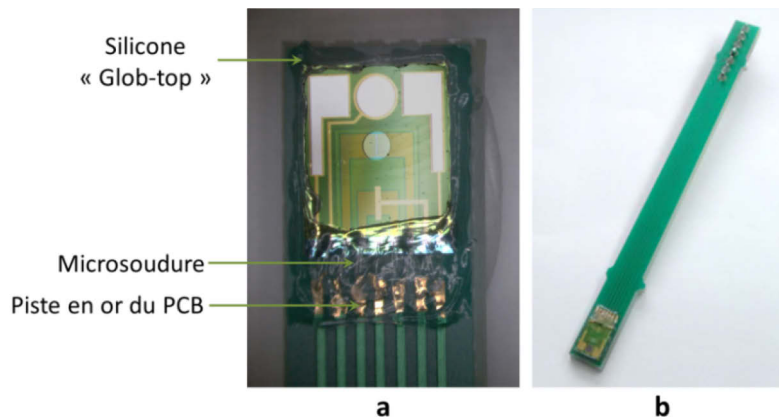


Figure 62 : Photos du microcapteur après assemblage sur un PCB

Toutes les caractérisations d'ISFET présentées dans ce chapitre ont été effectuées avec des composants assemblés sur ce même PCB en suivant les étapes qui viennent d'être décrites.

d. Procédé d'intégration des couches ionosensibles en fluoropolysiloxane (FPSX)

Les pNH_4 -ISFET et pNO_3 -ISFET sont obtenus en fonctionnalisant les puces génériques pH-ISFET grâce à l'intégration de couches polymériques ionosensibles (Figure 63). Nous l'avons décrite d'un point de vue théorique dans le chapitre précédent. En pratique, différentes techniques sont envisageables pour l'intégration de ces membranes.

La technique de dépôt à la tournette (« spin-coating ») est un procédé de fabrication ayant l'avantage d'être collectif mais l'inconvénient de mener à la perte de 95% de la solution sensible. Les ionophores, molécules chimiques responsables de la sensibilité ionique de la membrane, présentant un coût élevé, la méthode de dépôt par jet d'encre (« inkjet printing ») a été retenue en premier lieu pour ce projet. Cette technique permet de dispenser des micro-volumes de membrane sensible sur une zone déterminée. C'est un procédé bas coût et pouvant être automatisé qui semble donc bien adapté à la production en masse d'ISFET pour le projet INNOPERF-Blé.

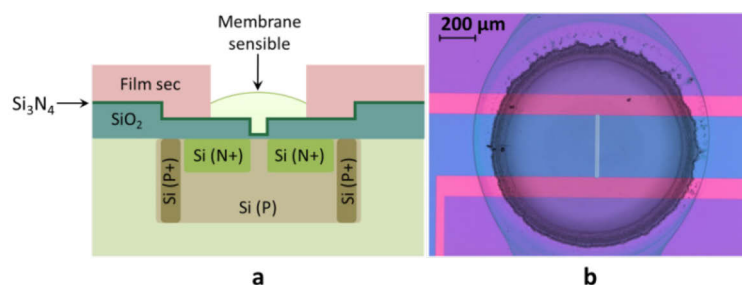


Figure 63 : (a), schéma de la structure $\text{pNH}_4/\text{pNO}_3$ - ISFET obtenue par l'intégration d'une membrane ionosensible sur un pH-ISFET générique. (b), image par microscopie optique d'un dépôt de membrane ionosensible centrée sur la zone sensible d'un ISFET. Dans cet exemple, l'ISFET ne dispose pas de couche de film sec laminé

Dans un premier temps, nous avons étudié le procédé d'intégration des membranes sensibles en utilisant un prototype de machine jet d'encre développé lors de la thèse de Monsieur Arnaud Cazalé (Figure 64a) [5]. Sur la base de ses travaux, nous avons choisi d'utiliser un fluoropolysiloxane (FPSX) dissout dans du tétrahydrofurane (THF) comme matrice de la membrane sensible. Plus de détails sur les formulations des membranes seront donnés par la suite lors d'une partie dédiée à ce sujet. Le prototype utilise des buses jet d'encre fabriquées par l'entreprise Lee Company (Figure 64b). Ces buses sont des électrovannes constituées d'une chambre en céramique ayant, en théorie, une bonne résistance chimique au THF. On peut contrôler le volume de solution éjectée par la buse en modifiant la pression de la solution, sa viscosité ainsi que la durée d'ouverture de la vanne. Lorsque la goutte est déposée sur le substrat, le THF s'évapore spontanément et il se forme un film solide de membrane FPSX (Figure 64c). Malheureusement, la solution sensible à base de FPSX induisait très régulièrement un colmatage de la buse jet d'encre, sans que l'on ait pu identifier si ce phénomène provenait d'une incompatibilité de la vanne au THF. Les gros problèmes de reproductibilité ainsi que de coûts considérables pour le rachat des buses nous ont donc poussés à choisir une autre technique de dépôt.

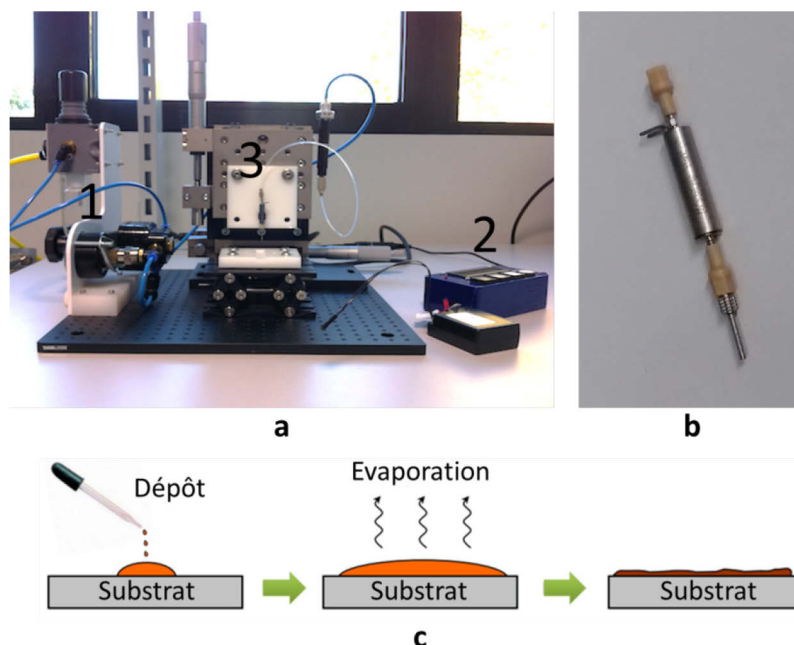


Figure 64 : (a), le prototype de machine jet d'encre. (1) partie du prototype dédiée à la régulation de la pression ; (2) carte électronique dédiée au contrôle du signal de commande gérant l'ouverture/la fermeture de la vanne ; (3) buse Lee Company positionnée sur une plateforme de positionnement micrométrique selon les trois axes X, Y, Z. (b), Photo de la buse équipant ce prototype. (c), schéma de principe du dépôt de la couche polymérique

Nous avons ainsi décidé d'employer une méthode plus simple basée sur le dépôt d'une goutte de solution sensible par une micro-seringue en verre (5 μL , fabriquée par Hamilton) placée sur un système de positionnement micrométrique triaxial contrôlé de manière totalement manuelle.

Le dépôt doit assurer un recouvrement total de la zone sensible du pH-ISFET par la membrane sensible. Pour rappel, sa longueur est de 845 μm . Nous avons donc mesuré au profilomètre mécanique (KLA Tencor P-17) le diamètre et l'épaisseur des couches de FPSX obtenues en faisant varier le volume de solution déposée sur un substrat de Si_3N_4 (Figure 65a). Cette solution était constituée d'un mélange de 200 mg de FPSX dissout dans 1,5 mL de THF. Les

résultats montrent qu'un volume de 0,1 μL de solution forme un film circulaire de FPSX dont le diamètre moyen, 1107 μm , suffit à recouvrir la zone sensible de l'ISFET.

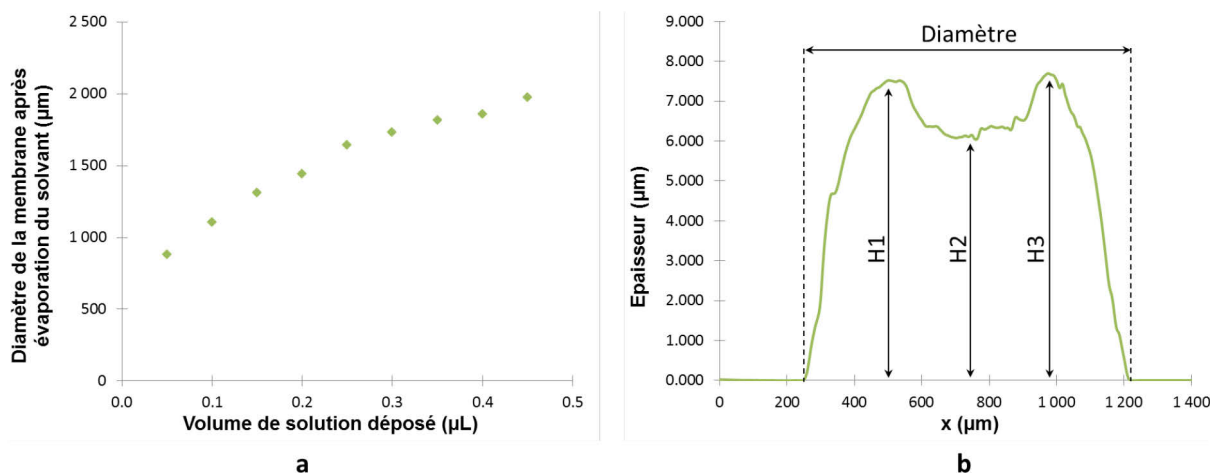


Figure 65 : (a), courbe expérimentale représentant le diamètre de la membrane obtenu en fonction du volume de solution déposé. (b), coupe transversale d'une membrane

Nous avons également évalué la répétabilité de ce procédé en effectuant 16 dépôts de 0,1 μL de cette même solution de FPSX sur un substrat de Si_3N_4 . Les membranes ont ensuite été caractérisées au profilomètre mécanique. La Figure 65b représente une coupe transversale d'une membrane accompagnée des indications sur les paramètres mesurés (diamètre, épaisseurs au centre et aux sommets de la membrane). Les résultats de cette étude sont résumés dans le Tableau 5.

	Diamètre (μm)	H1 (μm)	H2 (μm)	H3 (μm)
Moyenne sur 16 membranes	1107	8,22	6,91	7,44
Ecart type	116	1,05	1,05	1,32

Tableau 5 : Résultats de l'étude de répétabilité des dimensions des membranes en FPSX déposées

En moyenne, l'épaisseur au centre de la membrane est 6,91 μm à $\pm 1,05 \mu\text{m}$. On constate l'existence de « sommets » d'environ 1 μm sur les bords de la membrane. Ce phénomène est caractéristique de l'effet « tâche de café », souvent rencontré dans le domaine de l'impression jet d'encre [6]. L'évaporation préférentielle du THF sur les bords crée un flux de solvant vers l'extérieur. Des chaînes de FPSX sont entraînées par ce flux et s'accumulent à la périphérie de la goutte. L'épaisseur moyenne au centre de la membrane est suffisante pour notre application et nous n'avons donc pas cherché à diminuer l'amplitude de cet effet.

Au final, bien que l'ensemble du dispositif soit contrôlé manuellement, la localisation et le diamètre des couches FPSX déposées sont maîtrisables avec une répétabilité satisfaisante. L'ensemble des membranes sensibles présentées par la suite ont été réalisées avec cette technique. Dans une optique d'intégration industrielle, l'achat d'une machine de dispense pilotant automatiquement le volume éjecté par la seringue devrait permettre d'améliorer davantage la répétabilité, la reproductibilité et la durée des dépôts.

2. Caractérisations *in vitro* des MOSFET et pH-ISFET

a. Caractérisations électriques

i. Introduction et présentation des méthodes de caractérisation électrique

Après fabrication, il est essentiel de vérifier que le comportement électrique des structures ISFET et MOSFET est conforme avant d'envisager de les utiliser comme capteur. Ces caractérisations nous renseignent sur la qualité du procédé de fabrication, en particulier sur l'étape de réalisation de l'isolant de grille $\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$ ou $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$. Un autre objectif de ces mesures électriques consiste à vérifier que les ISFET fabriqués sont bien compatibles avec notre appareil de mesure portable dédié aux ISFET, « l'ISFETmètre », conçu par le LAAS-CNRS. Son principe de fonctionnement sera décrit au cours d'un prochain paragraphe.

Nous avons examiné les propriétés électriques obtenues sur différentes plaquettes fabriquées au cours de cette thèse en utilisant le Si_3N_4 déposé par LPCVD comme matériau sensible au pH. Les mesures ont également été effectuées sur une ancienne génération de composants en Si_3N_4 fabriqués dans le cadre d'un autre projet [7]. Nous avons, par ailleurs, fabriqué et caractérisé des ISFET à grille Al_2O_3 obtenus par la technique de dépôt en couches atomiques ALD (Atomic Layer Deposition). Cette technique consiste à former un film de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur d'un matériau en le déposant couche atomique après couche atomique. L'alumine Al_2O_3 est théoriquement un matériau diélectrique intéressant pour la réalisation de pH-ISFET. En effet, elle présenterait des propriétés de détection supérieures à celles obtenues avec le Si_3N_4 , notamment en termes de :

- sensibilité pour la mesure du pH avec une réponse quasi-Nernstienne (59 mV/pH à 25°C),
- sélectivité aux ions interférents (sodium Na^+ et potassium K^+ principalement),
- passivation à l'échelle du substrat pour le conditionnement en phase liquide (diminution de la dérive temporelle et amélioration de la durée de vie).

Une étude approfondie de l' Al_2O_3 déposée par ALD ainsi que de son utilisation comme couche sensible pour des pH-ISFET en configuration planaire ou de nanofils a été menée au LAAS-CNRS. Elle a fait l'objet des travaux de thèse de Monsieur Ahmet Lale [8].

Les MOSFET ont été caractérisés à l'air ambiant à l'aide d'une station sous pointes (Karl Suss PA 200) avant découpe de la plaquette. Les ISFET, eux, ont été assemblés sur PCB et encapsulés pour pouvoir évaluer précisément leur fonctionnement en milieu liquide sans risque de court-circuit. La solution d'analyse, une solution tamponnée de pH 4, a été polarisée à l'aide d'une électrode de référence Ag/AgCl à double jonction commercialisée par Metrohm. Les caractérisations électriques $I_{ds} = f(V_{gs})$ ont été réalisées à température ambiante avec un testeur paramétrique (HP 4142B) : un balayage de la tension V_{gs} est effectué tandis qu'une tension de polarisation drain-source V_{ds} de 2 V est appliquée de manière constante. Les résultats présentés sont des moyennes obtenues sur 5 à 10 composants par plaquette.

Il est possible d'extraire les caractéristiques essentielles des composants ISFET et MOSFET à partir des courbes obtenues :

- I_{off} , le courant de fuite entre source et drain lorsque le transistor est à l'état bloqué,
- V_t , la tension de seuil du transistor,
- K, la pente au-delà du seuil, également appelé coefficient de transconductance.

Il existe de nombreuses méthodes d'extraction de V_t et du coefficient de transconductance K [9]. Pour rappel, en régime saturé, le courant drain-source I_{ds} s'exprime ainsi :

$$I_{ds} = \frac{K}{2}(V_{gs} - V_t)^2 \quad (74)$$

avec
$$K = C_{ox}\mu \frac{W}{L} \quad (75)$$

Une méthode simple consiste à passer à la racine carrée du courant I_{ds} . D'après (11), on aboutit à une courbe linéaire. V_t et K sont ensuite aisément extraits en déterminant, respectivement, l'intersection de $\sqrt{I_{ds}}$ avec l'axe des abscisses ainsi que la valeur de la pente.

Depuis le début des années 2000, l'équipe MICA du LAAS-CNRS a mené de nombreux projets de recherche impliquant la fabrication d'ISFET à grille Si_3N_4 déposé par LPCVD. L'expertise technologique acquise a permis de définir des caractéristiques électriques optimales à atteindre pour le bon fonctionnement des capteurs (Tableau 6). En particulier, ces valeurs garantissent la compatibilité des ISFET avec l'électronique de mesure ISFETmètre.

I_{off}	< 10 μA
V_t	$\approx 1 V$

Tableau 6 : Paramètres électriques optimaux pour les applications capteurs visées

ii. Résultats

La Figure 66 présente les courbes $I_{ds} = f(V_{gs})$ obtenues sur des MOSFET/ISFET issus des différentes plaquettes fabriquées au cours de cette thèse ainsi que sur l'ancienne génération de composants. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 7.

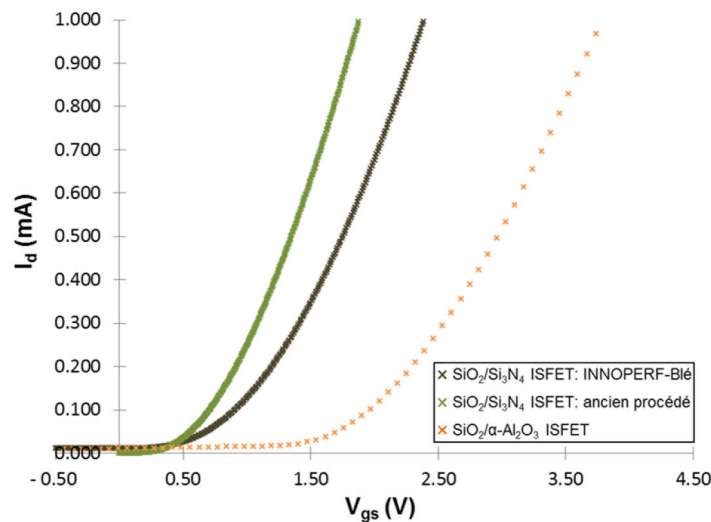


Figure 66 : Courbes $I_{ds} = f(V_{gs})$ obtenues à pH=4 sur les ISFET issues de différentes plaquettes

Les ISFET fabriqués sont bien des transistors normalement fermés ($V_t > 0$), même si l'objectif d'une tension de seuil à 1V n'a été atteint que pour la plaquette alumine. La qualité du nettoyage RCA peut être mise en cause en ce qui concerne les composants de la plaquette INNOPERF-Blé. En effet, le nettoyage RCA a été effectué manuellement pour cette plaquette, étant donné que le banc semi-automatique RCA de la salle blanche du LAAS-CNRS était indisponible pour une durée indéterminée au moment de la fabrication. Il est également à noter que la tension de seuil des MOSFET INNOPERF-Blé avoisine 0,0 V, une valeur inférieure à celle

des ISFET fabriqués sur la même plaquette. Cette différence peut s'expliquer par le piégeage de charges positives lors de la métallisation titane/platine de la grille du MOSFET. Ces charges peuvent provenir d'une pollution du bâti de métallisation. Néanmoins, ces tensions de seuil restent correctes et ne compromettent pas l'utilisation des ISFET avec l'électronique ISFETmètre.

Plaquettes :	ISFET Alumine	ISFET INNOPERF-blé	MOSFET INNOPERF-blé	ISFET ancien procédé
Isolant de grille	Al ₂ O ₃ (amorphe)	Si ₃ N ₄	Si ₃ N ₄	Si ₃ N ₄
I _{off} (μA)	0,5	0,5	0,002	0,2
V _t (V) (mesuré à pH=4)	1,1	0,3	0,0	0,2
Transconductance K (mΩ ⁻¹)	0,28	0,53	0,55	0,70

Tableau 7 : Résumé des principaux paramètres électriques des capteurs ISFET et MOSFET caractérisés

On constate d'importantes variations du coefficient de transconductance K d'une plaquette à l'autre. Ces différences proviennent principalement du fait que les plaquettes ont été réalisées avec différents jeux de masques de photolithographie sur lesquels les largeurs et longueurs de canal du transistor sont différentes. En effet, conformément à l'équation (75), la transconductance varie proportionnellement au rapport W/L. Cette équation fait également intervenir le terme C_{iso}, la capacité par unité de surface d'oxyde de grille constituée du bicouche SiO₂/Si₃N₄ ou SiO₂/Al₂O₃ :

$$\frac{1}{C_{iso}} = \frac{1}{C_{SiO_2}} + \frac{1}{C_{Si_3N_4/Al_2O_3}} \quad (76)$$

avec
$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d} \quad (77)$$

où :

- ε₀ : la constante diélectrique du vide (8,854 × 10⁻¹² F.m⁻¹)
- ε_r : la constante diélectrique relative de l'isolant
- d : l'épaisseur de l'isolant

Cependant, comme les épaisseurs d'isolant déposées sont pratiquement égales (50-57 nm), de même que les constantes diélectriques relatives ε_r de l'alumine amorphe déposée par ALD (8,64) et du nitrure de silicium par LPCVD (8,0), la contribution des variations de la capacité d'isolant aux différences de transconductance observées expérimentalement est mineure [8]. En calculant le coefficient de transconductance K à partir des équations (75), (76) et (77) et des dimensions réelles des composants, on retrouve bien des variations similaires aux valeurs expérimentales.

Plaquettes :	ISFET Alumine	ISFET INNOPERF-blé	MOSFET INNOPERF-blé	ISFET ancien procédé
W (μm)	360	845	845	360
L (μm)	16,3	16,8	16,8	5,85
Epaisseur SiO ₂ (nm)	53	52	52	50
Epaisseur Si ₃ N ₄ ou Al ₂ O ₃ (nm)	53	57	57	50
C _{iso} (mF/m ²)	0,443	0,426	0,426	0,458
μ théorique (cm ² /V.S)	250	250	250	250
Transconductance K théorique (mΩ ⁻¹)	0,22	0,54	0,54	0,70

Tableau 8 : Calcul du coefficient de transconductance théorique à partir des dimensions des composants

Les courbes $I_{ds} = f(V_{gs})$ des MOSFET montrent que la valeur du courant de fuite I_{off} varie fortement avec l'intensité lumineuse : 2 nA dans l'obscurité et jusqu'à 40 μ A sous lumière. Cette différence s'explique par la contribution d'un photocourant généré au niveau des jonctions PN en inverse du composant. Ce photocourant est non-négligeable en raison des dimensions importantes de ces jonctions PN sur nos composants. L'évaluation précise de I_{off} et la comparaison des résultats d'un capteur à l'autre ne sont donc possibles qu'à condition de placer le composant dans le noir (Figure 67). Cette contrainte n'est pas critique dans le cas du projet INNOPERF-blé puisque les capteurs seront plongés en permanence dans l'obscurité du sol.

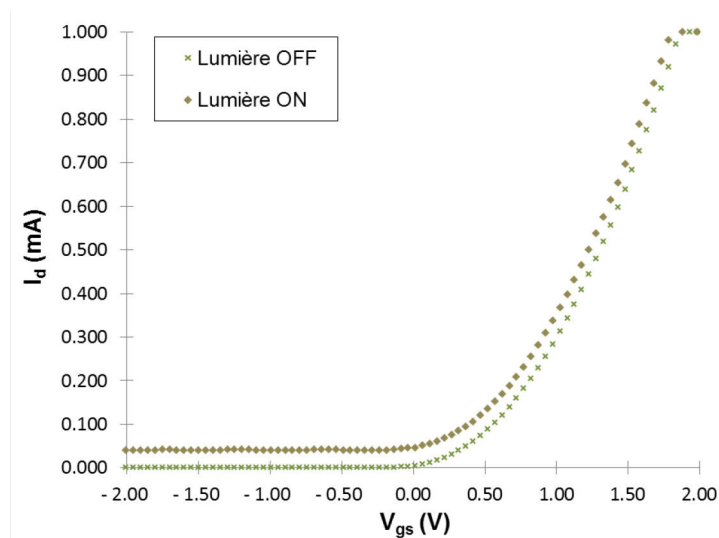


Figure 67 : Courbes $I_{ds} = f(V_{gs})$ obtenues sur des MOSFET en conditions de lumière et d'obscurité

Au final, ces caractérisations électriques ont permis de vérifier que les composants fabriqués disposent d'un comportement transistor conforme. Les puces génériques pH-ISFET pourront donc être fonctionnalisées et être intégrées à un système dédié à l'analyse du sol. Nous allons à présent nous intéresser aux propriétés de détection en phase liquide des pH-ISFET.

b. Propriétés de détection des pH-ISFET à grille alumine et nitrure de silicium en phase liquide

i. Sensibilité au pH

Les mesures de sensibilité des pH-ISFET ont été réalisées à l'aide de l'ISFETmètre. Il s'agit d'un appareil de mesure portable et ergonomique développé au LAAS-CNRS lors des travaux de thèse de Madame Iryna Humenyuk [10]. En plus de la tension V_{ds} , l'utilisateur choisit une valeur de courant I_{ds} maintenue constante par l'appareil grâce à une boucle d'asservissement du potentiel de source V_s . L'ISFETmètre renvoie en temps réel la valeur de tension V_{gs} permettant d'atteindre la valeur I_{ds} spécifiée. Les variations de tension V_{gs} reflètent les variations de concentrations ioniques de la solution analysée suivant la théorie de Nernst. Contrairement au testeur paramétrique HP4142B utilisé pour la caractérisation $I_{ds} = f(V_{gs})$, il est possible d'effectuer un suivi temporel précis et automatique du signal de sortie de l'ISFETmètre. Les valeurs de courant I_{ds} et tension V_{ds} choisies pour cette étude ont été respectivement de 0,1 mA et 2 V.

La sensibilité au pH des différentes plaquettes de pH-ISFET a été déterminée à l'aide de doseurs automatiques (Metrohm Dosimat 765) contrôlant l'ajout de solutions acide (acide chlorhydrique HCl à 0,1 M) ou basique (hydroxyde de tétraméthylammonium TMAH à 0,1M). Le choix du TMAH plutôt qu'une base forte plus « classique » pour les dosages acido-basiques

comme l'hydroxyde de sodium NaOH avait pour but d'éviter l'interférence potentielle causée par les ions alcalins Na⁺. Les variations de pH consécutives aux ajouts successifs de solutions acide ou basique ont été mesurées simultanément par le pH-ISFET ainsi que par une électrode pH en verre (Metrohm). L'électrode de référence utilisée était une Ag/AgCl à double jonction, également fournie par Metrohm. Les valeurs de sensibilités ont été déterminées en mesurant la pente en mV/pH à partir des courbes de calibration reliant la tension de sortie de l'ISFETmètre au pH de la solution, comme expliqué dans la partie dédiée au chapitre 2.

Les courbes de calibrations réalisées sur les pH-ISFET à grille en Si₃N₄ et Al₂O₃ non recuite sont présentées à la Figure 68. Les valeurs de sensibilité sont indiquées dans le Tableau 9.

	ISFET Alumine	ISFET INNOPERF-blé	ISFET ancien procédé
Isolant de grille	Al₂O₃ (amorphe)	Si₃N₄	Si₃N₄
Sensibilité moyenne (mV/pH)	58-59	48-49	50-52

Tableau 9 : Sensibilités au pH obtenues pour les trois types d'ISFET étudiés

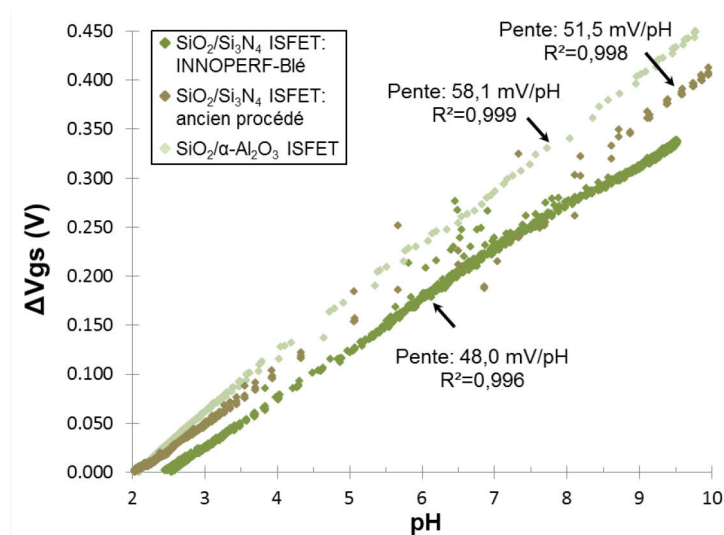


Figure 68 : Courbes de calibration pH des pH-ISFET en nitrure de silicium et alumine non recuite

La sensibilité des pH-ISFET en nitrure de silicium se situe entre 48 et 52 mV/pH selon les plaquettes et les composants. Avec 58-59 mV/pH, les ISFET Al₂O₃ disposent d'une sensibilité proche du maximum dicté par la loi de Nernst. Dans les deux cas, la gamme de pH couverte par les microcapteurs, i.e. de 2 à 10, encadre largement le pH des sols cultivés.

ii. Sélectivité des pH-ISFET aux ions alcalins

La sélectivité aux ions alcalins potassium K⁺ et sodium Na⁺ a été déterminée par ajouts successifs de solutions de chlorure de potassium KCl et chlorure de sodium NaCl, respectivement, dans une solution tampon pH. Celle-ci est composée d'un mélange d'acétate de lithium CH₃COOLi et d'acide acétique CH₃COOH à 0,05M. Nous l'avons réalisée afin de s'assurer de l'absence de concentrations résiduelles en ions alcalins. Son rôle est d'imposer un pH fixe à la solution afin que les variations de V_{gs} au cours de l'expérience soient totalement imputables aux changements de concentration en ions alcalins. L'utilisation d'une électrode pH commerciale au cours de l'expérience a confirmé que le pH de la solution était stable à $4,66 \pm 0,01$ pH. Les

mesures ont, à nouveau, été effectuées avec l'ISFETmètre et une électrode de référence Ag/AgCl commerciale.

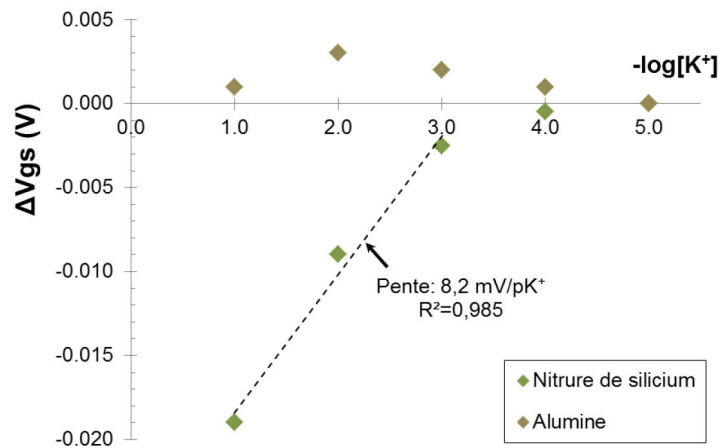


Figure 69 : Comparaison de la sélectivité à l'ion potassium K⁺ des pH-ISFET à grille en Si₃N₄ et Al₂O₃

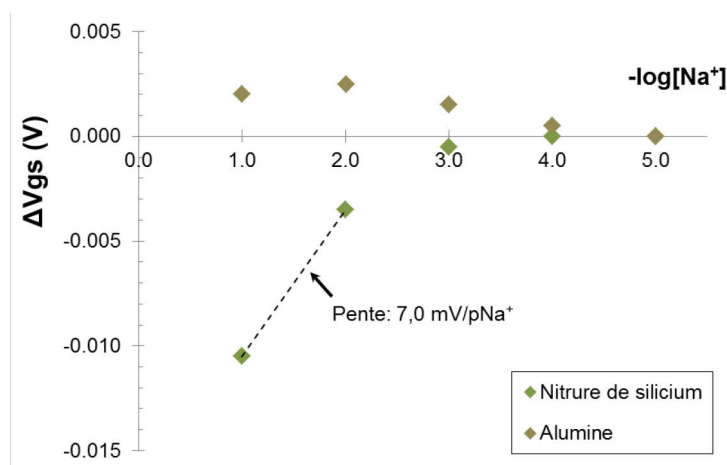


Figure 70 : Comparaison de la sélectivité à l'ion sodium Na⁺ des pH-ISFET à grille en Si₃N₄ et Al₂O₃

En dessous de 1mM, la réponse des pH-ISFET en Si₃N₄ n'est pas influencée par la présence des ions alcalins. En revanche, au-dessus de 1mM, les pH-ISFET répondent aux variations de concentration en ions K⁺ et Na⁺ avec une sensibilité respective de 8,2 mV/pK (Figure 69) et 7,0 mV/pNa (Figure 70). Ces sensibilités demeurent faibles même à forte concentration, l'interférence des ions alcalins ne devrait donc pas poser problème lors de la détermination du pH du sol avec les pH-ISFET à grille en Si₃N₄.

Pour l'ion potassium comme pour l'ion sodium, le signal des ISFET à grille en Al₂O₃ n'a varié que d'un maximum de 3 mV sur toute la gamme de concentration étudiée. Aucune véritable tendance n'est identifiable. Les pH-ISFET à grille en Al₂O₃ présentent donc pour avantage sur les pH-ISFET à grille en Si₃N₄ de ne pas être sensibles aux ions alcalins.

iii. Durée de vie des pH-ISFET en phase liquide

La durée de vie des pH-ISFET a été évaluée en plaçant de manière permanente les microcapteurs dans une solution tamponnée de pH 7 et en les calibrant régulièrement jusqu'à obtention d'une dégradation du signal ou des propriétés de détection.

Dans cette étude, qui s'inscrivait plus particulièrement dans le cadre des travaux de thèse de Monsieur Ahmet Lale, nous avons réalisé des couches d'alumine Al₂O₃ en faisant varier

le procédé de fabrication : certains dépôts ALD étaient suivis d'un recuit thermique, d'autres non. Un recuit thermique effectué à 600°C permet de réorganiser la structure atomique du film d'alumine amorphe. Un recuit effectué à plus haute température (> 700°C) est responsable de la cristallisation de l'alumine qui passe alors d'une structure amorphe à une structure polycristalline. Nous avons ainsi fait varier la température du recuit : 600°C, 750°C, 800°C.

Nous avons mis en évidence le fait que, si un recuit thermique est conseillé pour obtenir de bonnes propriétés diélectriques de l'alumine, il est préférable pour le capteur ISFET final de ne pas en subir [8]. En effet, un recuit thermique à 750 °C ou plus a pour conséquence d'augmenter fortement la dérive électrique de l'ISFET et de diminuer sa durée de vie à moins de six jours en solution (Tableau 10).

	ISFET Al ₂ O ₃	ISFET Al ₂ O ₃	ISFET Al ₂ O ₃	ISFET Al ₂ O ₃	ISFET Si ₃ N ₄
Température de recuit	Non recuit	600°C	750°C	800°C	/
Durée de vie	8 jours	>15 jours (quelques semaines)	<6 jours	<6 jours	>180 jours

Tableau 10 : Comparaison des durées de vie en solution (pH=7) des ISFET planaires à grille alumine et nitrure de silicium

Il est à noter que les meilleurs résultats de dérive et de durée de vie ont été obtenus pour un recuit thermique de 600°C. Cette étude s'est limitée à une analyse sur quinze jours, principalement par manque de temps. Néanmoins, ce résultat a été corroboré par la suite dans le cadre de la thèse de Monsieur Ahmet Lale, qui, à l'aide de recuit à 600°C, a obtenu des durées de vie de composants nanoISFET Al₂O₃ de l'ordre de quelques semaines (pour autant inférieurs à celles obtenues pour les ISFET Si₃N₄).

En conclusion, même si les pH-ISFET en grille alumine non-recuite ont montré de très bonnes sensibilités (> 58 mV/pH) et sélectivité, leur durée de vie relativement courte, et le manque de recul sur cette technologie ont été rédhibitoires pour le projet INNOOPERF-Blié. Pour rappel, notre objectif est de pouvoir effectuer l'analyse du sol en continu pendant toute une saison de culture. Qu'elle soit amorphe ou polycristalline, l'alumine Al₂O₃ déposée par ALD est une couche sensible au pH encore trop peu mature au LAAS pour être retenue dans le dispositif multi-capteurs final. Notre choix se portera donc sur les pH-ISFET en nitrure de silicium, beaucoup plus prometteurs pour l'analyse en conditions réelles et à long terme.

3. Développement et caractérisation *in vitro* des pNH₄-ISFET et pNO₃-ISFET

a. Définition des besoins de détection

Agronomes et agriculteurs expriment le plus souvent les concentrations de nutriments dans le sol en kg/ha sur une profondeur de sol donnée. Ainsi, en sortie d'hiver, la couche de sol de profondeur [0-30] cm contient typiquement 15 kg/ha d'azote minéral, répartis à raison de deux tiers d'ions nitrates et d'un tiers d'ions ammonium. Au début du printemps, la concentration en azote minéral s'élève à environ 100 kg/ha.

Cependant, une fois insérés dans le sol, les ISFET ne mesureront que les ions solubilisés dans la solution liquide du sol. Or, une fraction importante des ions ammonium, notamment, est fixée sur le complexe argilo-humique du sol. Ces ions ne sont pas disponibles pour l'absorption par les plantes ou pour la détection par les microcapteurs ISFET. Les gammes de concentrations

que nos ISFET fonctionnalisés doivent détecter dans le sol ne peuvent donc pas être simplement établies à partir des chiffres ci-dessus. Nous avons défini nos objectifs de détection à partir de données issues de la bibliographie dans le domaine de l'analyse ionique des solutions de sol extraites par lysimètres. Ces dispositifs permettent la récupération de la solution du sol par diffusion ou par succion à travers un matériau poreux. Nous avons considéré que les valeurs de concentrations en ions ammonium et nitrate présentées dans ces publications reflétaient davantage le mode de fonctionnement des microcapteurs ISFET insérés dans le sol.

Un total de dix publications a été analysé. Elles couvrent différents paramètres tels que le type de culture (blé, maïs, tomate, tabac...), le type de sol, l'humidité du sol, les conditions climatiques, les pratiques de fertilisation, l'historique de la parcelle, la durée d'analyse... Les variations de concentrations observées sont résumées dans le Tableau 11.

Réf.	Concentration minimale NO ₃ ⁻ (mol/L)	Concentration maximale NO ₃ ⁻ (mol/L)	Concentration minimale NH ₄ ⁺ (mol/L)	Concentration maximale NH ₄ ⁺ (mol/L)
[11]	4,0×10 ⁻³	1,2×10 ⁻²		
[12]	7,0×10 ⁻³	1,9×10 ⁻²	4,0×10 ⁻⁴	1,5×10 ⁻³
[13]	8,6×10 ⁻⁵	5,2×10 ⁻³		
[14]	1,1×10 ⁻⁶	7,1×10 ⁻⁶		
[15]		1,0×10 ⁻²		
[16]	2,1×10 ⁻⁵	6,3×10 ⁻²	6,4×10 ⁻⁶	2,0×10 ⁻⁴
[17]	1,0×10 ⁻³	2,5×10 ⁻²	1,0×10 ⁻⁴	2,0×10 ⁻³
[18]	7,1×10 ⁻⁵	5,0×10 ⁻³	1,4×10 ⁻⁶	2,1×10 ⁻⁵
[19]	5,7×10 ⁻⁴	1,6×10 ⁻²	4,9×10 ⁻⁵	6,4×10 ⁻⁴
[20]	5,4×10 ⁻⁴	1,8×10 ⁻³		

Tableau 11 : Résumé des valeurs minimales/maximales de concentration en azote minéral de la solution de sol observées dans dix publication scientifiques.

On constate une très forte variabilité de la concentration en ions nitrates, y compris au sein d'une même saison [16]. La concentration minimale en ions nitrates ne descend pas en dessous de 1 µmol/L et se situe généralement plutôt autour de [0,5-1,0] mmol/L. La valeur maximale s'élève à 63 mmol/L. On observe au moins un ordre de grandeur de variations entre valeurs minimales et valeurs maximales.

La concentration minimale en ions ammonium est inférieure à celle des ions nitrates. Elle avoisine la gamme [0,01 - 0,10] mmol et la valeur maximale ne dépasse pas le millimolaire. Comme prévu du fait du pouvoir de sorption du sol, la variabilité de la concentration en ions ammonium dans la solution du sol est plus faible que celles des ions nitrates. On observe rarement plus d'un ordre de grandeur de variations entre les valeurs minimales et maximales.

En conclusion, ces chiffres permettent de définir nos besoins pour les gammes de concentrations à détecter avec les pNH₄-ISFET et pNO₃-ISFET développés dans le cadre du projet INNOPERF-Blé :

	pNO ₃ -ISFET	pNH ₄ -ISFET
Concentration minimale (mmol/L)	0,01	0,01
Concentration maximale (mmol/L)	100	5

Tableau 12 : Cahier des charges pour les gammes de détection à détecter

b. Développement et caractérisation *in vitro* des pNH_4 -ISFET

i. Formulation et protocole de préparation des membranes ionosensibles

Comme précédemment indiqué, la matrice polymérique choisie pour élaborer les membranes ionosensibles du projet INNOPERF-Blé est un fluoropolysiloxane (FPSX). Plus précisément, il s'agit du polytrifluoropropylméthylsiloxane obtenu à partir d'un fluorosilicone commercial (Dow Corning 730 FS). La présence du groupe fonctionnel trifluoropropyl $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ lui confère les avantages de l'augmentation de la constante diélectrique (cf. chapitre 2, partie 4a) tout en conservant les bonnes propriétés d'adhésion des siloxanes « classiques » (polydiméthylsiloxane) sur la grille du pH-ISFET en nitrure de silicium Si_3N_4 . L'ionophore de l'ammonium NH_4^+ nonactine, l'additif ionique potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTpClPB) ainsi que le tétrahydrofurane (THF) ont été fournis par Sigma-Aldrich.

Le FPSX est pesé puis mélangé au THF à raison de 133 mg/mL. La solution obtenue est ensuite centrifugée afin d'éliminer le durcisseur présent initialement dans la formulation du Dow Corning 730FS. Le FPSX purifié est contenu dans le surnageant. On extrait ce dernier et on y ajoute les ionophores et additifs ioniques. Les pourcentages massiques de chaque composant ont été optimisés pour obtenir les meilleures performances électrochimiques. Ils sont indiqués dans le Tableau 13. Ce mélange est plongé dans un bain à ultra-sons pendant 30 minutes pour s'assurer de sa bonne homogénéité. La solution de membrane ionosensible est ensuite déposée selon la méthode présentée à la partie 1d. La réticulation du FPSX s'effectue à température ambiante sous l'action de l'humidité atmosphérique [21]. Les pNH_4 -ISFET peuvent donc être utilisés environ 3 jours après le dépôt de la membrane ionosensible.

	Matrice	Ionophore	Additif ionique
Composition (%_m)	FPSX (95,0)	Nonactine (3,5)	KTpClPB (1,5)

Tableau 13 : Composition de la membrane sensible à l'ion ammonium NH_4^+

L'observation au microscope optique montre la présence de structures de forme dendritique d'une centaine de micromètres de longueur au sein des membranes ionosensibles (Figure 71). Ces structures attestent d'une mauvaise miscibilité de la nonactine dans la matrice de FPSX. On constate bien sur ces clichés que l'augmentation de la concentration en ionophore de 2,5 %_m à 5,5 %_m engendre une hausse du nombre de dendrites. Nous avons réalisé des membranes de composition identique mais en remplaçant le FPSX par une matrice de PVC (33%_m) et 2-nitrophenyl octyl ether (o-NPOE, 66%_m). Celles-ci présentent une homogénéité quasi-parfaite qui confirme le rôle du FPSX dans l'apparition de ces structures (Figure 72).

Néanmoins, comme il a été démontré que la matrice PCV est associée à des problèmes d'adhésion en filière silicium (cf. chapitre 2, partie 4a), seule la réponse potentiométrique des pNH_4 -ISFET en matrice FPSX a été caractérisée. Nous verrons si les problèmes de solubilité de la nonactine dans cette matrice d'accueil se répercutent sur les propriétés de détection de l'ion ammonium.

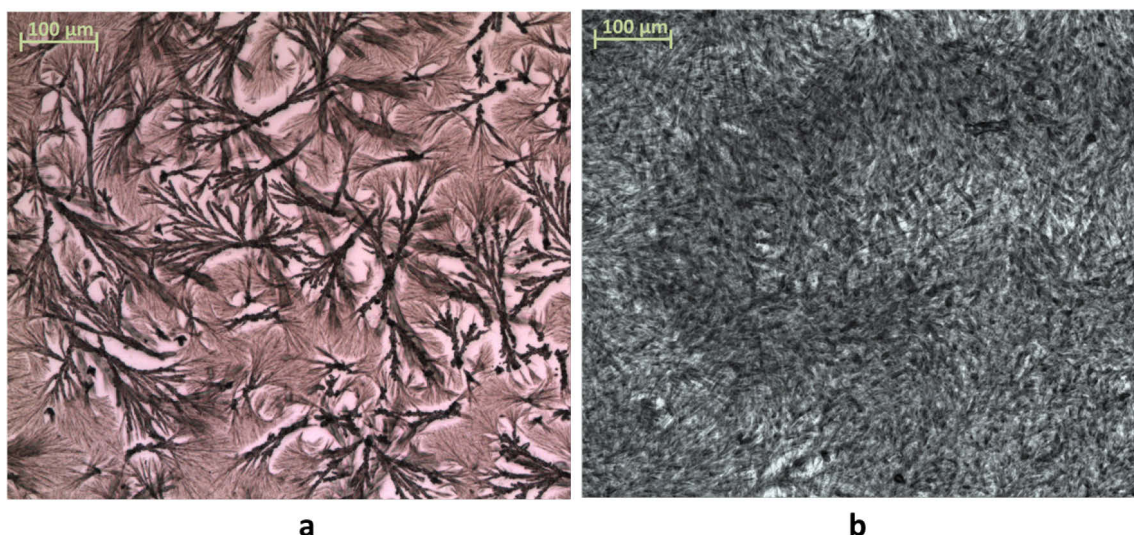


Figure 71 : Images par microscopie optique de membrane en FPSX contenant 2,5 %_m (a), ou 5,5 %_m (b) de nonactine

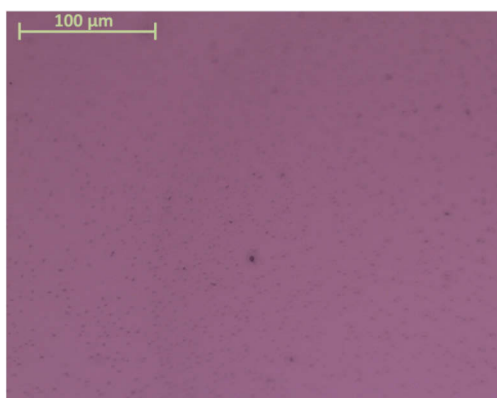


Figure 72 : Image par microscopie optique de membrane en PVC-o-NPOE contenant 2,5 %_m de nonactine

ii. Evaluation *in vitro* des propriétés de détection

Les mesures de sensibilité des pNH₄-ISFET ont été réalisées à température ambiante par ajouts successifs de solution de nitrate d'ammonium NH₄NO₃ dans de l'eau ultrapure (résistivité supérieure à 18 MΩ.cm). La réponse des microcapteurs a été enregistrée avec l'ISFETmètre et à l'aide d'une électrode de référence Ag/AgCl à double jonction (Metrohm). L'objectif de cette étude est de vérifier que les pNH₄-ISFET détectent les ions ammonium dans une gamme de concentration en accord avec celles des solutions de sols cultivés (cf. partie 3a). Ces conditions *in vitro* sont idéales du point de vue du capteur ISFET puisque l'on mesure en phase 100% liquide et sans présence d'espèces interférentes.

Les principales propriétés de détection ont été déterminées à partir de la courbe de calibration selon les méthodes présentées en partie 3a du chapitre précédent (Figure 73). Elles sont résumées dans le Tableau 14. La sensibilité des pNH₄-ISFET, 59,0 mV/pNH₄, atteint pratiquement la valeur maximale prévue par la loi de Nernst. La limite de détection et la gamme de linéarité de la réponse sont en accord avec les concentrations en ammonium typiquement rencontrées sur les parcelles agricoles (Tableau 12). Ces bonnes propriétés de détection prouvent que les structures dendritiques ne perturbent pas la réponse électrochimique. Une étude de la durée de vie des pNH₄-ISFET a été réalisée dans le sol. Elle sera présentée au cours du prochain chapitre et confirme que les propriétés de détection sont conservées, même après une longue période de fonctionnement en milieu réel.

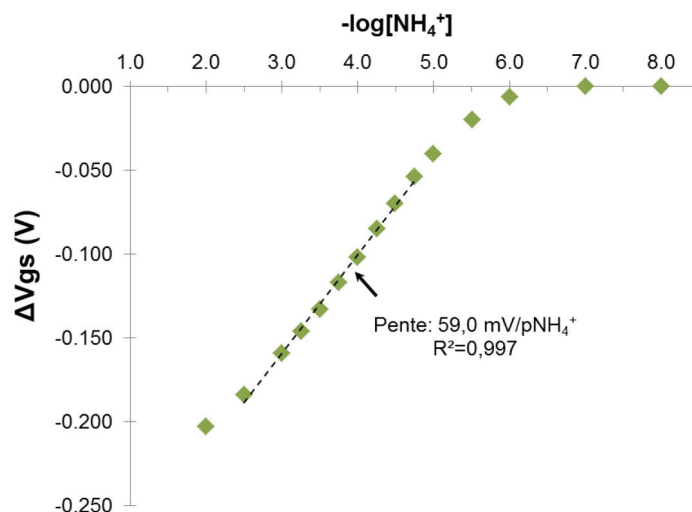


Figure 73 : Courbe de calibration du pNH₄-ISFET réalisée en solutions aqueuses de nitrate d'ammonium NH₄NO₃ de concentration variable

Sensibilité (mV/pNH ₄)	Limite de détection (μM)	Gamme de linéarité de la réponse (pNH ₄)
59,0	3,2	[2,5 – 5]

Tableau 14 : Résumé des principales propriétés de détection des pNH₄-ISFET

La Figure 74 représente la réponse temporelle d'un pNH₄-ISFET aux variations de concentration en ion ammonium. Le signal se stabilise en moins d'une minute suite à chaque changement de concentration. Ce bon temps de réponse est essentiellement dû à la faible résistivité du FPSX.

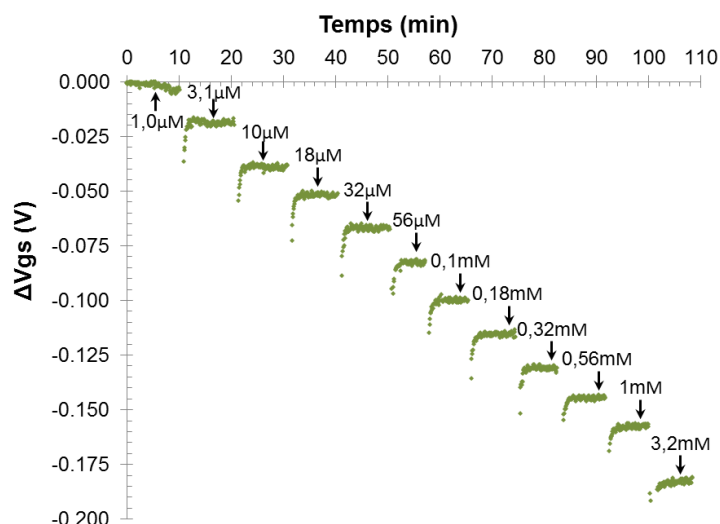


Figure 74 : Réponse temporelle d'un pNH₄-ISFET à l'augmentation de concentration en nitrate d'ammonium NH₄NO₃ de la solution analysée

Les pNH₄-ISFET se trouveront nécessairement en présence de la multitude de cations du sol. Par conséquent, il est important de connaître l'influence qu'auront ces cations sur la mesure. La sélectivité des pNH₄-ISFET a donc été étudiée par la méthode FIM (cf. chapitre 2, partie 3bi). Pour rappel, son principe est de mesurer la réponse potentiométrique du microcapteur suite aux variations de concentration de l'ion cible, ici l'ion ammonium, en présence d'une concentration constante d'un ion interférent. La méthode employée est en fait la même que pour la

détermination de la sensibilité, en remplaçant simplement l'eau ultrapure par une solution aqueuse contenant une concentration connue en un ion interférent.

Nous avons analysé l'interférence exercée par les principaux cations des sols : potassium K^+ , sodium Na^+ , calcium Ca^{2+} , magnésium Mg^{2+} et lithium Li^+ . Les solutions aqueuses ont été réalisées, respectivement, à partir de sels de chlorure de potassium KCl, de chlorure de sodium NaCl, de chlorure de calcium $CaCl_2$, de sulfate de magnésium $MgSO_4$ et d'acétate de lithium CH_3COOLi . Conformément aux recommandations de l'IUPAC, les concentrations de ces solutions ont été adaptées jusqu'à obtention d'une réponse quasi-nernstienne de la part du pNH_4 -ISFET [22]. Les coefficients de sélectivité déduits des courbes de réponse potentiométrique (Figure 75) ont été calculés selon la formule ci-dessous puis classés dans le Tableau 15 par ordre croissant de sélectivité :

$$K_{ij}^{pot} = \frac{a_i}{a_j^{z_i/z_j}} \quad (78)$$

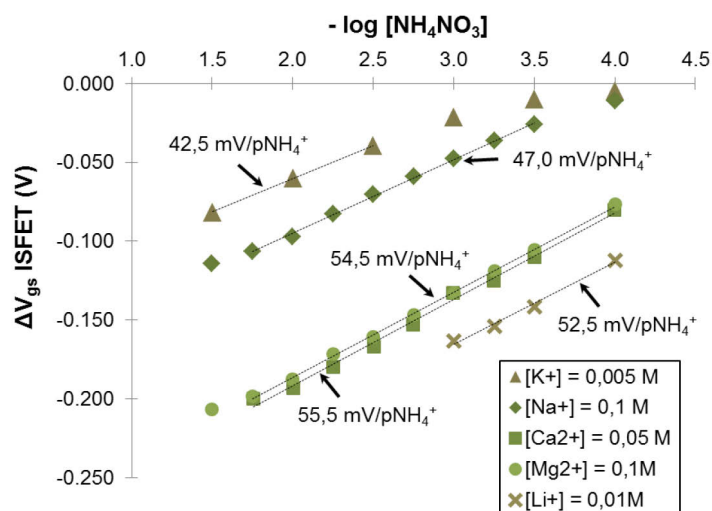


Figure 75 : Courbe de calibration du pNH_4 -ISFET réalisée en présence d'une concentration fixe en ion interférent (Méthode FIM). La valeur de la concentration est indiquée dans la légende.

	ce travail	Réf. [23]	Réf. [24]	Réf. [25]	Réf. [26]
Matrice	FPSX	PVC-NPOE	PVC-DOS	PVC-DOS	Silicone (Siloprene)
$\text{Log } K_{NH_4^+, K^+}^{pot}$	-1,2	-1,4	-1,0	-1,2	-1,0
$\text{Log } K_{NH_4^+, Na^+}^{pot}$	-3,0	-2,2	-1,8	-3,0	-2,3
$\text{Log } K_{NH_4^+, Li^+}^{pot}$	-4,1	-2,1	-1,7	-4,7	-2,1
$\text{Log } K_{NH_4^+, Ca^{2+}}^{pot}$	-4,8	-3,4	-1,8	-4,7	-3,8
$\text{Log } K_{NH_4^+, Mg^{2+}}^{pot}$	-5,0	-3,4	NC	-3,8	-3,6

Tableau 15 : Coefficients de sélectivité obtenus et comparés avec d'autres membranes basées sur l'ionophore nonactine issue de la littérature scientifique

Excepté le cas de l'ion potassium, les coefficients de sélectivité obtenus avec la membrane FPSX sont excellents pour tous les autres ions étudiés. Notre pNH_4 -ISFET présente quasiment toujours les meilleurs coefficients en comparaison avec les autres capteurs basés sur

des matrices de PVC ou silicone. Ces améliorations sont probablement attribuables à la matrice FPSX. En conséquence, les ions sodium, lithium, calcium et magnésium ne devraient pas poser problème dans le cadre de l'analyse du sol. En revanche, la membrane de notre pNH_4 -ISFET est fortement sensible à la présence des ions potassium. Ce manque de sélectivité n'est pas une surprise du fait de l'utilisation de l'ionophore nonactine. Le coefficient obtenu sur les capteurs développés par d'autres équipes de recherche est d'ailleurs toujours proche du nôtre. Comme expliqué au chapitre 2, il n'y a malheureusement aujourd'hui pas de meilleure alternative à l'utilisation de l'ionophore nonactine. Nous devons évaluer par la suite si ce manque de sélectivité constitue un verrou pour la détection de l'ion ammonium dans le sol.

En conclusion, ces études *in vitro* valident les étapes de développement de notre pNH_4 -ISFET et notamment la composition de la membrane sensible aux ions ammonium. Le microcapteur dispose globalement de très bonnes propriétés de détection. Sa sensibilité est proche du maximum théorique et elle est tout à fait compatible avec les teneurs en ions ammonium typiquement rencontrées dans les sols cultivés.

c. Développement et caractérisation *in vitro* des pNO_3 -ISFET

i. Formulation des membranes ionosensibles

Les membranes sensibles aux ions nitrates NO_3^- ont été élaborées en utilisant la même méthode que pour la fabrication des pNH_4 -ISFET. Nous avons à nouveau fait le choix d'utiliser le FPSX comme matrice pour les raisons déjà évoquées. Trois membranes de compositions différentes ont été réalisées afin de comparer les propriétés de détections obtenues en utilisant différentes molécules ionosensibles : les échangeurs d'ions tridodecylammonium nitrate et tétradodecylammonium nitrate ainsi que l'ionophore commercial Nitrate Ionophore V (cf. chapitre 2, partie 4bii). Les additifs ioniques utilisés sont le potassium tetrakis[3,5-bis(trifluorométhyl)phényl]borate (KTFPB) ainsi que le tridodecylammonium chloride. Excepté le FPSX (Dow Corning) et le Nitrate Ionophore V (Santa Cruz Biotechnology), tous les autres composants des membranes ont été fournis par Sigma-Aldrich. La composition des membranes est précisée dans le Tableau 16.

Membrane	Matrice	Ionophore	Additif ionique
1	FPSX (94,5 % _m)	Tridodecylmethylammonium nitrate (3,0 % _m)	KTFPB (2,5 % _m)
2	FPSX (97,1 % _m)	Nitrate Ionophore V (1,8 % _m)	Tridodecylmethylammonium chloride (1,1 % _m)
3	FPSX (93,6 % _m)	Tétradodecylammonium nitrate (4,0 % _m)	KTFPB (2,4 % _m)

Tableau 16 : Composition des membranes sensibles à l'ion nitrate NO_3^- . Les pourcentages massiques %_m sont précisés entre parenthèses.

ii. Evaluation *in vitro* des propriétés de détection

Avant d'envisager l'utilisation des pNO_3 -ISFET dans les conditions de l'application à l'analyse des sols cultivés, nous avons d'abord étudié leur sensibilité de manière *in vitro*. Les mesures ont été réalisées en suivant la méthode utilisée pour les pNH_4 -ISFET, c'est-à-dire par ajouts successifs de solution de nitrate d'ammonium NH_4NO_3 dans de l'eau ultrapure. Les principales propriétés de détection obtenues à partir des courbes de calibrations (Figure 76) sont résumées dans le Tableau 17.

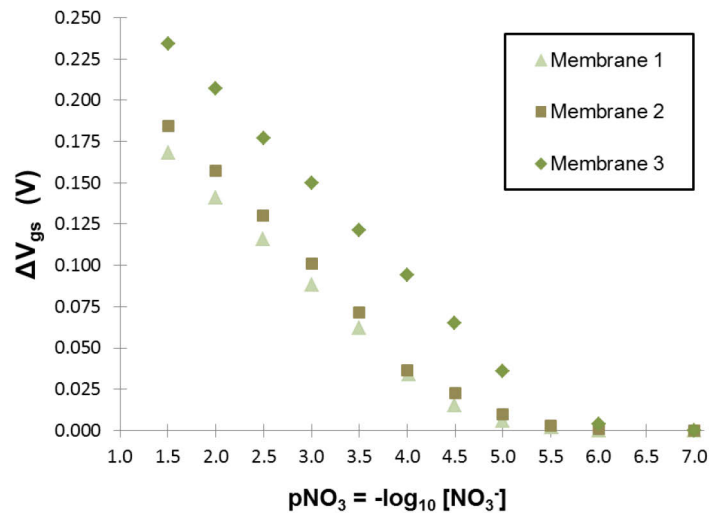


Figure 76 : Courbe de calibration des 3 types de pNO₃-ISFET réalisée en solutions aqueuses de nitrate d'ammonium NH₄NO₃ de concentration variable

Membrane	Sensibilité (mV/pNO ₃)	Limite de détection (μM)	Gamme de linéarité de la réponse (pNO ₃)
1	53,0	20	[1,5 - 4,5]
2	56,2	17	[1,5 - 4,5]
3	56,5	2,25	[1,5 - 5,0]

Tableau 17 : Résumé des principales propriétés de détection des pNO₃-ISFET

Les pNO₃-ISFET n°2 et n°3 ont une sensibilité quasi-Nernstienne. L'ISFET fonctionnalisé avec la membrane n°1 répond lui légèrement plus faiblement aux variations de concentrations en ions nitrates (53,0 mV/pNO₃). En revanche, le pNO₃-ISFET n°3 se distingue nettement des deux autres. Sa limite de détection avoisine 1 μM, soit presque dix fois moins que les membranes n°1 et n°2. De plus, il répond linéairement jusqu'à pNO₃=5,0 ce qui rend possible sa calibration dans une large gamme de concentrations.

Concernant la sensibilité aux ions nitrates, même si la membrane n°3 confère des propriétés de détection légèrement supérieures, les trois membranes développées sont néanmoins compatibles avec les teneurs en ions nitrate du sol définies à la partie 3a. Nous allons à présent étudier si l'une de ces membranes se démarque en matière de sélectivité, ce qui nous permettra *in fine* de désigner la formulation de membrane à utiliser pour la suite du projet.

La méthode FIM a été employée pour caractériser l'influence des principaux anions du sol, les ions chlorures Cl⁻, sulfates SO₄²⁻, phosphates PO₄³⁻, acétates CH₃COO⁻ et dihydrogénophosphates H₂PO₄⁻. Les solutions aqueuses utilisées pour ces caractérisations étaient, respectivement : du chlorure de potassium KCl, du sulfate de magnésium MgSO₄, du phosphate de sodium Na₃PO₄, de l'acétate de lithium CH₃COOLi et du dihydrogénophosphate de potassium KH₂PO₄. Les coefficients de sélectivité déduits des courbes de calibration (Figure 77) ont été calculés selon l'équation (78) et rangés dans le Tableau 18.

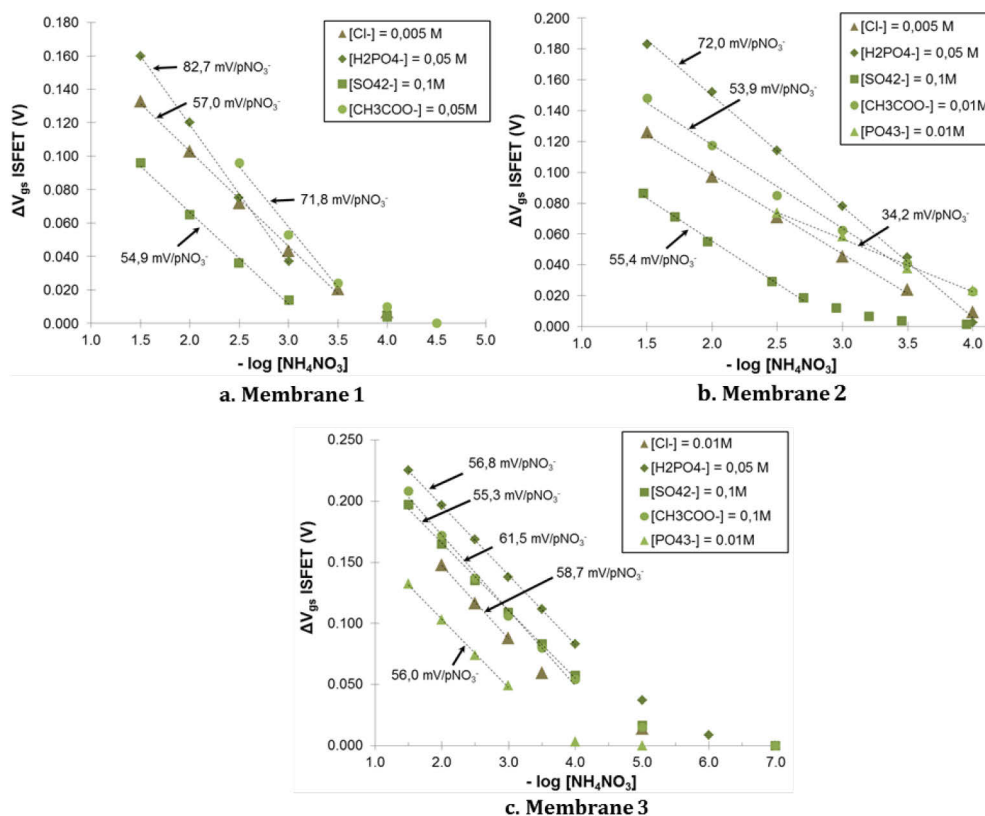


Figure 77 : Courbes de calibration des trois types de pNO₃-ISFET en présence d'une concentration fixe en ion interférent (Méthode FIM). La valeur de la concentration est indiquée dans la légende

	Membrane 1	Membrane 2	Membrane 3
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{Cl}^-}^{\text{pot}}$	-1,5	-1,6	-2,5
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{CH}_3\text{COO}^-}^{\text{pot}}$	-2,5	-2,5	-3,8
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{H}_2\text{PO}_4^-}^{\text{pot}}$	-2,1	-2,9	-4,2
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{SO}_4^{2-}}^{\text{pot}}$	-2,7	-3,1	-4,5
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{PO}_4^{3-}}^{\text{pot}}$	NC	-4,0	-3,2

Tableau 18 : Coefficients de sélectivité obtenus pour chacune des 3 membranes sensibles

Les coefficients de sélectivité obtenus avec la membrane n°1 sont globalement moyens. L'interférence la plus forte est celle des ions chlorures Cl⁻, comme prévu du fait de leur énergie d'hydratation similaire aux ions nitrates NO₃⁻. Cette faible sélectivité envers les ions chlorures pourrait poser problème lors de l'application à l'analyse des sols, notamment dans les régions proches du littoral où les concentrations sont plus élevées. Globalement, on note que les coefficients de sélectivité obtenus avec la membrane n°1 vont dans le sens dicté par la série d'Hofmeister [27], ce qui n'est pas surprenant puisque sa formulation se compose de l'échangeur d'ions tridodecylmethylammonium nitrate. La formulation de cette membrane contient aussi l'échangeur cationique KTFPB dans une moindre proportion. Sa présence n'est pas requise pour l'obtention d'une réponse nernstienne mais l'objectif initial était d'observer une éventuelle amélioration de la sélectivité [28]. Finalement, l'ajout du KTFPB n'a pas abouti à des coefficients de sélectivité qui se distinguent positivement des membranes contenant seulement le tridodecylmethylammonium nitrate [29][30].

En revanche, les résultats de la membrane n°2 sont plus inattendus. Nous avons initialement sélectionné l'ionophore « Nitrate Ionophore V » parce qu'il présente, à ce jour, la

meilleure sélectivité référencée dans la littérature scientifique pour un ionophore commercial, notamment en ce qui concerne les ions chlorures (cf. chapitre 2, partie 4bii). En effet, les coefficients de sélectivité $\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{Cl}^-}^{\text{pot}}$ obtenus avec une matrice de PVC-o-NPOE s'élèvent à -3,4 [31] [32]. Or, on ne constate dans notre cas qu'une légère amélioration de la sélectivité par rapport à la membrane n°1. Malgré l'utilisation d'un véritable ionophore, la membrane n°2 montre des propriétés échangeuses d'ions fortes, que l'on peut remarquer à travers les coefficients qui suivent également la série d'Hofmeister.

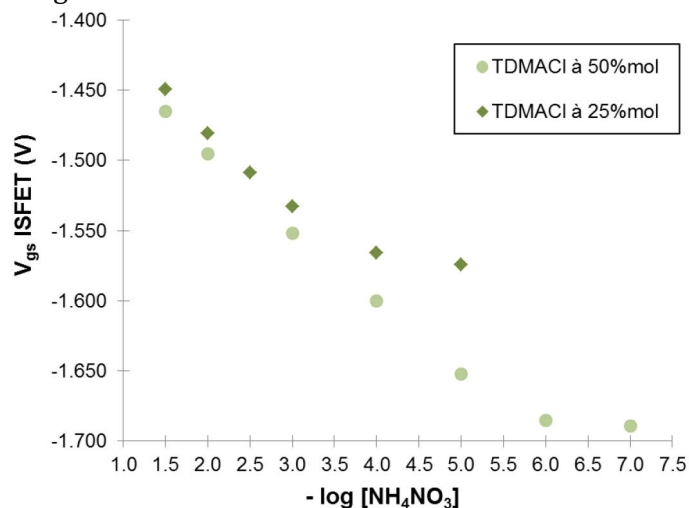


Figure 78 : Courbes de calibration de pNO₃-ISFET réalisées par ajouts de solution de nitrate d'ammonium dans de l'eau ultrapure. Les pNO₃-ISFET ont été fonctionnalisés avec la membrane n°II (TDMACI à 50 %_{mol}) ainsi qu'avec une membrane contenant les mêmes composés sensibles mais avec une fraction molaire [additif]/[ionophore] de 25 %_{mol} (TDMACI à 25 %_{mol})

Nous avons donc réalisé une nouvelle membrane composée de FPSX, de l'ionophore «Nitrate Ionophore V» et de l'échangeur d'ions tridodecylmethylammonium chloride en abaissant la fraction molaire de ce dernier par rapport à l'ionophore. L'objectif était de voir si les propriétés échangeuses d'ions de la membrane étaient diminuées au bénéfice d'une véritable sélectivité causée par l'ionophore. Dans cette nouvelle formulation, la fraction molaire s'élevait à 25 %_{mol}, contre 50 %_{mol} dans le cas initial (membrane n°2). La courbe de calibration d'un pNO₃-ISFET fonctionnalisé avec cette membrane est représentée à la Figure 78. On observe que la diminution de la quantité de tridodecylmethylammonium chloride a dégradé la limite de détection de plus d'un ordre de grandeur. Il devient impossible de constater l'effet de la concentration en additif ionique sur la sélectivité de l'ISFET et les investigations dans cette voie ont donc été stoppées.

De tels écarts de sélectivité de la membrane n°2 par rapport aux chiffres de la littérature sont probablement imputables aux propriétés de la matrice de FPSX puisque toutes ces autres études se basent sur le PVC. Malheureusement, comme cela a été expliqué au chapitre précédent, l'utilisation du PVC n'est pas une option dans notre cas étant donné sa mauvaise adhésion sur la grille de l'ISFET en nitrure de silicium Si₃N₄.

Enfin, la sélectivité de la membrane n°3 est indéniablement meilleure. Concernant les ions chlorures, le coefficient de sélectivité affiche un ordre de grandeur de plus que les deux autres formulations. L'ion chlorure reste le principal interférent mais le coefficient $\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{Cl}^-}^{\text{pot}}$ de -2,5 devrait être suffisant pour l'analyse des sols. Bien que le tetradodecylammonium nitrate soit un échangeur d'ion, la sélectivité envers les ions phosphate est étrangement moins bonne que celle envers les ions sulfates et ne semble donc pas suivre la série d'Hofmeister sur ce point.

Néanmoins, les coefficients obtenus pour ces deux ions demeurent excellents. Ils sont en très bonne adéquation avec les coefficients présentés dans la littérature pour des membranes en matrice PVC également constituées de l'échangeur tetradodecylammonium (Tableau 19). Le remplacement du PVC par le FPSX et l'ajout de l'additif cationique KTFPB n'ont donc pas généré une réponse sélective significativement différente.

En revanche, la présence du KTFPB pourrait avoir un effet bénéfique sur la stabilité du signal du pNO₃-ISFET. Les dérives temporelles observées pour des membranes sans KTFPB sont nettement supérieures à celles des membranes constituées de KTFPB (Figure 79). Ce résultat doit être modéré car l'étude a été conduite sur un même lot d'ISFET fonctionnalisés avec la même solution de membrane ionosensible dépourvue de KTFPB. Cette plus forte dérive temporelle pourrait être la conséquence d'autres phénomènes.

	Réf. [33]	Réf. [34]	Réf. [35]	Membrane 3
Matrice	PVC-NPOE	PVC-NPOE	PVC-NPOE	FPSX
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{Cl}^-}^{\text{pot}}$	-2,4	-2,42	-2,6	-2,5
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{CH}_3\text{COO}^-}^{\text{pot}}$	NC	-2,89	NC	-3,8
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{H}_2\text{PO}_4^-}^{\text{pot}}$	-4,4	-3,33	-3,6	-4,2
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{SO}_4^{2-}}^{\text{pot}}$	-4,8	-4,33	-4,1	-4,5
$\text{Log } K_{\text{NO}_3^-, \text{PO}_4^{3-}}^{\text{pot}}$	NC	NC	NC	-3,2

Tableau 19 : Comparaison des coefficients de sélectivité de la membrane n°3 avec des travaux issus de la littérature scientifique

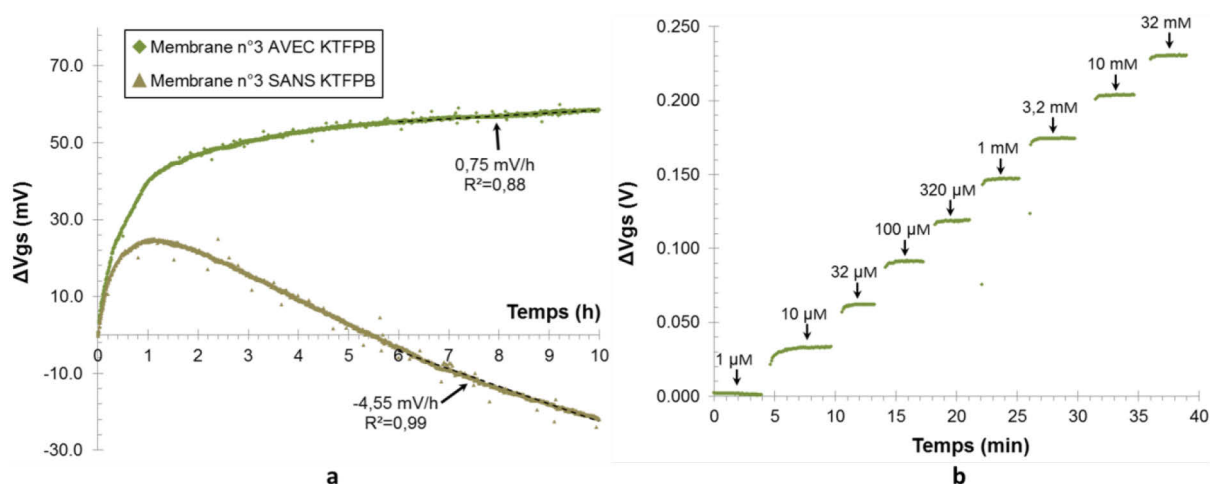


Figure 79 : (a), Etude de la stabilité temporelle des pNO₃-ISFET fonctionnalisés avec la membrane n°3 (échangeur d'ions tetradodecylammonium nitrate) avec et sans additifs KTFPB. La solution utilisée était du nitrate d'ammonium à 100 mM. (b), réponse temporelle d'un pNO₃-ISFET à l'augmentation de concentration en nitrate d'ammonium NH₄NO₃ de la solution analysée

En conclusion, les caractérisations *in vitro* montrent de manière incontestable que la membrane n°3 offre les meilleures propriétés de détection, que ce soit en termes de sensibilité, de sélectivité ou encore de gamme de linéarité de la réponse. Ces propriétés sont compatibles avec les gammes de concentrations en ions nitrate à détecter dans le sol, définies à la partie 3a. Cette formulation de membrane sera donc employée par la suite pour la fonctionnalisation des pNO₃-ISFET du projet INNOPERF-BIé.

4. Développement et intégration d'une électrode de référence miniature « tout solide »

a. Introduction

Le signal de sortie d'un ISFET ou d'une ISE correspond à une différence de potentiel électrique mesurée par rapport au potentiel de l'électrode de référence. Cette dernière a donc un rôle aussi important que l'électrode indicatrice pour le système de détection final : fournir un potentiel stable et ne dépendant pas de la composition du milieu d'analyse. Dans le cadre du projet INNOPERF-Blé, nous avons travaillé en parallèle autour de deux problématiques :

1. La recherche d'une électrode de référence commerciale de dimension macroscopique disposant d'une durée de vie d'au moins 5 mois dans le sol. Les résultats seront présentés dans le chapitre suivant, dédié à l'analyse du sol.
2. L'intégration sur la puce INNOPERF-Blé d'une électrode de référence miniature.

La mesure à long terme (au moins quelques mois) en environnement complexe (sols, eaux environnementales, liquides biologiques,...) avec des microcapteurs potentiométriques entièrement intégrés est encore aujourd'hui une problématique scientifique non résolue. L'une des principales raisons est le fait qu'aucune électrode de référence miniature ne dispose d'un potentiel aussi stable et invariable que celui d'une électrode de référence conventionnelle [36] [37]. Cette absence a empêché jusqu'ici la diffusion à grande échelle des capteurs potentiométriques dans des applications industrielles et grand public [38].

Dans ce contexte, nous avons voulu travailler sur le développement d'une électrode de référence miniature intégrée. Manifestement, cette électrode ne posséderait pas les caractéristiques essentielles pour effectuer le suivi des nutriments du sol durant plusieurs mois. Toutefois, cette étude permet d'envisager une approche de l'analyse du sol, légèrement hors du cadre du projet INNOPERF-Blé, consistant à faire de la mesure ponctuelle sur site avec un capteur jetable car à très faible coût.

On peut distinguer trois principales stratégies d'intégration d'une électrode de référence sur un substrat en silicium:

1. Les pseudo-électrodes de référence (Figure 80a). Le potentiel de ces électrodes varie de manière prévisible selon la composition ionique du milieu d'analyse. C'est le cas de l'électrode en argent/chlorure d'argent Ag/AgCl dont le potentiel dépend de la concentration en ions chlorures Cl^- de la solution dans laquelle elle est plongée (cf. chapitre 2, partie 2a),
2. Les électrodes « tout solide » basées sur un électrolyte solide assurant une insensibilité du potentiel à la composition ionique du milieu d'analyse (Figure 80b),
3. Les électrodes de référence constituées d'un électrolyte liquide séparé du milieu d'analyse par une barrière de diffusion réalisée par micro-usinage du silicium (Figure 80c).

Parmi les trois stratégies brièvement présentées, la seconde semblait la plus adaptée à l'analyse du sol. Les concentrations en ions chlorures peuvent en effet varier d'un sol à l'autre ce qui limite l'utilisation des pseudo-électrodes de référence. Les électrodes à jonction liquide

miniature usinée dans le silicium présent, quant à elles, des durées de vie très faibles dues à l'évaporation ou la diffusion rapide de l'électrolyte liquide stocké dans un réservoir de faible volume. De plus, le procédé de micro-usinage du silicium est relativement complexe [39] [40]. Nous avons donc choisi de développer une électrode « tout solide » basée sur une couche de type AgCl recouverte d'une matrice polymérique jouant le rôle d'électrolyte solide (stratégie n°2). Nous avons ainsi pu bénéficier des très nombreuses contributions scientifiques sur les propriétés électrochimiques et les techniques de fabrication des films d'AgCl.

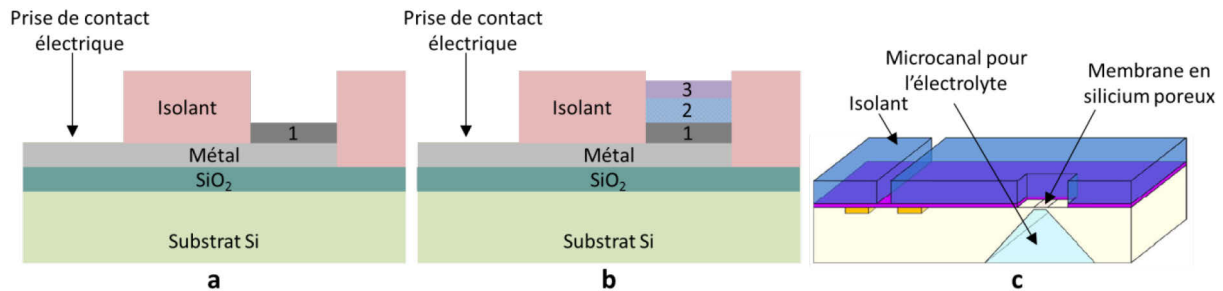


Figure 80 : Représentation schématique des stratégies n°1 (a), n°2 (b) et n°3 (c) d'intégration de l'électrode de référence miniature sur un substrat en silicium. Sur les schémas (a) et (b), (1) est un sel métallique ou un oxyde métallique peu soluble dans l'eau, (2) est un électrolyte solide, (3) est une couche de protection optionnelle. Le schéma (c) a été adapté de [36]

Les dimensions des couches d'argent Ag et de chlorure d'argent AgCl ont un fort impact sur les caractéristiques électrochimiques des électrodes de référence Ag/AgCl. La durée de vie de l'électrode dépend essentiellement de la dissolution de la couche AgCl qui sera d'autant plus rapide que son épaisseur est faible [39]. Une trop faible épaisseur ou surface active de la couche AgCl entrainera une dérive importante du potentiel de l'électrode [41] [42]. Ainsi, la réduction de la stabilité/durée de vie est le prix à payer pour la miniaturisation et l'intégration des électrodes de référence. Il faut donc privilégier une technique de dépôt de ces couches qui garantit une épaisseur suffisante.

La principale approche pour maintenir la concentration en ions chlorures constante au niveau de la couche AgCl consiste à intégrer du chlorure de potassium KCl au sein d'une matrice polymérique solide. De très nombreux polymères ont été étudiés dans ce sens. Certains appartiennent à la famille des hydrogels comme les gels de polyacrylamide [43], d'agarose [44] ou d'agar-agar [45]. Ces hydrogels sont assimilables à des jonctions liquides. Le KCl est alors solubilisé et retenu au sein des pores du matériau. Des polymères hydrophobes tels que le PVC [41] [46], des résines époxydes [47] ou encore des silicones [48] [49] sont également utilisés comme matrice d'accueil du KCl. Dans ce cas, la matrice de polymère et les cristaux de KCl forment deux phases distinctes. Lorsque l'électrode est immergée dans une solution aqueuse, la poudre de KCl est localement dissoute. La concentration en ions chlorures à la surface de la couche AgCl est alors saturée ce qui assure la stabilité du potentiel de l'électrode. Pour l'ensemble de ces membranes polymériques, la stabilité de l'électrode, et *in fine* sa durée de vie, dépend fortement de sa capacité à maintenir la concentration en ions chlorures constante au niveau de l'AgCl. Les ions chlorures auront en effet tendance à diffuser vers la solution analysée au cours du temps. Une énième couche peut donc être ajoutée à l'empilement afin de jouer le rôle de barrière de diffusion. Elle engendre un temps d'hydratation plus long retardant le moment où l'électrode de référence est disponible pour la mesure mais, en contrepartie, elle prolonge sa durée de vie en diminuant la diffusion des ions chlorures. Plusieurs matériaux ont été étudiés pour cette fonction : le Nafion [50], le PVC [41] ou encore de l'oxyde de graphène [51].

Quelques électrodes de référence « tout solide » ont été réalisées en utilisant une approche moins conventionnelle pour s'affranchir de la sensibilité ionique. Elles se basent sur l'incorporation de liquides ioniques ou de sels immiscibles à l'eau au sein de matrice polymérique hydrophobe [52]. Par exemple, Mamińska et al. ont utilisé le liquide ionique 1-dodecyl-3-méthylimidazolium chloride dans une matrice de PVC afin de maintenir la concentration en ions chlorures constante au niveau de l'électrode d'AgCl [53].

Durant ces travaux de thèses, nous avons, dans un premier temps, élaboré des membranes en utilisant un gel d'agarose comme support du KCl (2%_m d'agarose dans une solution de KCl à 0,5 M). Cependant, l'adhésion de ce gel sur les zones passivées (film sec) de nos électrodes Ag/AgCl miniatures était extrêmement mauvaise. Malheureusement, nous n'avons pas identifié de solution simple pour intégrer ces membranes de manière satisfaisante sur les dispositifs. Les quelques résultats obtenus, plutôt encourageants, ne seront donc pas présentés. Nous avons finalement décidé de développer de nouvelles membranes en PDMS. Au contraire de l'agarose, ce polymère présente une excellente accroche sur le film sec facilitant ainsi son intégration.

b. Fabrication de l'électrode Pt/Ag/AgCl/PDMS-KCl

A partir de l'électrode métallique constituée du bicouche titane/platine, la fabrication de l'électrode de référence miniature s'effectue en trois principales étapes détaillées dans les prochains paragraphes. La première est le dépôt du film d'argent sur une électrode métallique. Elle est suivie par la formation d'une couche de chlorure d'argent à la surface du film d'argent. Finalement, la membrane polymérique dopée en KCl est déposée. Ces deux premières étapes ont été développées dans le cadre des travaux de post-doctorat de Madame Fadhila Sekli. Elles ont d'abord été validées sur l'électrode planaire présentée au début du chapitre (Figure 59).

i. Dépôt du film d'argent sur l'électrode de platine

Il existe plusieurs techniques de dépôt du film d'argent. Il est possible d'employer les méthodes de dépôts sous vide par phase vapeur (PVD), « classiques » du domaine de la microélectronique sur silicium : pulvérisation cathodique (sputtering), évaporation sous vide par effet joule ou par faisceau d'électrons... Une seconde option est le dépôt électrolytique de l'argent : le film d'argent est formé par la réduction d'ions argent Ag^+ présents en solution aqueuse sur notre électrode de platine jouant le rôle de cathode. Une dernière alternative consiste à déposer directement une encre ou une pâte d'Ag/AgCl en utilisant, par exemple, la technique de sérigraphie (screen printing).

Nous avons finalement choisi la méthode de dépôt électrolytique de l'argent par le procédé de chronoampérométrie : le potentiel est fixé à une valeur constante et l'intensité électrique varie au cours du dépôt. Le dépôt électrolytique offre de multiples avantages :

- excellent contrôle de la localisation du film d'argent sur la puce en silicium sans passer par une étape de masquage,
- excellent contrôle de l'épaisseur déposée et possibilité d'obtenir des films épais, condition essentielle à la stabilité de l'électrode Ag/AgCl,
- méthode reproductible avec peu de pertes de matière.

L'électrode de platine est préalablement activée dans une solution d'acide sulfurique H_2SO_4 à 0,5 M. Pour cela, une voltammétrie cyclique est effectuée à l'aide d'un potentiostat (VMP3 de BioLogic Science Instruments) dans une configuration à trois électrodes. 30 cycles de balayage du potentiel dans la gamme [-0,3 - 1,2] V vs. Ag/AgCl/Sat. KCl sont effectués à une

vitesse de 500 mV/s. L'activation du platine a pour but d'éliminer les impuretés de surface et d'opérer un réarrangement structural superficiel du métal [54]. De plus, la comparaison visuelle du voltammogramme obtenu (Figure 81) avec le voltammogramme théorique permet de vérifier que notre électrode de platine n'a pas été polluée ou dégradée au cours de la fabrication. On observe en effet les pics de réduction et d'oxydation qui sont caractéristiques du matériau :

- Réduction du proton H^+ et oxydation de l'hydrogène entre -0,25 et 0 V vs. Ag/AgCl/Sat. KCl,
- Oxydation du platine à partir de 0,6 V vs. Ag/AgCl/Sat. KCl,
- Pic de réduction des oxydes autour de 0,45 V vs. Ag/AgCl/Sat. KCl.

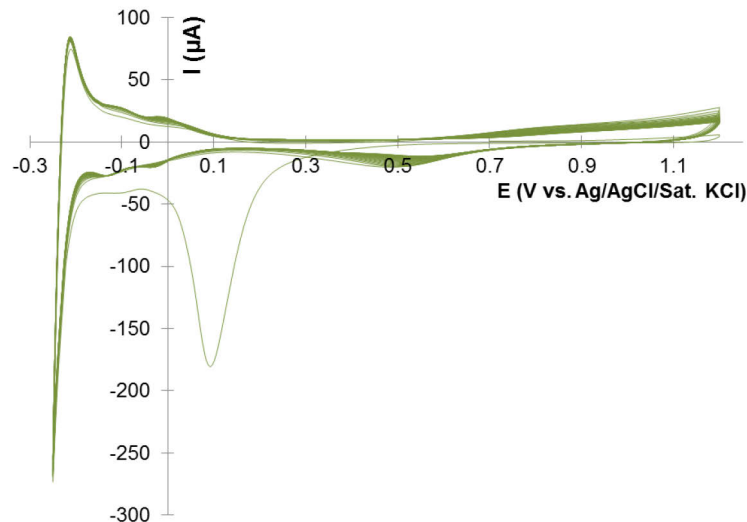


Figure 81 : Voltammogramme cyclique de l'électrode de platine planaire dans une solution d'acide sulfurique à 0,5 M obtenu avec une vitesse de balayage de 500 mV/s.

Après activation du platine, on procède au dépôt de l'argent par chronoampérométrie (Figure 82). L'électrode de platine est immergée dans une solution aqueuse composée de nitrate d'argent $AgNO_3$ à 0,3 M ainsi que d'ammoniaque NH_4OH à 1 M. A l'aide d'un potentiostat et selon un montage à trois électrodes, le potentiel de l'électrode de platine est porté à -20 mV vs. Ag/AgCl/Sat. KCl pendant une durée de 180 s. Les ions Ag^+ du sel d' $AgNO_3$ dissocié dans l'eau sont réduits sur l'électrode de platine selon la réaction :



La caractérisation du dépôt d'argent au microscope électronique à balayage (MEB) montre une importante rugosité de surface (Figure 83). Elle permet une augmentation significative de la surface active de l'électrode qui jouera en faveur de sa stabilité et de sa durée de vie.

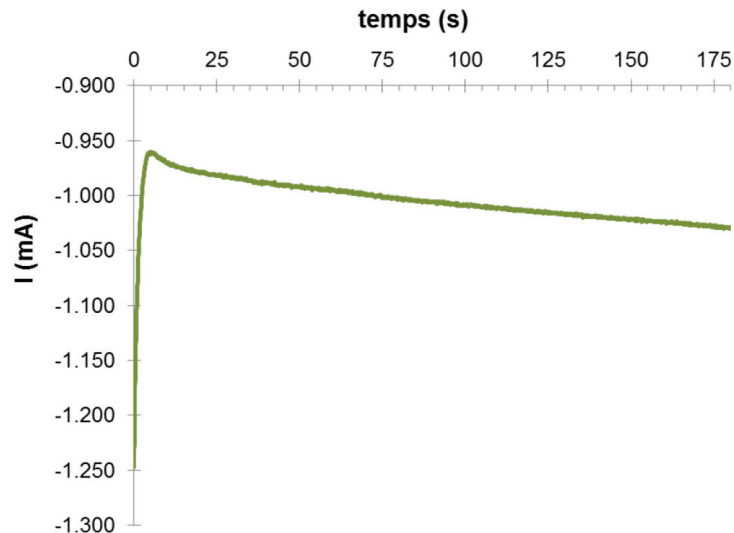


Figure 82 : Courbe $I(t)$ de chronoampérométrie obtenue lors du dépôt de l'argent sur l'électrode de platine.

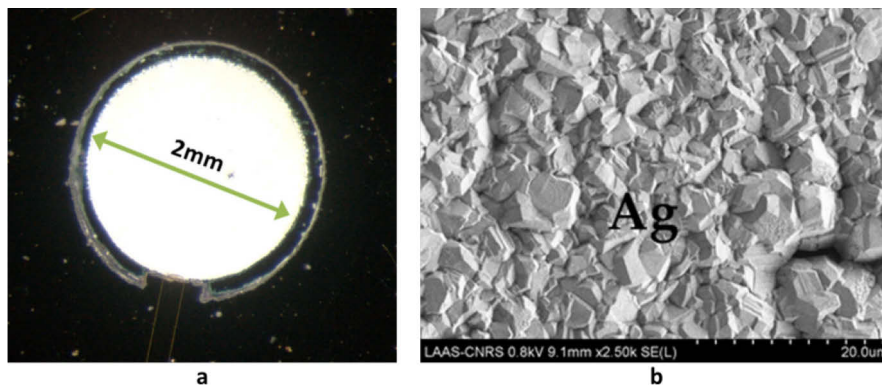


Figure 83 : Images à la loupe binoculaire (a) et au MEB (b) de l'électrode d'argent obtenue après dépôt par chronoampérométrie.

ii. Formation d'une couche de chlorure d'argent en surface du film d'argent

Il existe également plusieurs techniques de production du chlorure d'argent AgCl à la surface du film d'argent. La méthode la plus simple est la réaction chimique spontanée entre l'électrode d'argent et une solution aqueuse de chlorure de fer (III) FeCl_3 dans laquelle elle est plongée [55]. Elle présente pour avantage de ne pas nécessiter d'appareillage particulier. L'inconvénient de cette méthode est que l'épaisseur du film d' AgCl est difficile à maîtriser. D'autre part, la formation de l' AgCl est également possible par traitement du film d'argent par un plasma de dichlore Cl_2 [56] [57]. Le désavantage de cette méthode est qu'elle conduit plutôt à la formation de couches minces d' AgCl de l'ordre de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur. Enfin, la dernière possibilité, celle que nous avons retenue, est de recourir aux techniques électrolytiques.

Nous avons ainsi réalisé l'oxydation de l'argent en chlorure d'argent par voltammétrie linéaire lente (LSV) dans une solution de chlorure de potassium KCl à 1 M. Le potentiel appliqué varie de 0,1 à 0,25 V vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Sat. KCl}$ à une vitesse de 1 mV/s (Figure 85). Durant cette opération, les atomes d'argent sont oxydés pour former des ions Ag^+ . Ces derniers réagissent avec les ions chlorures Cl^- issus de la dissociation du KCl dans l'eau et la couche d' AgCl est créée à la surface de l'électrode avec une épaisseur d'environ 4 μm .

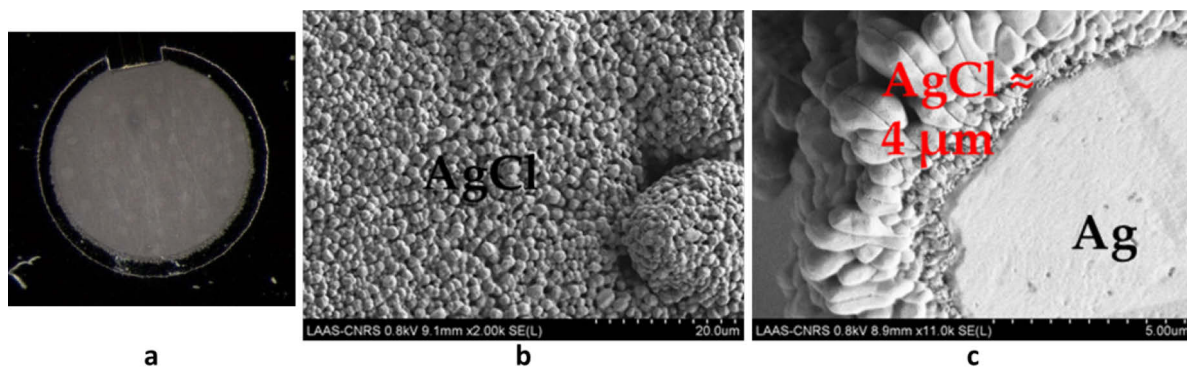


Figure 84 : Images à la loupe binoculaire (a) et au MEB (b) et (c) de l'électrode en chlorure d'argent obtenue après la voltammétrie linéaire.

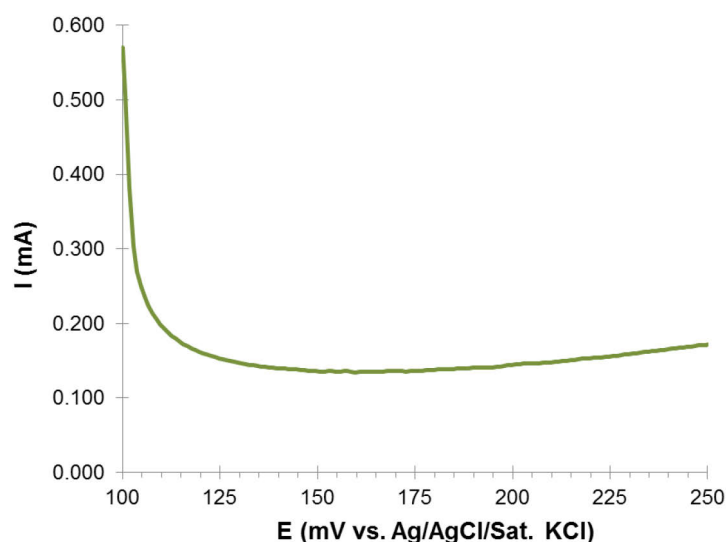


Figure 85 : Variation du courant en fonction du potentiel caractérisant l'oxydation de l'argent lors de la voltammétrie linéaire

iii. Dépôt d'une membrane polymérique dopée en KCl

La dernière étape de la fabrication de l'électrode de référence miniature est le dépôt de la membrane dopée en KCl. Elle a été réalisée en mélangeant 11 g de PDMS (Dow Corning Sylgard 184), 5 g de cristaux de KCl finement broyés ainsi qu'1 mL de solution aqueuse saturée en KCl et AgCl. La pâte ainsi obtenue est finalement déposée à la pipette sur l'électrode Ag/AgCl.

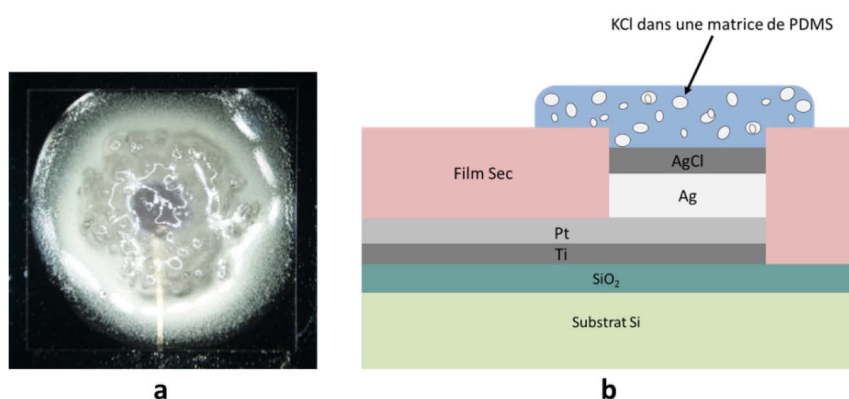


Figure 86 : (a), photo à la loupe binoculaire de l'électrode Ag/AgCl planaire recouverte de la membrane en PDMS dopée en KCl. (b), schéma de la coupe transversale de l'électrode Ag/AgCl/PDMS-KCl

c. Caractérisations *in vitro* des électrodes de référence miniatures

La caractérisation des électrodes de référence miniatures a été effectuée par la mesure du potentiel à courant nul de l'électrode par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl à double jonction commerciale (Metrohm).

Nous avons tout d'abord comparé les performances de nos pseudo-électrodes de référence Ag/AgCl (procédé de fabrication arrêté après la formation de l'AgCl) avec nos électrodes de référence Ag/AgCl/PDMS-KCl (procédé de fabrication complet). La sensibilité des deux types d'électrodes aux ions chlorures a été étudiée par ajouts successifs de solution de KCl dans de l'eau ultrapure (Figure 87). Les pseudo-électrodes Ag/AgCl répondent avec une sensibilité de 59,0 mV/pCl⁻ entre 1 mM et 1M (Figure 87a). Cette réponse parfaitement Nernstienne confirme la qualité du procédé de fabrication des couches Ag et AgCl. Le dépôt de la membrane en PDMS dopé au KCl a permis de s'affranchir complètement de la sensibilité aux ions chlorures. L'électrode exhibe un potentiel moyen de 11,1 ± 0,6 mV sans corrélation particulière avec la concentration en ions chlorures (Figure 87b).

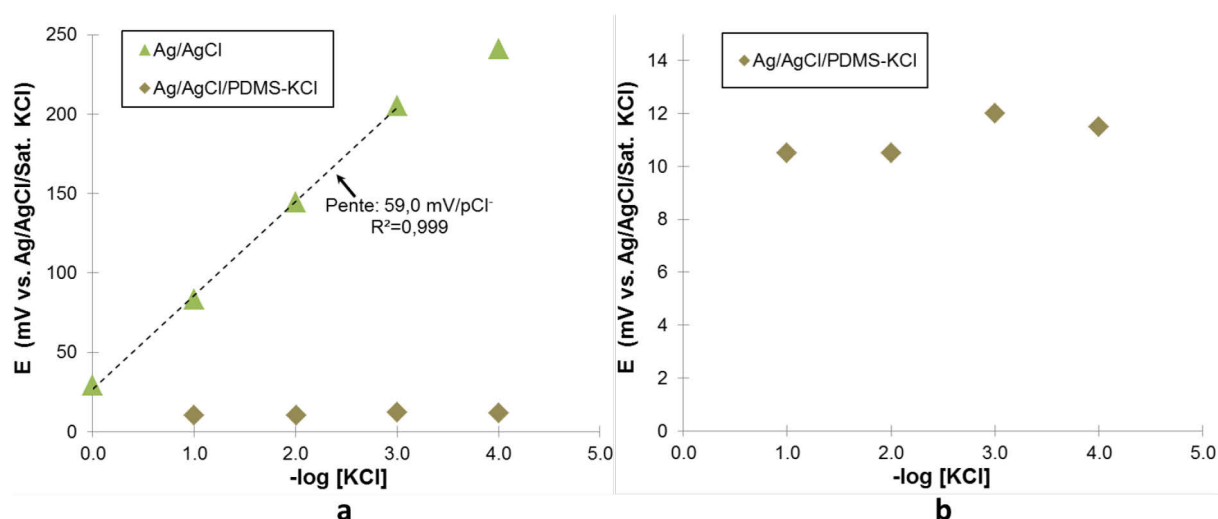


Figure 87 : (a), Courbes de sensibilité aux ions chlorures des électrodes de références miniatures Ag/AgCl avec et sans membrane de PDMS dopé au KCl. (b), zoom sur la réponse potentiométrique aux ions chlorures de l'électrode de référence miniature Ag/AgCl/PDMS-KCl

Lors de sa première utilisation en milieu aqueux, le potentiel de l'électrode Ag/AgCl/PDMS-KCl a mis environ 30 minutes avant de se stabiliser sur la valeur finale. Cette durée correspond au temps d'hydratation de la membrane en PDMS (Figure 88a). Cette valeur reste acceptable pour une application à l'analyse rapide d'échantillons de sol sur site. On peut, par exemple, envisager que l'utilisateur anticipe ses mesures et réalise l'hydratation de l'électrode pendant qu'il se déplace sur la parcelle et réalise les prélèvements.

La stabilité du potentiel des électrodes Ag/AgCl avec et sans membrane en PDMS a été évaluée dans des solutions de KCl à 0,01 M et 0,1 M pendant 8 et 24 heures, respectivement (Figure 88b). Sans membrane, le potentiel de l'électrode reste parfaitement stable pendant 4 heures puis entame une dérive linéaire de 0,9 mV/h. Une fois recouverte de la membrane, le potentiel de l'électrode devient légèrement plus bruité mais ne varie pas de manière monotone. Durant les 24 heures de mesure, son potentiel moyen était de 11,9 mV avec un écart type de 1,1 mV sans signe de dérive. De plus, après cette étude de 24 heures, l'insensibilité au chlore de l'électrode a été parfaitement conservée. Ces caractéristiques sont adaptées à la mesure avec un ISFET puisque l'imprécision de l'électrode ne représente qu'environ 2% d'erreur.

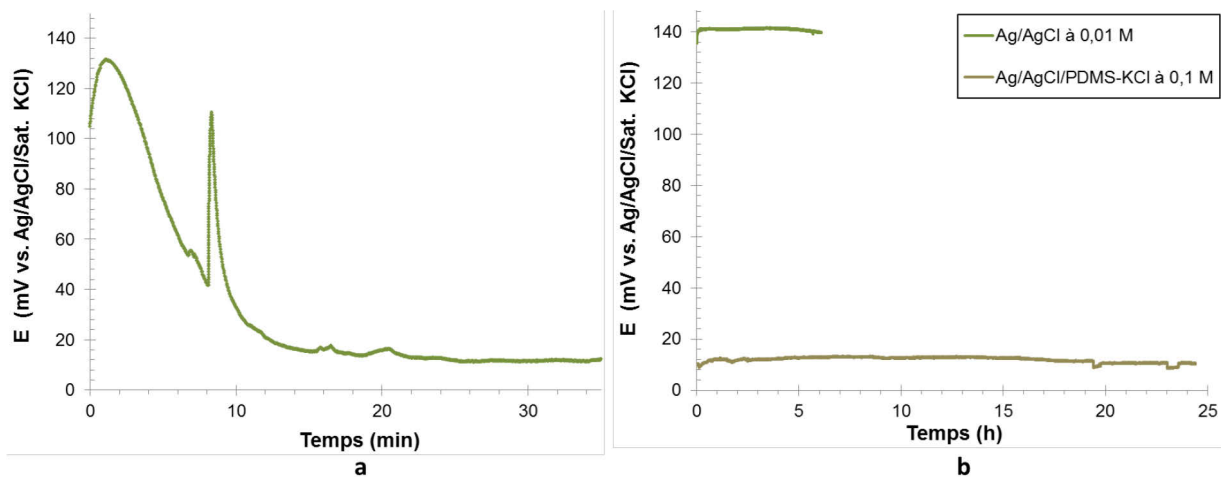


Figure 88 : (a), stabilisation du potentiel de l'électrode Ag/AgCl/PDMS-KCl lors de sa première utilisation en phase liquide (solution de KCl à 0,1 mM). (b), Courbe de dérive du potentiel de l'électrode Ag/AgCl (8h dans une solution de KCl à 0,01 M) et de l'électrode Ag/AgCl/PDMS-KCl (24h dans une solution de KCl à 0.1 M).

La sélectivité cationique de l'électrode Ag/AgCl/PDMS-KCl a été étudiée en mesurant successivement son potentiel dans des solutions à 0,1M de chlorure de potassium KCl, chlorure de calcium CaCl_2 , chlorure de sodium NaCl, chlorure d'ammonium NH_4Cl et chlorure de magnésium MgCl_2 (Figure 89). L'écart maximum du potentiel de l'électrode par rapport à la valeur dans la solution de KCl s'élève à 2,2 mV. Cette valeur a été obtenue dans la solution de MgCl_2 . On peut donc considérer que l'influence des cations est négligeable sur le potentiel des électrodes de référence miniature.

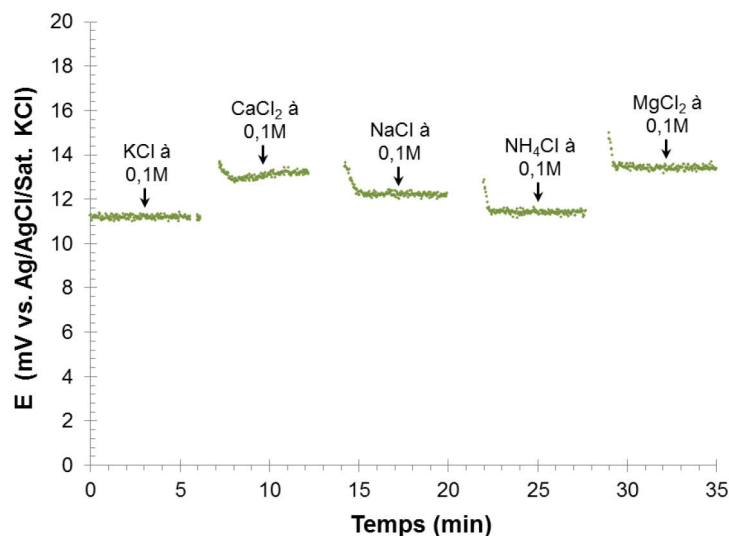


Figure 89 : Sélectivité cationique de l'électrode Ag/AgCl/PDMS-KCl

Enfin, nous avons vérifié la bonne compatibilité des électrodes Ag/AgCl, avec et sans membrane en PDMS, en vue de la mesure avec un ISFET. Pour ce faire, la réponse d'un pNH_4 -ISFET aux ajouts de solution de chlorure d'ammonium NH_4Cl a été enregistrée avec l'ISFETmètre en utilisant les deux types d'électrode de référence miniature (Figure 90). Lorsque l'électrode Ag/AgCl sans membrane est utilisée, la sensibilité du pNH_4 -ISFET est de 105,5 mV/ pNH_4Cl . Cette réponse correspond à la somme des sensibilités respectives de la couche AgCl envers les ions chlorures (55 mV/pCl) et de l'ISFET envers les ions ammonium (51 mV/ pNH_4 , cf. ci-dessous). Dès lors que l'on utilise l'électrode Ag/AgCl/PDMS-KCl préalablement hydratée, la sensibilité envers les ions chlorures est supprimée et l'on retrouve une réponse quasi-nernstienne (51 mV/ pNH_4). La réponse temporelle de cette calibration est représentée à la Figure 90b. Le

potentiel est légèrement instable pour les faibles concentrations en NH_4Cl mais converge au bout de 3 à 4 minutes. En revanche, le temps de réponse et la stabilité du signal sont excellents à partir de 1 mM.

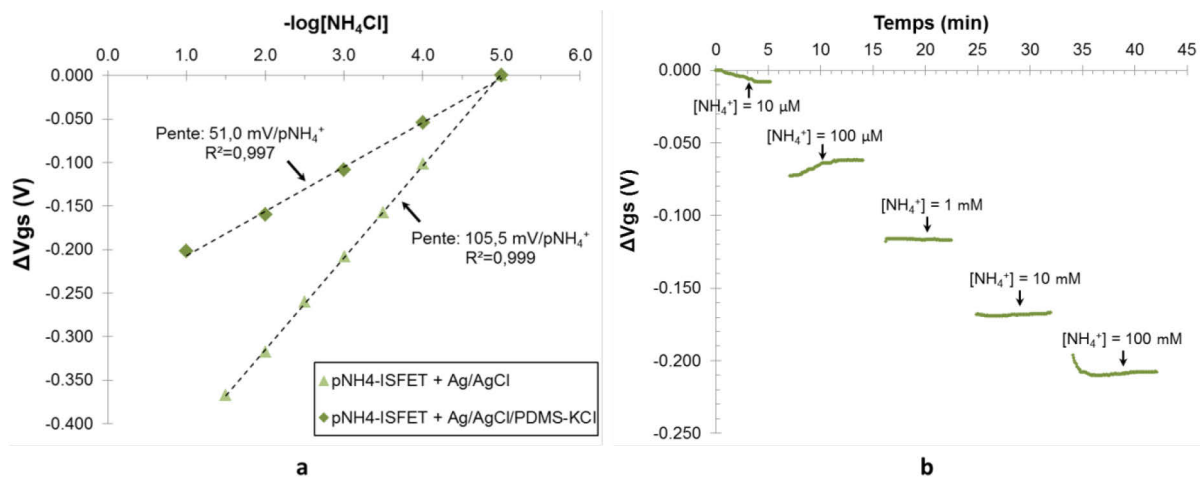


Figure 90 : (a), Courbes de calibration du $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$ réalisée en solutions aqueuses de chlorure d'ammonium NH_4Cl de concentration variable en utilisant les électrodes de références miniatures avec/sans membrane de PDMS. (b), réponse temporelle d'un $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$ et de l'électrode Ag/AgCl/PDMS-KCl à l'augmentation de concentration en NH_4Cl de la solution analysée.

En conclusion, cette électrode tout solide, simple à réaliser avec des matériaux et des techniques de fabrication à bas coût, serait donc un bon candidat pour de la mesure ponctuelle sur site avec des capteurs électrochimiques. L'excellente accroche du PDMS sur le film sec lui offre une bonne résistance mécanique qui facilitera les mesures sur le terrain. Contrairement aux électrodes de référence Ag/AgCl conventionnelles, l'électrode miniature peut être stockée simplement à l'air sans besoin de maintenance. Sa durée de vie sur étagère est alors au minimum de 6 mois. Sa stabilité d'au moins 24 heures devrait permettre de réaliser l'analyse séquentielle de nombreux prélèvements de sol en s'affranchissant des erreurs de mesures causées par des variations de concentration en ions chlorures.

Une piste d'amélioration serait de réduire et mieux contrôler la taille des cristaux de KCl qui composent la membrane en PDMS. Une pâte PDMS- KCl-AgCl de structure plus homogène faciliterait son intégration sur des électrodes Ag/AgCl de petites dimensions et devrait notamment améliorer la reproductibilité du dépôt par dispense ou sérigraphie. *In fine*, cela devrait également engendrer une amélioration de la reproductibilité du potentiel des électrodes de référence miniatures. Le développement d'émulsions de PDMS stabilisées par des tensioactifs pourrait être un moyen d'atteindre cet objectif.

Conclusion

Une puce multi-capteur en silicium a été conçue, fabriquée et assemblée avec succès. Les propriétés de détections des pH-ISFET à grille alumine Al_2O_3 et nitrure de silicium Si_3N_4 ont été caractérisées de manière *in vitro*. Les résultats ont montré que le nitrure de silicium est le matériau, pour le moment, le plus adapté pour la mesure à long terme. Il a donc été sélectionné pour la suite du projet. Des membranes ionosensibles ont alors été développées, optimisées et intégrées sur les pH-ISFET pour la détection des ions nitrates et ammonium. Les caractérisations *in vitro* des $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$ et $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$ ont démontré la bonne adéquation des propriétés de détection de ces microcapteurs avec les contraintes de mesures imposées par l'analyse des sols cultivés. Enfin, une électrode de référence miniature tout solide a été proposée en vue de

l'intégration sur la puce multi-capteur. Elle ne se substituera pas à l'utilisation d'une électrode de référence de taille « macroscopique » pour le suivi à long terme, mais ses caractéristiques sont adaptées à l'analyse ponctuelle de plusieurs heures sur site.

Dans le prochain chapitre, nous verrons comment se comporte nos dispositifs dans des conditions qui se rapprochent des conditions *in situ*. Nous verrons également comment nous avons intégré ces dispositifs dans un système autonome et communicant dédié.

Bibliographie

- [1] F. Reverter and J. Altet, "MOSFET temperature sensors for on-chip thermal testing," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 203, no. Supplement C, pp. 234–240, Dec. 2013.
- [2] R. K. M. Hay and G. T. Wilson, "Leaf appearance and extension in field-grown winter wheat plants: the importance of soil temperature during vegetative growth," *J. Agric. Sci.*, vol. 99, no. 2, pp. 403–410, Oct. 1982.
- [3] E. van Bochove, S. Beauchemin, and G. Thériault, "Continuous Multiple Measurement of Soil Redox Potential Using Platinum Microelectrodes," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 66, no. 6, pp. 1813–1820, Nov. 2002.
- [4] W. Sant, "Développement des micro-capteurs chimiques CHEMFETs pour des applications à l'hémodialyse," phdthesis, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2004.
- [5] A. Cazalé, "Développement de microcapteurs chimiques intégrés pour la détection de l'ion sodium en phase liquide : application au suivi du stress physiologique," Université Toulouse 3 - Paul Sabatier, Toulouse, 2012.
- [6] M. Singh, H. M. Haverinen, P. Dhagat, and G. E. Jabbour, "Inkjet printing-process and its applications," *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla*, vol. 22, no. 6, pp. 673–685, Feb. 2010.
- [7] A. K. Diallo, L. Djeghlaf, L. Mazenq, J. Launay, W. Sant, and P. Temple-Boyer, "Development of pH-based ElecFET biosensors for lactate ion detection," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 40, no. 1, pp. 291–296, Feb. 2013.
- [8] A. Lale, "Développement de transistors à effet de champ à base de nanofils de silicium pour la détection en phase liquide," Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2017.
- [9] K. Terada, K. Nishiyama, and K.-I. Hatanaka, "Comparison of MOSFET-threshold-voltage extraction methods," *Solid-State Electron.*, vol. 45, no. 1, pp. 35–40, Jan. 2001.
- [10] I. Humenyuk, "Développement des microcapteurs chimiques CHEMFETs pour l'analyse de l'eau," phdthesis, INSA de Toulouse, 2005.
- [11] F. J. Cabrera Corral, S. Bonachela Castaño, M. D. Fernández Fernández, M. R. Granados García, and J. C. López Hernández, "Lysimetry methods for monitoring soil solution electrical conductivity and nutrient concentration in greenhouse tomato crops," *Agric. Water Manag.*, vol. 178, no. Supplement C, pp. 171–179, Dec. 2016.
- [12] M. T. Lao, S. Jiménez, E. Eymar, and E. J. Fernández, "Nutrient levels of the soil solution obtained by means of suction cups in intensive tomato cultivation: (with 5 tables & 1 figure)," *Phyton B. Aires*, vol. 73, pp. 29–37, Dec. 2004.
- [13] A. Jurišić, Ž. Zgorelec, I. Šestak, M. Mesić, and V. Mikoč, "Nitrate-Nitrogen Content in Soil and Lysimeter Water under Different Nitrogen Fertilization Levels in Crop Production," *Agric. Conspec. Sci.*, vol. 79, no. 1, pp. 45–50, Sep. 2014.
- [14] T. K. Hartz, R. F. Smith, M. LeStrange, and K. F. Schulbach, "On-farm monitoring of soil and crop nitrogen status by nitrate-selective electrode," *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, vol. 24, no. 19–20, pp. 2607–2615, Dec. 1993.
- [15] K. L. Tully and R. Weil, "Ion-Selective Electrode Offers Accurate, Inexpensive Method for Analyzing Soil Solution Nitrate in Remote Regions," *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, vol. 45, no. 14, pp. 1974–1980, Aug. 2014.
- [16] C. Kabala, A. Karczewska, B. Gałka, M. Cuske, and J. Sowiński, "Seasonal dynamics of nitrate and ammonium ion concentrations in soil solutions collected using MacroRhizon suction cups," *Environ. Monit. Assess.*, vol. 189, no. 7, 2017.
- [17] J. Yanai, D. Robinson, I. M. Young, K. Kyuma, and T. Kosaki, "Effects of the chemical form of inorganic nitrogen fertilizers on the dynamics of the soil solution composition and on nutrient uptake by wheat," *Plant Soil*, vol. 202, no. 2, pp. 263–270, May 1998.
- [18] R. Poss, A. D. Noble, F. X. Dunin, and W. Reyenga, "Evaluation of ceramic cup samplers to measure nitrate leaching in the field," *Eur. J. Soil Sci.*, vol. 46, no. 4, pp. 667–674, 1995.
- [19] D. R. Kaiser, D. J. Reinert, J. M. Reichert, C. A. Streck, and A. Pellegrini, "Nitrate and ammonium in soil solution in tobacco management systems," *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, vol. 34, no. 2, pp. 379–388, Apr. 2010.

- [20] L. Gu *et al.*, "Nitrate leaching of winter wheat grown in lysimeters as affected by fertilizers and irrigation on the North China Plain," *J. Integr. Agric.*, vol. 14, no. 2, pp. 374–388, Feb. 2015.
- [21] A. Cazalé, W. Sant, J. Launay, F. Ginot, and P. Temple-Boyer, "Study of field effect transistors for the sodium ion detection using fluoropolysiloxane-based sensitive layers," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 177, pp. 515–521, Feb. 2013.
- [22] R. P. Buck and E. Lindner, "Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (IUPAC Recommendations 1994)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 66, no. 12, pp. 2527–2536, 1994.
- [23] M. S. Ghauri and J. D. R. Thomas, "Poly(vinyl chloride) type ammonium ion-selective electrodes based on nonactin: solvent mediator effects," *Anal. Proc. Anal. Commun.*, vol. 31, no. 6, pp. 181–183, Jan. 1994.
- [24] E. Karakuş, Ş. Pekyardımcı, and E. Kılıç, "A New Potentiometric Ammonium Electrode for Biosensor Construction," *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.*, vol. 34, no. 5, pp. 523–534, Jan. 2006.
- [25] M. Novell, M. Parrilla, G. A. Crespo, F. X. Rius, and F. J. Andrade, "Paper-Based Ion-Selective Potentiometric Sensors," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 11, pp. 4695–4702, Jun. 2012.
- [26] W. Wróblewski, M. Chudy, A. Dybko, and Z. Brzózka, "NH₄⁺-sensitive chemically modified field effect transistors based on siloxane membranes for flow-cell applications," *Anal. Chim. Acta*, vol. 401, no. 1–2, pp. 105–110, Nov. 1999.
- [27] Y. Zhang and P. S. Cremer, "Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 10, no. 6, pp. 658–663, Dec. 2006.
- [28] G. Högg, O. Lutze, and K. Cammann, "Novel membrane material for ion-selective field-effect transistors with extended lifetime and improved selectivity," *Anal. Chim. Acta*, vol. 335, no. 1–2, pp. 103–109, 1996.
- [29] M. Knoll, K. Cammann, C. Dumschat, C. Sundermeier, and J. Eshold, "Potentiometric silicon microsensor for nitrate and ammonium," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 18, no. 1, pp. 51–55, Mar. 1994.
- [30] S. Wakida, T. Oizaki, M. Yamane, and K. Higashi, "A preliminary application of highly sensitive nitrate ISFETs to acid-rain monitoring," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 24, no. 1, pp. 222–224, Mar. 1995.
- [31] B. Paczosa-Bator, L. Cabaj, M. Raś, B. Baś, and R. Piech, "Potentiometric sensor platform based on a carbon black modified electrodes," *Int J Electrochem Sci*, vol. 9, pp. 2816–2823, 2014.
- [32] A. S. Watts, V. G. Gavalas, A. Cammers, P. S. Andrada, M. Alajarín, and L. G. Bachas, "Nitrate-selective electrode based on a cyclic bis-thiourea ionophore," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 121, no. 1, pp. 200–207, Jan. 2007.
- [33] Linan Zhang, M. Zhang, H. Ren, P. Pu, P. Kong, and H. Zhao, "Comparative investigation on soil nitrate-nitrogen and available potassium measurement capability by using solid-state and PVC ISE," *Comput. Electron. Agric.*, vol. 112, pp. 83–91, Mar. 2015.
- [34] T. Masadome *et al.*, "Microfluidic polymer chip with an embedded ion-selective electrode detector for nitrate-ion assay in environmental samples," *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.*, vol. 26, no. 4, pp. 417–423, 2010.
- [35] W. Wróblewski, M. Chudy, and A. Dybko, "Nitrate-selective chemically modified field effect transistors for flow-cell applications," *Anal. Chim. Acta*, vol. 416, no. 1, pp. 97–104, Jul. 2000.
- [36] M. W. Shinwari, D. Zhitomirsky, I. A. Deen, P. R. Selvaganapathy, M. J. Deen, and D. Landheer, "Microfabricated Reference Electrodes and their Biosensing Applications," *Sensors*, vol. 10, no. 3, pp. 1679–1715, Mar. 2010.
- [37] W. Vonau, W. Oelßner, U. Guth, and J. Henze, "An all-solid-state reference electrode," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 144, no. 2, pp. 368–373, Feb. 2010.
- [38] U. Guth, F. Gerlach, M. Decker, W. Oelßner, and W. Vonau, "Solid-state reference electrodes for potentiometric sensors," *J. Solid State Electrochem.*, vol. 13, no. 1, pp. 27–39, Jan. 2009.

- [39] H. Suzuki, T. Hirakawa, S. Sasaki, and I. Karube, "Micromachined liquid-junction Ag/AgCl reference electrode," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 46, no. 2, pp. 146–154, Feb. 1998.
- [40] "Miniature liquid junction reference electrode and an integrated solid state electrochemical sensor including the same."
- [41] A. Simonis, H. Lüth, J. Wang, and J. Schöning, "Strategies of Miniaturised Reference Electrodes Integrated in a Silicon Based 'one chip' pH Sensor," *Sensors*, vol. 3, no. 9, pp. 330–339, Sep. 2003.
- [42] M. Sophocleous and J. K. Atkinson, "A review of screen-printed silver/silver chloride (Ag/AgCl) reference electrodes potentially suitable for environmental potentiometric sensors," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 267, no. Supplement C, pp. 106–120, Nov. 2017.
- [43] I. R. McGill and B. McEnaney, "A novel reference electrode arrangement for high temperature polarization studies," *Corros. Sci.*, vol. 18, no. 3, pp. 257–259, 1978.
- [44] I.-Y. Huang, R.-S. Huang, and L.-H. Lo, "Improvement of integrated Ag/AgCl thin-film electrodes by KCl-gel coating for ISFET applications," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 94, no. 1, pp. 53–64, Aug. 2003.
- [45] "Fabrication of a Planar-Form Screen Printed Solid Electrolyte Modified Ag/AgCl Reference Electrode for Application in a Potentiometric Biosensor."
- [46] V. A. T. Dam, M. Goedbloed, and M. A. G. Zevenbergen, "Solid-Contact Reference Electrode for Ion-Selective Sensors," *Proceedings*, vol. 1, no. 4, p. 464, Aug. 2017.
- [47] J. C. B. Fernandes and E. V. Heinke, "Alternative strategy for manufacturing of all-solid-state reference electrodes for potentiometry," *J. Sens. Sens. Syst.*, vol. 4, no. 1, pp. 53–61, Feb. 2015.
- [48] I. Shitanda, H. Kiryu, and M. Itagaki, "Improvement in the long-term stability of screen-printed planar type solid-state Ag/AgCl reference electrode by introducing poly(dimethylsiloxane) liquid junction," *Electrochimica Acta*, vol. 58, pp. 528–531, Dec. 2011.
- [49] M. Glanc, M. Sophocleous, J. K. Atkinson, and E. Garcia-Breijo, "The effect on performance of fabrication parameter variations of thick-film screen printed silver/silver chloride potentiometric reference electrodes," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 197, pp. 1–8, Aug. 2013.
- [50] N.-H. Kwon, K.-S. Lee, M.-S. Won, and Y.-B. Shim, "An all-solid-state reference electrode based on the layer-by-layer polymer coating," *The Analyst*, vol. 132, no. 9, p. 906, 2007.
- [51] T. Y. Kim, S. A. Hong, and S. Yang, "A Solid-State Thin-Film Ag/AgCl Reference Electrode Coated with Graphene Oxide and Its Use in a pH Sensor," *Sensors*, vol. 15, no. 3, pp. 6469–6482, Mar. 2015.
- [52] T. Zhang, C.-Z. Lai, M. A. Fierke, A. Stein, and P. Bühlmann, "Advantages and Limitations of Reference Electrodes with an Ionic Liquid Junction and Three-Dimensionally Ordered Macroporous Carbon as Solid Contact," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 18, pp. 7771–7778, Sep. 2012.
- [53] R. Mamińska, A. Dybko, and W. Wróblewski, "All-solid-state miniaturised planar reference electrodes based on ionic liquids," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 115, no. 1, pp. 552–557, May 2006.
- [54] D. A. J. Rand and R. Woods, "A study of the dissolution of platinum, palladium, rhodium and gold electrodes in 1 m sulphuric acid by cyclic voltammetry," *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 35, no. 1, pp. 209–218, Mar. 1972.
- [55] B. J. Polk, A. Stelzenmuller, G. Mijares, W. MacCrehan, and M. Gaitan, "Ag/AgCl microelectrodes with improved stability for microfluidics," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 114, no. 1, pp. 239–247, Mar. 2006.
- [56] S.-I. Park, S. B. Jun, S. Park, H. C. Kim, and S. J. Kim, "Application of a new Cl-plasma-treated Ag/AgCl reference electrode to micromachined glucose sensor," *IEEE Sens. J.*, vol. 3, no. 3, pp. 267–273, Jun. 2003.
- [57] P. M. C Escoffier, "Plasma chloriding of thin-film silver - A novel process in silver-silver chloride reference electrode fabrication," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 149, no. 4, pp. H98–H102, 2002.

Chapitre 4 :

Application à l'analyse du sol

Introduction

Après avoir caractérisé les ISFET en conditions *in vitro*, nous allons à présent évaluer la capacité de cette technologie à effectuer l'analyse ionique du sol dans une configuration de mesure *in situ* qui constitue notre application finale. Les ISFET et leur électrode de référence associée ont ainsi été mis directement en contact avec le sol. Dans un premier temps, les résultats qui seront exposés ont été obtenus avec des ISFET simplement assemblés sur le circuit imprimé décrit au chapitre 3. Puis, nous présenterons les premiers résultats issus de l'intégration des microdispositifs ISFET dans un système d'analyse multi-capteur.

L'ensemble des caractérisations présentées dans ce début de chapitre a été réalisé à température ambiante sur une sélection de quatre sols ayant des propriétés différentes. Nous avons ainsi pu étudier l'influence qu'ont, entre autres, la texture, l'humidité ainsi que, bien sûr, le pH et le contenu en azote du sol sur les résultats des mesures *in situ*. Les quatre sols utilisés au cours des caractérisations ont été préalablement analysés par un laboratoire agréé. Un résumé de ces analyses est proposé dans le Tableau 20.

	Sol n°1	Sol n°2	Sol n°3	Sol n°4
Texture	Argilo-limoneux	Sableux	Argilo-limoneux	Argilo-limoneux
pH-H₂O (ISO 10390)	8,3	7,3	4,7	7,4
Matière organique (g/kg)	10,4	9,5	19	17
Capacité d'échange cationique à pH 7 (mé/kg)	89	44	78	156

Tableau 20 : Résultats des analyses de sol par le laboratoire agréé

Nous avons également mesuré la capacité au champ des sols. Cette propriété correspond à la capacité de rétention maximale en eau du sol. Elle a été déterminée en humidifiant 100 g de terre séchée à l'étuve et émietée (taille des agrégats < 2 mm) jusqu'à saturation :

$$\text{Capacité au champ (\%)} = \frac{m_{\text{terre saturée}} - m_{\text{terre sèche}}}{m_{\text{terre sèche}}} \times 100 \quad (80)$$

Les taux d'humidité relative des sols indiqués au cours de ce chapitre correspondent à la masse d'eau absorbée par le sol rapportée à la capacité au champ. Par exemple, 1 kg de sol n°1 à 50% d'humidité relative contient 210,3 mL d'eau.

	Sol n°1	Sol n°2	Sol n°3	Sol n°4
Capacité au champ (%)	42,1	27,7	46,6	NC

Tableau 21 : Capacité au champ des 4 sols utilisés pour les caractérisations *in situ* des ISFET

1. Détermination du pH du sol par les pH-ISFET en conditions *in situ*

a. Influence de l'humidité et la texture du sol sur la réponse du pH-ISFET

La technologie ISFET a été initialement conçue pour l'analyse en phase liquide. Il se pose donc la question de sa compatibilité pour la mesure *in situ* dans le sol, ce dernier n'étant pas constitué d'une unique phase liquide. L'objectif de cette première étude était d'évaluer si la réponse potentiométrique des pH-ISFET dépend de la texture du sol et de son humidité relative. Nous voulions déterminer, en fonction de la texture du sol, la valeur minimale d'humidité relative en dessous de laquelle les ISFET ne sont plus fonctionnels.

La texture d'un sol est définie comme le diamètre des particules qui le composent. On classe les particules dans trois catégories selon leur taille : les sables (de 50 μm à 2 mm), les limons (de 2 μm à 50 μm) et la fraction fine, communément appelée « argiles » (< 2 μm) [1]. En France, elle est mesurée selon la norme NF X31-107 [2]. Le « triangle des textures » est une représentation graphique de la texture des sols. Nous y avons reporté les quatre sols utilisés pour nos caractérisations (Figure 91).

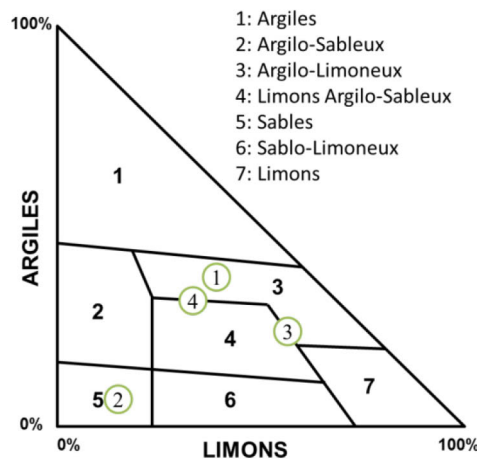


Figure 91 : Résultats de l'analyse de la texture des sols n°1, n°2, n°3 et n°4 représentés sur le « triangle des textures ».

Les sols n°1 (argilo-limoneux) et n°2 (sableux) ont été utilisés afin que l'expérience soit représentative de l'ensemble des textures de sols cultivés. Pour ces deux sols, nous avons testé 8 niveaux d'humidité relative, de 30% à 100% avec un pas de 10%. L'essai a donc été mené dans 8 pots en plastique d'une contenance de 1,5 L équipés de coupelles pour assurer l'irrigation et le maintien des pots au niveau d'humidité relative testé. Une fois le pot rempli de 1 kg de sol sec et les capteurs insérés, l'arrosage était réalisé en remplissant la coupelle de la quantité adaptée d'eau. Cet arrosage par le bas garantit une meilleure homogénéité de l'humidité du sol. Les pots étaient ensuite placés dans une enceinte maintenue à 25°C et 80% d'humidité.



Figure 92 : Les 8 capteurs « plantés » dans les pots de sol argilo-limoneux. Le cliché a été pris quelques minutes après arrosage dans la coupelle. On note l'humidité de surface qui provient de la montée de l'eau par capillarité.

Pour cette première expérience, nous n'avons pas évalué l'exactitude de la mesure mais seulement la capacité à pouvoir effectuer une mesure en fonction des conditions d'humidité et de la texture du sol. Le comportement électrique d'un capteur ISFET se caractérise par sa courbe $I_{ds}(V_{gs})$ de forme parabolique (cf. chapitre 2, partie 2c). Pour juger la capacité à pouvoir utiliser un pH-ISFET dans ces conditions, nous avons donc vérifié deux critères :

- obtention d'une caractéristique $I_{ds}(V_{gs})$ typique du comportement d'un transistor ISFET ? (oui/non),
- estimation du temps d'établissement du régime permanent du courant I_{ds} en réponse à un échelon de tension V_{gs} égal à 3V (Figure 93).

Pour ces mesures, la tension V_{ds} appliquée entre les contacts drain et source était de 2V. Nous n'avons pas utilisé de véritable électrode de référence mais simplement l'électrode de platine intégrée sur la puce. Cette électrode est située à quelques dizaines de micromètres de la zone sensible du pH-ISFET.

Humidité relative (%)	30	40	50	60	70	80	90	100
Obtention d'une courbe $I_{ds}(V_{gs})$?	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Estimation du temps de réponse (min)	≈0	20	20	≈0	≈0	10	≈0	≈0

Tableau 22 : Résultats obtenus pour le sol argilo-limoneux

Humidité relative (%)	30	40	50	60	70	80	90	100
Obtention d'une courbe $I_{ds}(V_{gs})$?	oui	oui	non	oui	oui	oui	non	oui
Estimation du temps de réponse (min)	25	20		5	8	≈0		≈0

Tableau 23 : Résultats obtenus pour le sol sableux

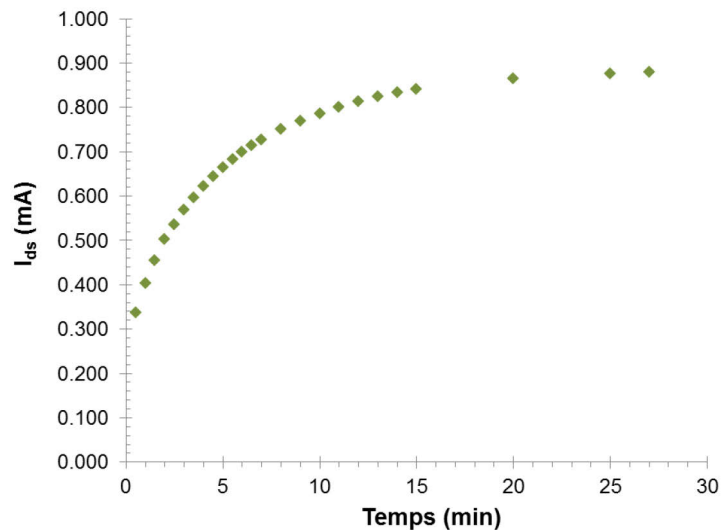


Figure 93 : Etablissement du régime permanent du courant I_{ds} en réponse à un échelon de tension V_{gs} égal à 3V dans le sol sableux à 30% d'humidité relative

Les résultats sur sol argilo-limoneux indiquent que, sur tout l'intervalle d'hygrométrie étudié, il y a bien eu une réponse $I_{ds}(V_{gs})$ correcte du capteur à l'application d'une polarisation dans la terre par l'électrode de platine (Tableau 22). 5 fois sur 8, la réponse à la polarisation était instantanément stable. Dans les autres cas, la valeur finale du courant I_{ds} était atteinte après 10 à 20 minutes de polarisation en continu. Ce régime transitoire peut s'expliquer par la qualité des contacts électriques sol/ISFET et sol/électrode ainsi que par la résistance électrique du volume de sol situé entre l'électrode de platine et la zone sensible du microcapteur. La résistivité du sol est fonction de nombreuses propriétés telles que la nature de ses constituants solides, la présence de pores remplis d'air, la teneur en eau et la concentration des espèces ioniques dissoutes dans l'eau du sol [3]. Cependant l'expérience ne montre pas que ce temps de réponse

soit réellement corrélé à la valeur d'humidité relative puisque, par exemple, le capteur a répondu instantanément à 30% d'humidité relative alors qu'il a fallu attendre 10 min à 80% pour que le signal atteigne sa valeur finale. La qualité des interfaces électrode/sol et ISFET/sol semble donc prédominer sur le temps d'établissement du régime permanent.

Dans le cas du sol sableux, il n'a pas été possible d'obtenir une courbe $I_{ds}(V_{gs})$ conforme dans les pots correspondant aux sols à 50% et 90% d'humidité relative. Dans tous les autres cas, la réponse s'établissait instantanément ou après 25 minutes d'un régime transitoire. Comme pour le sol argilo-limoneux, l'expérience ne montre pas que la capacité à répondre et le temps de réponse soient réellement corrélés à la valeur d'humidité relative.

L'ensemble de cette première étude prouve que les pH-ISFET peuvent être fonctionnels dans l'ensemble des conditions d'humidité et de texture des sols cultivés. Ils ont été capables de répondre dès 30% d'humidité relative, un niveau pourtant impropre à la culture céréalière. Le paramètre influant le plus la réponse semble être la qualité des contacts électrode de référence/sol et capteur/sol. Les particules fines caractérisant la texture argilo-limoneuse forment une pâte homogène et compacte qui colle plus facilement aux capteurs que les particules grossières d'un sol sableux. Il est donc « statistiquement » plus probable d'obtenir une bonne mise en contact dans un sol argilo-limoneux. Ces résultats mettent en avant la nécessité d'établir un protocole de mise en place des capteurs dans le sol assurant une réponse conforme dans 100% des cas.

Les résultats de cette étude sur les pH-ISFET peuvent très probablement être étendus aux ISFET fonctionnalisés dont le principe de fonctionnement est identique. En revanche, le protocole de « mise en terre » à développer doit être compatible avec les pNH_4 -ISFET et les pNO_3 -ISFET qui sont beaucoup plus fragiles du fait de la présence de la membrane ionosensible. Celle-ci pourrait facilement être rayée voire arrachée en cas de frottements avec des particules, de sable notamment.

b. Détermination du pH de sols argilo-limoneux en fonction de l'humidité du sol

Pour cette seconde étude, nous avons comparé la valeur de pH mesuré par un pH-ISFET simplement inséré dans un pot de sol avec le résultat donné par la méthode standard de détermination du pH d'un prélèvement de sol. Cette méthode est définie dans la norme ISO 10390. Brièvement, elle consiste à mesurer, à l'aide d'une électrode pH en verre, le pH d'une suspension homogène de sol réalisée par dilution au cinquième (fraction volumique) dans de l'eau (H_2O), du chlorure de potassium KCl à 1 mol/L ou dans du chlorure de calcium $CaCl_2$ à 0,01 mol/L [4]. Il existe donc 3 pH du sol selon la solution utilisée: le pH- H_2O , le pH-KCl et le pH- $CaCl_2$. L'utilisation d'une solution saline provoque l'échange cationique entre les ions H_3O^+ fixés sur le complexe argilo-humique du sol et les cations de la solution. Le pH mesuré est alors un peu plus faible et reflète davantage l'acidité dite « potentielle » du sol [5]. Nous avons uniquement comparé nos résultats au pH- H_2O qui correspond à la contribution des ions H_3O^+ libres présents dans la solution du sol.

Afin de se confronter à la fois à un sol basique et à un sol acide, l'expérience a été menée sur les sols n°1 (pH = 8,4) et n°3 (pH = 4,7), tous deux de texture argilo-limoneuse. Pour ces deux sols, nous avons testé 4 niveaux d'humidité relative : 40%, 60%, 80% et 100%. L'ISFETmètre était utilisé conjointement avec une électrode de référence au calomel saturée en KCl (ECS, modèle XR110 de Radiometer Analytical) pour polariser et enregistrer le signal des pH-ISFET.

Avant chaque mesure, les pH-ISFET étaient étalonnés dans 3 solutions tamponnées de pH 4, 7 et 10. Les pH-ISFET et l'électrode de référence étaient ensuite simplement insérés dans le sol. En cas de réponse incohérente causée par un problème de contact avec le sol, l'ISFET était ressorti et à nouveau implanté.

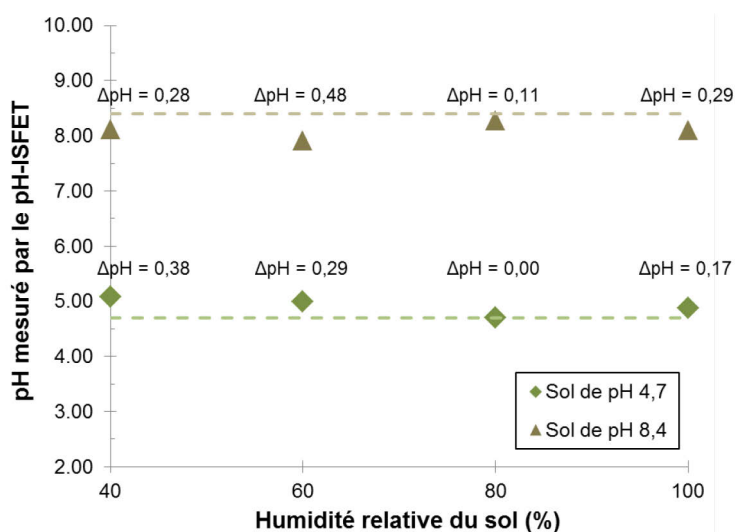


Figure 94 : Comparaison des valeurs de pH mesurées à différents niveaux d'humidité relative dans un sol acide et un sol basique. L'erreur de mesure par rapport à la méthode standard (lignes en pointillé) est indiquée au-dessus de chaque point de mesure

Les résultats enregistrés pour les deux types de sol, présentés à la Figure 94, sont en très bon accord avec la méthode standard. En effet, l'erreur maximale obtenue sur l'ensemble des mesures est inférieure à 0,5 unité pH. Une telle erreur reste tout à fait acceptable dans le cas de l'agriculture. De plus, le pH du sol a été mesuré avec une bonne précision à 40% d'humidité relative, une valeur à la limite des conditions d'humidité requise pour une bonne croissance du blé. En outre, l'humidité relative du sol ne semble pas avoir d'influence significative sur la valeur du pH mesuré par les pH-ISFET.

Au final, cette expérience souligne le bon potentiel de la technologie pH-ISFET pour la détermination du pH d'un sol de manière *in situ*. Par rapport à la méthode standard qui requiert une analyse chronophage d'un extrait de sol, le pH-ISFET offre la possibilité d'un résultat quasi-immédiat sur site avec une précision suffisante pour le cadre de l'agriculture.

c. Remarques sur les mesures dans les suspensions et extraits de sol

Lors d'une étude préliminaire portant sur la détermination du pH du sol par les pH-ISFET, nous avons comparé deux protocoles de mesure. Dans le premier cas, le pH du sol n°1 (pH = 8,4) était déterminé en suivant la méthode *in situ* précédemment décrite, c'est-à-dire en mettant l'ISFET et l'électrode de référence ECS directement en contact avec le sol. Dans le second cas, nous suivions le protocole recommandé par la méthode standard (norme ISO 10390), en remplaçant l'électrode pH conventionnelle en verre par le pH-ISFET. L'ISFET et l'électrode ECS étaient donc directement plongés dans une suspension homogène de sol. La comparaison des résultats des deux méthodes a mis en avant un phénomène que, dans un premier temps, nous ne comprenions pas : l'erreur de mesure était presque quatre fois plus forte lorsque la mesure était réalisée dans la suspension de sol, bien qu'il s'agisse de la méthode recommandée (Tableau 24). Dans les deux cas, le pH-ISFET était étalonné avant chaque mesure dans 3 solutions tamponnées de pH 4, 7 et 10.

L'augmentation de l'erreur ne pouvait pas s'expliquer par la désorption d'ions interférents qui auraient eu, au contraire, pour effet de diminuer le pH apparent. De plus, nous avons également observé ce phénomène en utilisant les pH-ISFET à grille en alumine qui possèdent pourtant des propriétés de sélectivité supérieures (cf. chapitre 3, partie 2bii).

	pH par contact direct avec le sol	pH dans la suspension de sol	Erreur de mesure par contact direct avec le sol	Erreur de mesure dans la suspension de sol
Mesure 1	8,40	9,34	0	0,94
Mesure 2	7,98	9,35	-0,42	0,95
Mesure 3	8,04	9,26	-0,36	0,86
Mesure 4	8,06	9,32	-0,34	0,92
Mesure 5	8,45	9,87	0,05	1,47
Mesure 6	7,97	8,97	-0,43	0,57
Moyenne	8,15	9,35	-0,25	0,95
Ecart type	0,20	0,27		

Tableau 24 : Résultats de la détermination du pH du sol n°1 en utilisant les pH-ISFET selon deux méthodes différentes

Une seconde expérience menée plus tard sur le sol n°4 (pH = 7,4) nous a permis d'identifier l'origine de l'erreur. En plus des deux méthodes précédemment décrites, nous avons utilisé un pH-ISFET et une électrode ECS pour mesurer le pH de la solution du sol extraite à l'aide d'un lysimètre (modèle Rhizon SMS 19.21.05F, commercialisé par Rhizosphere Research Products B.V, Figure 95a). Le principe du lysimètre est la récupération de la solution du sol par succion en exerçant une dépression dans un tube relié à un polymère microporeux (taille moyenne des pores = 0,15 µm) préalablement introduit dans le sol (Figure 95b). Les résultats de cette seconde expérience sont présentés dans le Tableau 25.

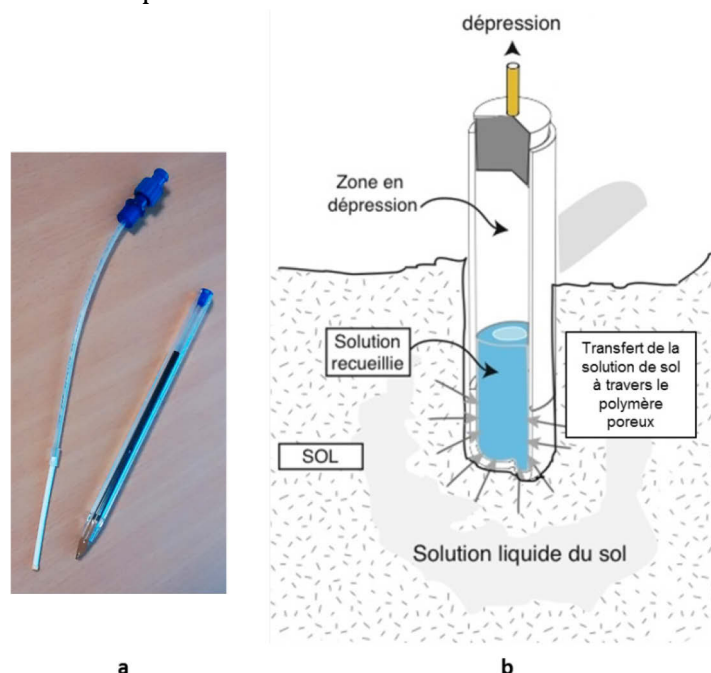


Figure 95 : (a), photo du modèle de lysimètre Rhizon SMS. (b), principe de fonctionnement du lysimètre. Adapté de [6]

	pH dans la suspension de sol	pH par contact direct avec le sol	pH dans la solution du sol extraite via le lysimètre
Mesure	8,91	7,43	7,65
Erreur de mesure	1,51	0,03	0,25

Tableau 25 : Résultats de la détermination du pH du sol n°4 en utilisant les pH-ISFET selon trois méthodes différentes

Une fois de plus, l'erreur est très forte lorsque la mesure est effectuée directement dans la suspension de sol alors qu'elle est quasi-nulle par la méthode du contact direct. En revanche, la mesure dans la solution de sol extraite par lysimètre a donné une erreur acceptable de 0,25 unité pH. Cette méthode s'apparente pourtant à celle de la suspension de sol. La différence essentielle entre les deux solutions aqueuses est que la première contient des particules de sol qui ont été filtrées dans le cas de la seconde.

Ces particules de sols en suspension sont à l'origine du phénomène observé, qu'on trouve sous le nom « d'effet de suspension » dans la littérature scientifique [7]. Différentes théories, parfois controversées, ont été élaborées pour expliquer l'effet de suspension et un consensus a finalement été proposé par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) en 2007 [8]. En résumé, l'erreur de mesure est provoquée par deux phénomènes physiques impliquant les particules de sol chargées en suspension :

1. Changement du potentiel de jonction au niveau de l'électrode de référence (ECS) :

La diffusion des ions potassium K^+ et chlorures Cl^- au niveau de la jonction de l'électrode n'entraîne normalement pas de séparation des charges car ces deux ions possèdent une mobilité ionique pratiquement égale (cf. chapitre 2, partie 2a). Le potentiel de jonction est donc négligeable. Lorsque l'électrode est plongée dans une suspension de sol, les ions K^+ sont échangés avec les protons H_3O^+ adsorbés sur les particules. Ce mécanisme affecte l'électroneutralité du transport ionique et le potentiel de jonction devient non nul.

2. Changement du potentiel au niveau de l'ISFET :

La membrane ionosensible de l'ISFET est en contact intime avec les particules chargées. Il en résulte un chevauchement de leur double-couche respective (chapitre 2, partie 2c). Le potentiel au niveau de l'ISFET n'est finalement pas le même qu'en l'absence d'interaction avec les particules.

En conclusion, la valeur « vraie » du pH est obtenue en l'absence d'interaction avec les particules du sol. Cette condition est respectée lorsque la mesure est faite dans la solution de sol filtrée par le lysimètre. Dans le cas de la méthode standard, une valeur correcte du pH est obtenue en plaçant l'ISFET et l'électrode de référence dans le surnageant, après sédimentation des particules. Or nos expériences ont été réalisées avant la sédimentation ce qui explique les erreurs observées. Le plus important est que l'effet de suspension n'apparaît pas quand on place l'électrode de référence et l'ISFET en contact direct avec le sol. La méthode *in situ* donne donc des résultats valides qui, en pratique, faciliteront la mise en place de mesures sur site. Nous pouvons à présent envisager le suivi *in situ* et à long terme du pH du sol. Cette problématique sera traitée dans la prochaine partie.

d. Etude de la durée de vie dans le sol des pH-ISFET

Nous souhaitons réaliser un suivi *in situ* du sol durant une période s'étalant approximativement de décembre à mai-juin de l'année suivante. Les pH-ISFET doivent alors disposer d'une durée de vie et d'une stabilité du signal compatibles avec la mesure dans le sol pendant six mois. Nous avons donc analysé l'évolution temporelle du signal de deux ISFET insérés pendant une durée de six mois dans un pot de sol argilo-limoneux (sol n°3). Pendant toute cette durée, l'humidité relative du sol (75%) était maintenue constante. L'évaporation de l'eau était détectée par une pesée quotidienne du pot et immédiatement compensée par un apport d'eau au niveau de la soucoupe. Les variations de tension de seuil des deux ISFET ont été

enregistrées grâce à des mesures effectuées périodiquement avec l'ISFETmètre et une électrode de référence ECS (Figure 96). De plus, nous avons comparé les courbes d'étalonnage réalisées avant et après l'expérience pour identifier si le sol provoque une dégradation des propriétés de détection du pH-ISFET (Figure 97).

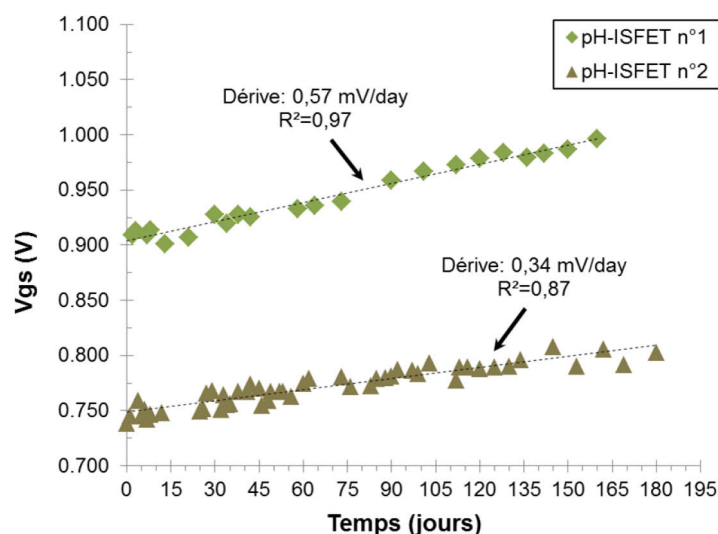


Figure 96 : Evolution temporelle sur six mois du signal de deux pH-ISFET en sol argilo-limoneux. Les mesures ont été effectuées périodiquement par rapport à une électrode de référence au calomel saturée en KCl.

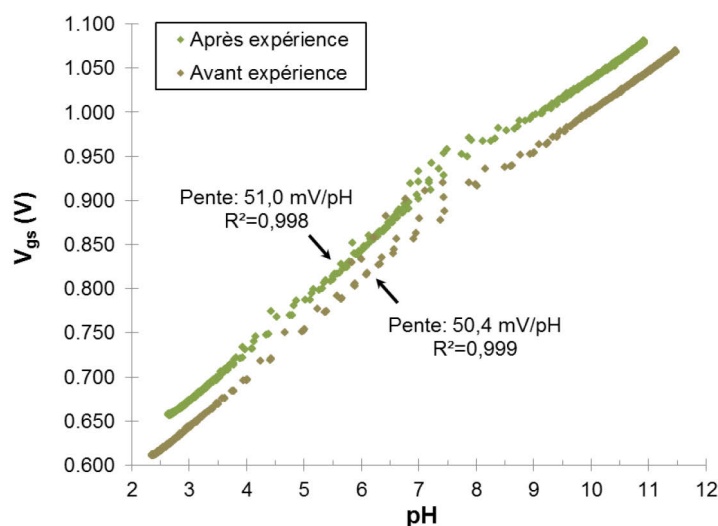


Figure 97 : Courbes de calibration du pH-ISFET n°2 avant et après l'expérience de six mois dans le sol

La dérive temporelle présentée par les deux microcapteurs est relativement faible (< 0.6 mV/jour) et bien linéaire ($R^2 \geq 0.87$), ce qui permet d'envisager une correction du signal. La comparaison des courbes d'étalonnage avant/après expérience montre que la sensibilité du pH-ISFET n°2 est restée identique. Le microcapteur ne semble donc pas avoir été affecté par cette mesure à long terme en condition *in situ*. De plus, l'écart de tension entre les deux courbes de calibration (≈ 35 mV) est inférieur à la chute totale du potentiel au cours des six mois de dérive (≈ 50 mV). Il est donc probable que la dérive temporelle du signal du pH-ISFET soit en partie causée par une variation locale du pH du sol au cours du temps et non pas intégralement due au vieillissement du capteur provoqué par son environnement de mesure.

Cette étude prouve que l'encapsulation (ou packaging) relativement sommaire de nos pH-ISFET, une simple encapsulation de la puce par un glob-top en silicone, offre une protection suffisante pour se confronter à l'analyse du sol à long terme. Une conclusion similaire peut être

tirée concernant l'efficacité du nitrure de silicium Si_3N_4 déposé par LPCVD en tant que barrière de diffusion. Au cours de l'expérience, l'ISFET était polarisé ponctuellement durant 5 à 15 minutes avant de relever la valeur du signal. Or, la dérive du signal de l'ISFET dans son milieu est corrélée à la durée totale de polarisation. Ce point n'a malheureusement pas été précisément investigué. En conclusion, la durée de vie et la stabilité du signal des pH-ISFET-pH en conditions *in situ* sont adaptés au suivi du pH du sol pendant toutes les phases de croissance du blé.

L'ensemble des résultats présentés au cours de cette première partie valide le concept d'une mesure *in situ* à l'aide des microcapteurs ISFET simplement insérés dans le sol. Cette méthode a permis de mesurer le pH de trois sols différents avec une précision satisfaisante. La technologie pH-ISFET est adaptée au suivi des parcelles à court ou long terme et offre ainsi un gain de temps considérable par rapport à la technique conventionnelle d'analyse de prélèvements par des laboratoires externes. Dans la seconde partie de ce chapitre, nous considérerons cette fois le cas de l'utilisation des pNH_4 -ISFET et des pNO_3 -ISFET pour l'analyse *in situ* du sol.

2. Evaluation de la réponse des pNO_3 -ISFET et pNH_4 -ISFET en conditions *in situ*

a. Analyse *in situ* du sol par les pNH_4 -ISFET

Une première expérience a été mise en place dans le but de vérifier qu'il est possible de distinguer la teneur en ions ammonium de deux sols à l'aide d'un pNH_4 -ISFET utilisé en configuration *in situ*. Deux pots ont été remplis avec le sol n°3. Pendant une période d'un mois, ces pots ont été placés dans des conditions de température différentes : l'un (pot n°1) a été mis dans une étuve à 38°C tandis que l'autre (pot n°2) était exposé à une température de 4°C dans un réfrigérateur. L'humidité relative du sol était maintenue à 75% tout au long de cette période. L'objectif était d'obtenir une concentration significativement différente en azote minéral en stimulant, pour le pot n°1, les processus de minéralisation de l'azote organique du sol, et en les inhibant, dans le cas du pot n°2. L'activité des micro-organismes du sol est, en effet, fonction de la température du sol (cf. chapitre1, partie 2bi).

Chaque pot était équipé d'un lysimètre (modèle Rhizon SMS 19.21.05F) permettant d'extraire la solution liquide du sol. La composition ionique des échantillons prélevés a ensuite été analysée par la technique de chromatographie ionique à l'aide des appareils Dionex ICS-5000+ (anions) et DX-120 (cations). Ces analyses ont confirmé la tendance à l'augmentation de la production d'azote minéral par les micro-organismes pour le pot n°1 à 38°C (Tableau 26). Au bout d'un mois, la concentration du pot n°1 est 4 fois supérieure à celle du pot n°2.

Pot	Age	Ammonium (mM)	Nitrate (mM)	Potassium (mM)	Chlorure (mM)
n°1 (38°C)	1 jour	0,279	0,310	0,126	0,876
n°1 (38°C)	30 jours	0,720	0,433	0,354	1,215
n°2 (4°C)	1 jour	0,122	0,421	0,036	0,399
n°2 (4°C)	30 jours	0,180	0,521	0,029	0,595

Tableau 26 : concentrations des extraits de sol exprimées en mM

Un pNH_4 -ISFET a ensuite subi la séquence de tests suivante :

1. de $t = 0$ à $t = 11$ min, solution étalon de NH_4NO_3 à 0,1 mM,
2. de $t = 13$ à $t = 21$ min, solution étalon de NH_4NO_3 à 1 mM,
3. de $t = 31$ à $t = 33$ min, pot n°1, riche en ammonium,

4. de $t = 40$ à $t = 47$ min, pot n°2, pauvre en ammonium,
5. de $t = 51$ à $t = 58$ min, à nouveau pot n°1, riche en ammonium,
6. de $t = 74$ à $t = 80$ min, à nouveau pot n°2, pauvre en ammonium,
7. de $t = 84$ à $t = 90$ min, solution étalon de NH_4NO_3 à 0,1 mM,
8. de $t = 91$ à $t = 99$ min, solution étalon de NH_4NO_3 à 1 mM,

La réponse du microcapteur a été enregistrée tout au long de cette séquence à l'aide de l'ISFETmètre et d'une électrode ECS. Elle est représentée en fonction du temps sur la Figure 98. Les solutions étalons contenaient du nitrate d'ammonium NH_4NO_3 en concentration variable ainsi qu'une concentration fixe d'acétate de lithium CH_3COOLi de 0,1 M. Le pNH_4 -ISFET était inséré directement dans le sol. Une légère pression était exercée sur le sol, au niveau du PCB, pour assurer un contact sol-capteur adéquat. Le capteur était rincé avec de l'eau déionisée à la fin de chaque étape de test ou d'étalonnage.

L'étalonnage initial du capteur (étape 1 et 2) valide le fonctionnement du pNH_4 -ISFET. Comme prévu, sa tension de seuil varie d'un peu plus de 50 mV pour une augmentation de la concentration en ions ammonium d'un facteur 10. Puis, le passage successif du pot n°1 au pot n°2 montre distinctement, et à deux reprises, un écart de potentiel de plusieurs dizaines de mV (étape 3, 4, 5 et 6). On note une dérive du signal qui est attribuable au temps d'établissement du régime permanent du fait des impédances de contact sol-capteur et sol-électrode (cf. chapitre 4, partie 1a). Enfin, le pNH_4 -ISFET a été à nouveau étalonné à la fin de l'expérience pour s'assurer qu'il est toujours sensible et donc que les variations de réponse proviennent bien des écarts de concentrations ioniques entre les deux sols (étape 7 et 8).

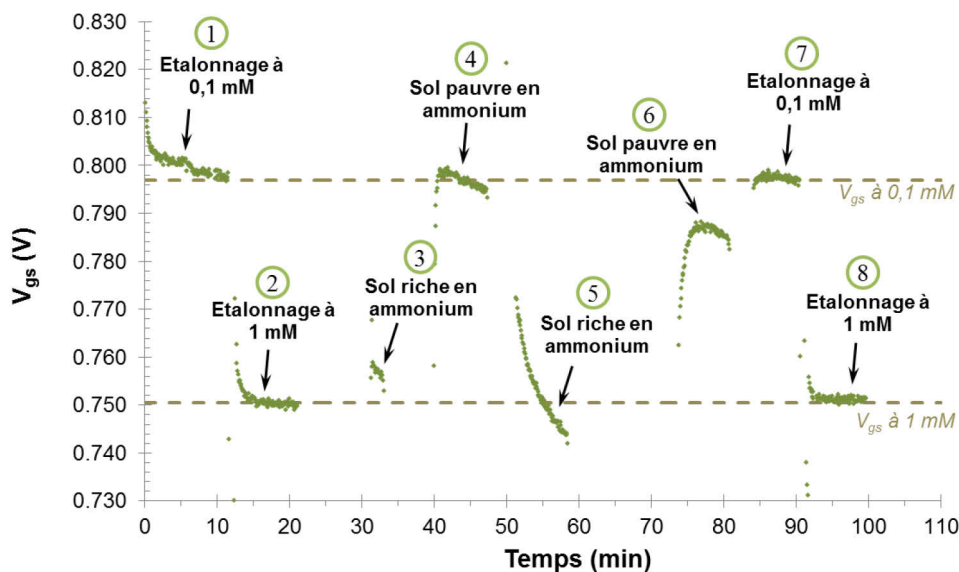


Figure 98 : Mesures temporelles du pNH_4 -ISFET. Les numéros indiqués sur la figure font référence aux numéros de chaque étape de la séquence de test.

Toutefois, les variations de réponse ne sont probablement pas dues à 100% aux ions ammonium. L'analyse par chromatographie montre également une importante concentration en ion potassium dans le pot n°1 ($[\text{K}^+] = 0,354$ mM) par rapport au pot n°2 ($[\text{K}^+] = 0,029$ mM). Or, l'étude de la sélectivité des pNH_4 -ISFET a souligné l'interférence des ions potassium ($\text{Log } K_{\text{NH}_4^+, \text{K}^+}^{\text{pot}} = -1,2$, cf. chapitre 3, partie 3bii).

En conclusion, les mesures effectuées dans ces sols de manière directe ont permis de discriminer deux niveaux d'azote minéral dans le sol. Nous avons réussi à enregistrer une augmentation de la concentration en ions ammonium provoquée par l'activité des micro-organismes du sol stimulés par la température.

b. Analyse *in situ* du sol par les pNO₃-ISFET

Les pNO₃-ISFET ont, à leur tour, été testés en condition *in situ* dans le sol argilo-limoneux n°3. Nous avons préalablement procédé à des analyses par chromatographie ionique de deux extraits de ce sol afin de connaître la concentration résiduelle en ions nitrates et autres ions interférents. L'extraction a été réalisée en filtrant, après l'avoir agitée pendant 45 minutes, une solution contenant 5 g de sol sec dissouts dans 50 mL d'eau ultrapure. Les résultats de l'analyse sont consignés dans le Tableau 27, exprimés en mg/kg de sol.

	Nitrate (mg/kg)	Nitrite (mg/kg)	Chlorure (mg/kg)	Sulfate (mg/kg)	Phosphate (mg/kg)
Extrait n°1	7,75	0,76	31,30	87,11	n.a.
Extrait n°2	8,34	0,76	32,61	91,28	n.a.
Moyenne	8,05	0,76	31,96	89,20	n.a.

Tableau 27 : Concentrations massiques des ions du sol exprimées en mg/kg de sol.

D'après ces résultats et en considérant que les ions nitrates sont complètement disponibles, la concentration moyenne en ions nitrates de la solution de sol porté à 75% d'humidité relative serait de 0,371 mM. Ce résultat est en excellent accord avec les analyses initiales de ce même sol obtenues avec les lysimètres dans le cadre de l'étude *in situ* des pNH₄-ISFET (Tableau 26). L'analyse par chromatographie ionique renforce donc notre hypothèse selon laquelle les ions nitrates sont totalement solubilisés dans la solution du sol lors de son humidification.

Nous avons construit notre expérience de caractérisation *in situ* des pNO₃-ISFET en exploitant ce fait. Quatre pots ont été remplis avec 300 g de sol sec. Connaissant la capacité de rétention en eau du sol, nous avons porté ces sols à 75% d'humidité relative en utilisant des solutions aqueuses de nitrate d'ammonium de concentrations variables. Ainsi, les concentrations théoriques en ions nitrates contenus dans la solution de sol s'élevaient à 0,381 mM, 0,688 mM, 1,784 mM et 10,371 mM, soit respectivement pNO₃ = 3,42, pNO₃ = 3,16, pNO₃ = 2,75 et pNO₃ = 1,98.

La réponse des pNO₃-ISFET a été enregistrée dans ces sols en utilisant l'ISFETmètre et une électrode ECS. L'ISFET était étalonné avant et après chaque point de mesure dans des solutions étalons contenant du nitrate d'ammonium NH₄NO₃ en concentration variable ainsi qu'une concentration de sulfate de magnésium MgSO₄ fixée à 0,1 M. Le protocole de mesure dans le sol était le même que pour l'étude *in situ* des pNH₄-ISFET : le microcapteur était inséré dans le sol en exerçant une légère pression pour assurer un contact adéquat.

Les résultats des mesures sont répertoriés dans le Tableau 28. Ils ont également été tracés en fonction de la concentration théorique en ions nitrates à la Figure 99. La relation liant la concentration déterminée par les pNO₃-ISFET de manière *in situ* à la concentration théorique est linéaire ($R^2 > 0,87$). Le coefficient directeur de la régression linéaire n'est pas tout à fait unitaire (0,84), ce qui implique ici que les ISFET ont tendance à surestimer la concentration en

ions nitrates. Ce phénomène pourrait être dû à la présence en quantités non négligeables d'ions interférents, comme en atteste l'analyse par chromatographie ionique. Pour une concentration donnée, les mesures présentent une dispersion relativement forte mais les valeurs moyennes sont en bon accord avec les valeurs théorique (Tableau 28). Plusieurs répétitions sont donc nécessaires pour améliorer l'exactitude des mesures réalisées avec les pNO₃-ISFET.

	pNO ₃ théorique = 3,42	pNO ₃ théorique = 3,16	pNO ₃ théorique = 2,75	pNO ₃ théorique = 1,98
Mesure 1	3,53	3,19	2,54	2,25
Mesure 2	3,30	2,77	2,49	2,02
Mesure 3	3,38	3,01	2,42	2,19
Mesure 4	3,27			
Moyenne	3,37	2,99	2,48	2,15
Ecart type	0,10	0,17	0,05	0,10

Tableau 28 : Résultats des mesures *in situ* dans le sol argilo-limoneux

Au final, notre étude *in situ* témoigne de la capacité des pNO₃-ISFET à déterminer avec une précision acceptable le contenu en ions nitrates du sol. Il serait donc envisageable d'effectuer l'analyse du sol directement sur site, sans passer par une étape d'extractions des nutriments du sol, et bénéficier ainsi d'un résultat immédiat.

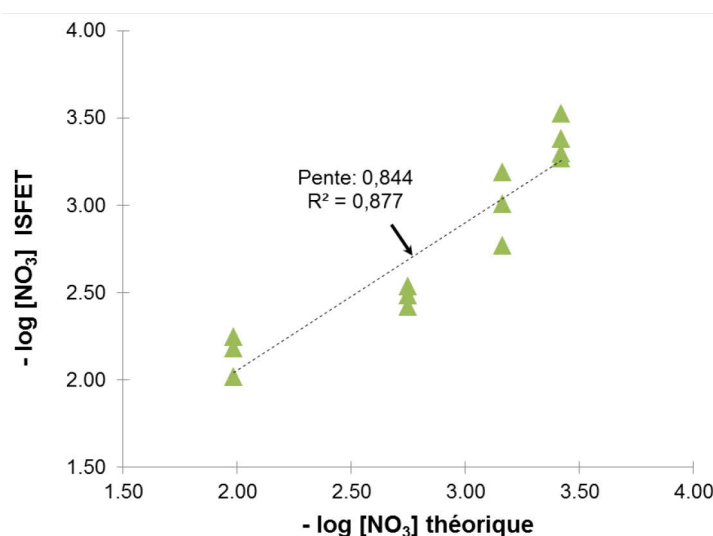


Figure 99 : Relation entre les valeurs de concentrations en ions nitrate théoriques et celles issues des mesures *in situ* obtenues avec les pNO₃-ISFET

c. Durée de vie dans le sol des ISFET fonctionnalisés

Le projet INNOOPERF-Blé vise le suivi de la teneur en nutriments azotés du sol durant toutes les étapes de la culture du blé. Les pNH₄-ISFET et les pNO₃-ISFET doivent donc avoir une durée de vie d'au moins 5 mois dans le sol. Les pH-ISFET ont déjà démontré leur bonne durée de vie dans le sol (cf. partie 1d). Néanmoins, dès lors qu'ils sont fonctionnalisés, les ISFET deviennent beaucoup plus fragiles. Ils sont, par exemple, sujets aux problèmes de décollement de la membrane ou au relargage des molécules ionosensibles, qui entraînent une dégradation irrémédiable des propriétés de détection. En outre, le sol n'est pas un milieu propice à la longévité des microcapteurs fonctionnalisés du fait de l'interaction de la membrane avec de très nombreuses espèces chimiques ou biologiques.

La durée de vie des pNH₄-ISFET a été estimée en insérant de manière permanente le microcapteur dans un échantillon de sol n°3 saturé en eau. Périodiquement, le pNH₄-ISFET était

retiré du sol, nettoyé à l'eau, puis étalonné à deux reprises par ajouts successifs de solution de nitrate d'ammonium NH_4NO_3 dans de l'eau ultrapure. La saturation en eau du sol permettait d'extraire facilement le capteur en minimisant les risques de frottements avec les particules de sol. Une simple rayure ou, pire, l'arrachage de la membrane sensible auraient été fatals pour le pNH_4 -ISFET et l'étude aurait dû être interrompue. Les courbes issues du deuxième étalonnage ont permis de suivre l'évolution temporelle des propriétés de détection (V_{gs} à $\text{pNH}_4 = 4$, linéarité de la réponse, sensibilité) (Figure 100, Figure 102).

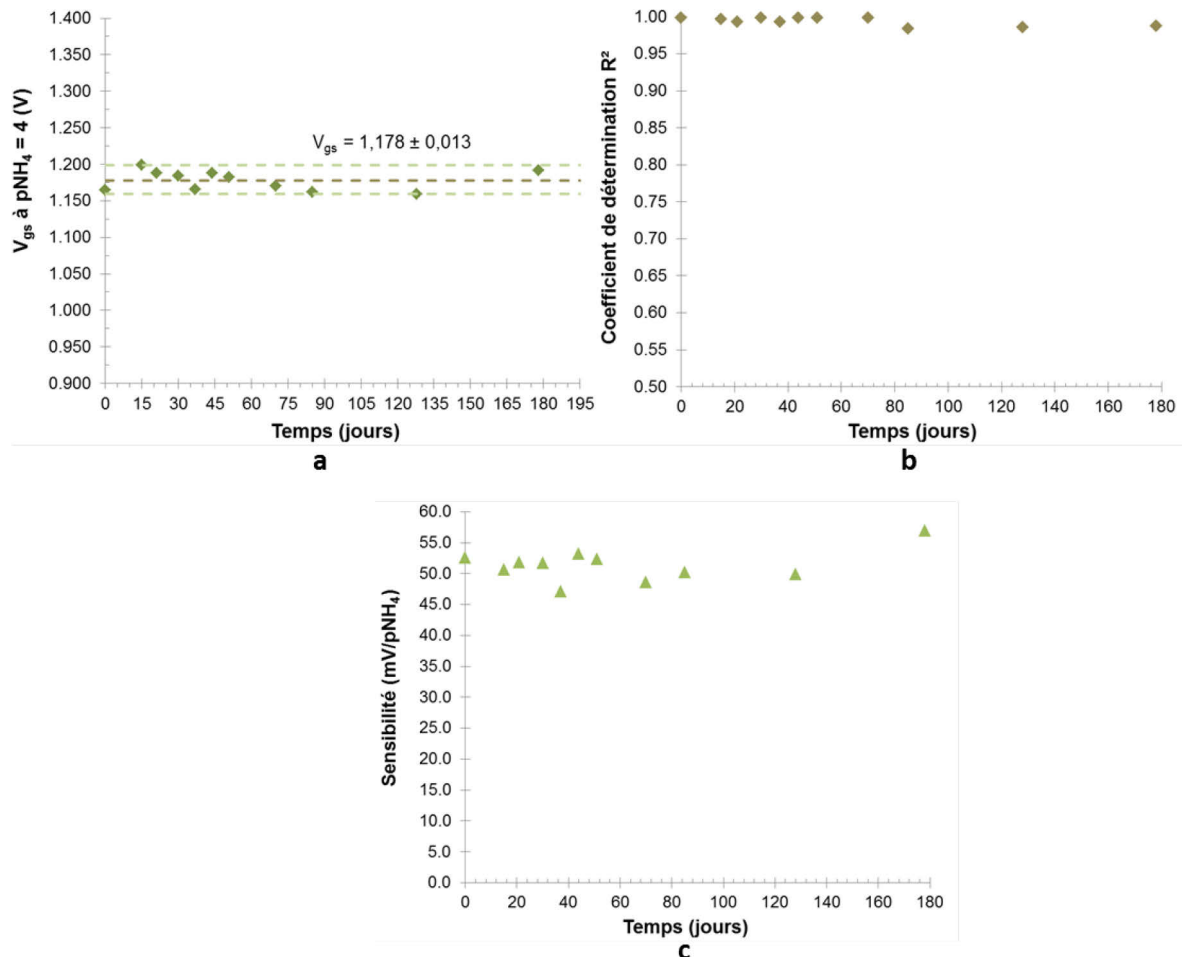


Figure 100 : (a), évolution temporelle de la tension V_{gs} du pNH_4 -ISFET à $\text{pNH}_4 = 4$. (b), évolution temporelle du coefficient de détermination R^2 associé à la régression linéaire dans la gamme pNH_4 [2 - 5]. (c), évolution temporelle de la sensibilité du pNH_4 -ISFET calculée dans la gamme pNH_4 [2 - 5]

La tension V_{gs} du pNH_4 -ISFET à $\text{pNH}_4 = 4$ ne suit pas un sens de variation constant au cours du temps (Figure 100a). Elle présente une valeur moyenne de $1,178 \text{ V} \pm 0,013 \text{ V}$. Le coefficient de détermination R^2 de la régression linéaire calculée dans la gamme pNH_4 [2 - 5] est resté supérieur à 0,98 durant les six mois de caractérisation (Figure 100b). Ce résultat confirme l'excellente conservation de la linéarité de la réponse. Nous avons donc pu observer l'évolution de la sensibilité du pNH_4 -ISFET. Celle-ci est restée quasi-nernstienne pendant les six mois de l'étude de son vieillissement dans le sol. La valeur moyenne était de $51,4 \text{ mV/pNH}_4$ avec un écart type de $2,5 \text{ mV/pNH}_4$. Des baisses significatives de sensibilité ont été remarquées à certains moments mais n'étaient étrangement pas irréversibles. Par exemple, la sensibilité est descendue à $47,1 \text{ mV/pNH}_4$ à $t = 37$ jours et est remontée à $53,2 \text{ mV/pNH}_4$ à $t = 44$ jours, soit une semaine plus tard. De même, les courbes du premier étalonnage, réalisé immédiatement après avoir sorti le capteur du sol puis nettoyé à l'eau, montraient des propriétés de détection (sensibilité, gamme

de linéarité, limite de détection) bien plus mauvaises que celles issues du deuxième étalonnage effectué immédiatement après (Figure 101). Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces différences :

1. La membrane ionosensible est recouverte par un dépôt d'origine minérale ou biologique qui bloque l'échange ionique. Le nettoyage rapide à l'eau n'a pas suffi à l'éliminer totalement et sa dissolution a finalement eu lieu au cours du premier étalonnage du capteur.
2. Le premier étalonnage a un effet réparateur pour la membrane. Il agit de manière similaire à une étape de conditionnement. Dans le sol, la membrane s'est chargée d'ions interférents et ce contact avec une solution ne contenant que du nitrate d'ammonium lui permet d'échanger les ions et de se « réinitialiser ». Etant donnée sa faible épaisseur, une mise en solution de seulement une heure suffit à la membrane pour se reconditionner.

Cette analyse du vieillissement du microcapteur impliquerait que les molécules ionosensibles (ionophores, additifs ioniques) restent bien intégrées à la matrice en FPSX, même après six mois dans le sol. Le pNH_4 -ISFET est toujours fonctionnel au terme de l'expérience et n'a pas subi de perte significative de ses propriétés de détection. En conclusion, notre étude aboutit sur un résultat très positif : les pNH_4 -ISFET disposent d'une durée de vie d'au moins six mois dans le sol.

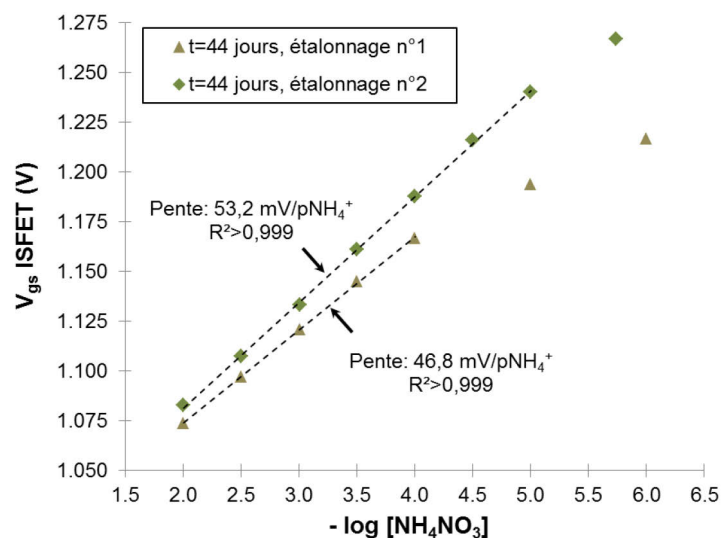


Figure 101 : Comparaison des deux courbes de calibrations du pNH_4 -ISFET obtenues après 44 jours dans le sol

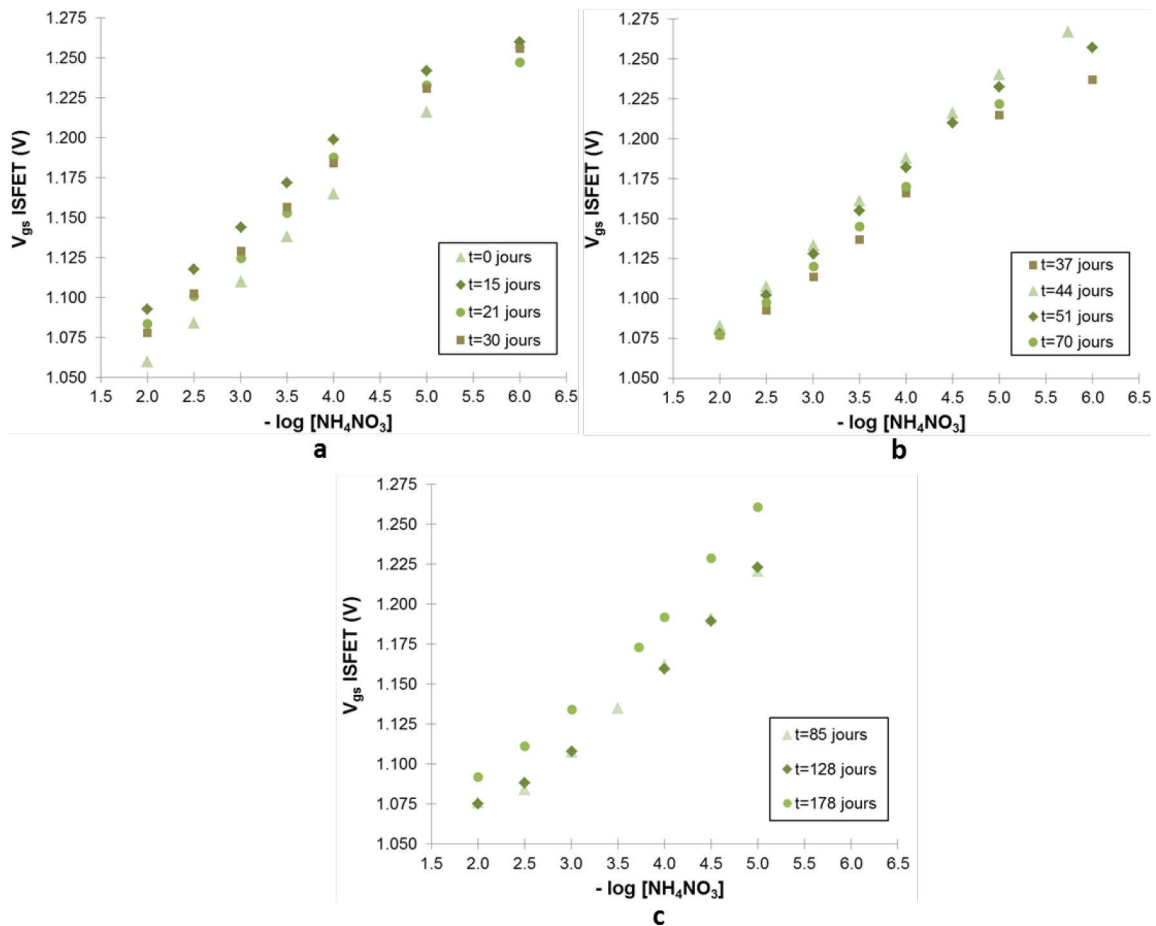


Figure 102 : Courbes (deuxième étalonnage) du $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$ montrant l'évolution de ses propriétés de détection au cours de l'étude du vieillissement dans le sol. (a), entre 0 et 30 jours, (b), entre 37 et 70 jours, et (c), entre 85 et 178 jours.

Malheureusement, nous n'avons pas pu déterminer précisément la durée de vie des $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$. Des tests ont été entamés puis interrompus en raison d'un problème d'instrumentation qui s'est avéré fatal pour les microcapteurs en cours de caractérisation. Comme nos $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$ sont l'aboutissement d'un développement plus récent, nous avons manqué de temps pour reproduire ces expériences avec une précision similaire à celle utilisée dans le cadre de l'étude des $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$. En revanche, la durée de vie sur étagère des $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$ est d'au moins six mois. De plus, des caractérisations *in situ* menées pendant plusieurs semaines ont montré que ces microcapteurs restaient sensibles aux variations de concentration en ions nitrate sans que l'on puisse conclure précisément sur une éventuelle dégradation de cette sensibilité. La durée de vie étant un facteur extrêmement important pour le succès du projet INNOPERF-Blé, ce point devra absolument être élucidé par la suite.

Les deux premières parties de ce chapitre ont mis en avant les possibilités d'analyse ponctuelle sur site qu'offre la technologie ISFET, fonctionnalisée ou pas, lorsqu'elle est directement mise en contact avec le sol. Nous avons ainsi pu distinguer les différences de pH et de teneur en azote minéral des sols à l'aide de composants ISFET assemblés sur un packaging sommaire. Nous souhaitons à présent savoir si nos microcapteurs peuvent effectuer un réel suivi en continu et sur le long terme de ces analytes. L'intégration des microcapteurs dans un système dédié à l'analyse du sol est alors nécessaire pour assurer, entre autres, la polarisation des ISFET et la communication des données au cours du temps.

3. Intégration de la technologie ISFET dans un système d'analyse multi-capteur autonome et communicant pour la suivi du cycle de l'azote dans le cadre de la culture du blé dur

a. Présentation du système d'analyse

L'intégration des ISFET dans un système dédié à l'analyse du sol a été réalisée en collaboration avec notre partenaire industriel Sirea. Selon notre cahier des charges, le système doit remplir les principales fonctions suivantes :

- permettre l'insertion des capteurs dans le sol à une profondeur donnée,
- fournir l'alimentation électrique des capteurs durant plusieurs mois,
- envoyer les données de mesure sur un serveur.

L'analyse de reliquats azotés par les méthodes conventionnelles est pratiquée sur des prélèvements de sol dans les horizons 0-30 cm et 30-60 cm, à minima. La profondeur d'enracinement du blé dur ne dépasse généralement pas 30 cm. Ainsi, l'azote minéral situé dans l'horizon 30-60 cm est perdu car il ne pourra plus être absorbé par la plante. Nous avons donc choisi de positionner les ISFET à deux niveaux de profondeur : -15 cm et -45 cm. De plus, grâce à la communication des données en quasi-temps réel, cette analyse « multi-horizon » permettrait de détecter les flux de nitrates à travers la profondeur du sol. La détection de ces flux présente un intérêt considérable dans la prévention du lessivage des nitrates et des conséquences néfastes qui lui sont associées.

Ainsi, notre système est composé d'un total de 6 ISFET :

- Un pH-ISFET, un pNO_3 -ISFET, un pNH_4 -ISFET positionnés à 15 cm de profondeur
- Un pH-ISFET, un pNO_3 -ISFET, un pNH_4 -ISFET positionnés à 45 cm de profondeur

A cette liste de capteurs s'ajoute une sonde de température située à l'intérieur du packaging du système. Elle peut fournir une estimation de la température du sol, même si elle n'est pas en contact direct. Le packaging est constitué d'une base triangulaire à partir de laquelle partent 3 faces rectangulaires. Chaque type d'ISFET (pH, pNO_3 , pNH_4) est positionné sur une même face à deux niveaux distincts correspondant aux deux profondeurs d'analyse (Figure 103). Le contact des ISFET avec le sol est réalisé au moyen d'ouvertures de 18 mm de diamètre dans le packaging.

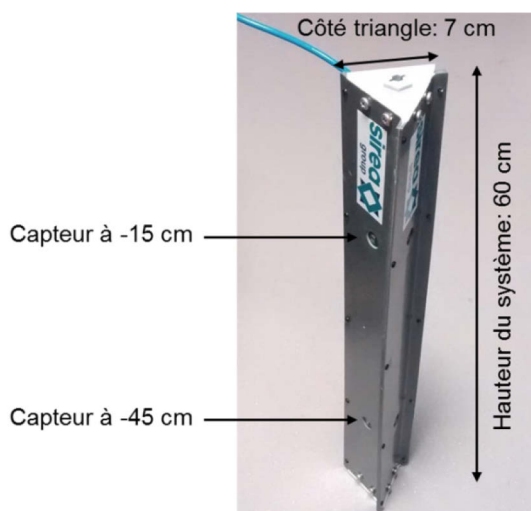


Figure 103 : Photo et dimensions du système

Une carte électronique fabriquée par Sirea et incorporée au sein de ce "packaging" est dédiée à la polarisation des six ISFET (Figure 104). Elle fonctionne selon un mode identique à l'ISFETmètre. Les valeurs de courant et tension drain-source, I_{ds} et V_{gs} , sont fixes. La valeur de tension grille-source V_{gs} de l'ISFET est obtenue en appliquant une contre-réaction au niveau de la source et en mettant le potentiel de l'électrode de référence à la masse. Ce mode de fonctionnement favorise la multi-détection et l'intégration du système car les six ISFET peuvent être utilisés simultanément avec une seule électrode de référence [9]. Les ISFET sont assemblés individuellement sur un circuit imprimé et connectés de part et d'autre de la carte via des connecteurs de type ZIF.

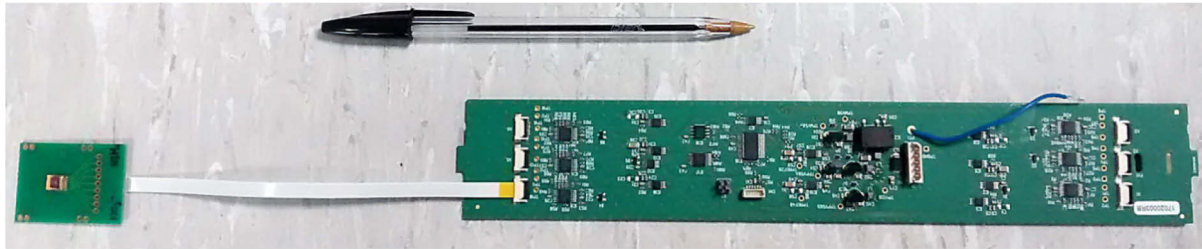


Figure 104 : la carte électronique dédiée à la polarisation des ISFET (à droite) reliée au PCB d'un ISFET (à gauche) via un connecteur ZIF

Ce premier prototype est équipé d'un coffret déporté contenant l'électronique en charge du pilotage du système, de la communication des données à distance, et de la gestion énergétique via des batteries (Figure 105). En cas de poursuite du projet, nous devons mettre en place des solutions d'intégration de cette électronique directement au sein du packaging de la sonde afin de faciliter sa mise en place sur la parcelle. Un module de communication (GT863-PY, TELIT) est chargé de l'envoi des données sur un serveur par transmission GPRS. Une plateforme en ligne, propriété de l'industriel Sirea, offre la possibilité d'y accéder à l'aide d'une simple connexion internet. L'utilisateur peut consulter les données renvoyées en temps réel, les télécharger mais également suivre leur évolution temporelle grâce aux outils de tracé de courbes. Il est également possible de contrôler la périodicité de réveil du système ainsi que le « temps de chauffe » qui correspond à la durée pendant laquelle les capteurs sont polarisés avant de relever la valeur de signal et l'envoyer au serveur.

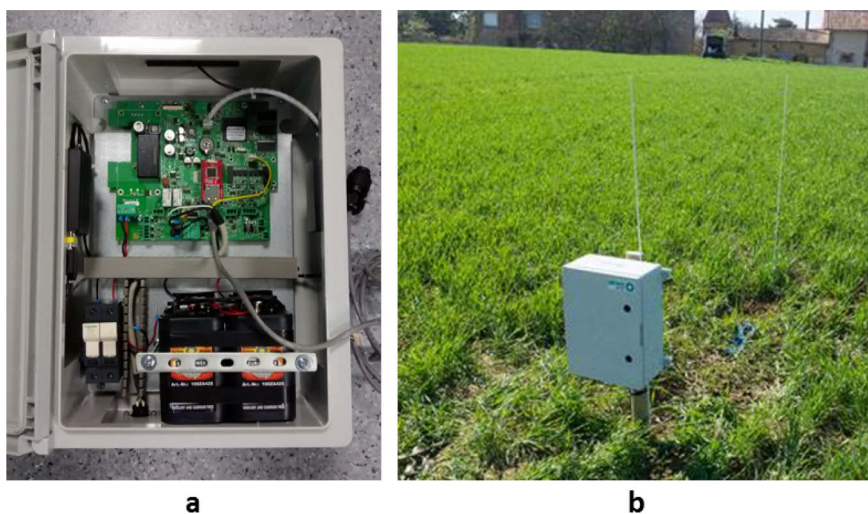


Figure 105 : (a) intérieur du coffret contenant les unités de pilotage du système, de gestion énergétique et de communication radio des données. (b), photo du coffret sur une parcelle de blé

b. Choix et étude d'une électrode de référence pour le système d'analyse

i. Introduction

La fiabilité du système d'analyse repose tout autant sur les capacités de détection des ISFET que sur la stabilité du potentiel de l'électrode de référence (cf. chapitre 3, partie 4a). Le choix d'une électrode de référence adaptée au projet INNOPERF-Blé est donc une étape clé du développement du système final.

Il existe une multitude d'électrodes de référence avec des propriétés variables en termes de précision, stabilité, prix, dimensions, durée de vie, etc... Dans notre cas, nos ambitions pour le projet imposent pour principales contraintes:

- une très bonne stabilité du potentiel sur une durée d'au moins six mois,
- une insensibilité de l'électrode de référence aux variations de concentrations ioniques,
- une bonne précision du potentiel ($< \pm [2-3] \text{ mV}$),
- un coût d'achat ou de fabrication raisonnable ($< 200 \text{ Euros}$).

La stabilité du potentiel est probablement le critère le plus critique et impose donc que l'électrode soit capable de résister à toutes les problématiques propres au sol: la biocontamination, la dissolution dans le temps des matériaux sensibles, l'obstruction de la jonction électrolytique par les particules de sols...

L'identification d'un modèle adéquat a été faite en s'inspirant d'un autre domaine de l'électrochimie qui est confronté à des exigences et à un environnement similaire : l'ingénierie de l'anticorrosion. En effet, une méthode de suivi de longue durée de la corrosion des oléoducs enterrés consiste à mesurer la différence de potentiel entre une électrode de référence enfouie dans le sol et cet oléoduc [10]. Suite à une petite étude de marché, nous avons ainsi sélectionné l'électrode de référence WE200 commercialisée par Silvion Limited (Royaume-Uni) (Figure 106). Ses principales caractéristiques vont être présentées dans les prochains paragraphes.



Figure 106 : Photo de l'électrode WE200 commercialisée par Silvion Limited. La jonction poreuse correspond à la zone de couleur gris-vert située sur la droite.

Il s'agit d'une électrode de type Ag/AgCl contenant un électrolyte solide de chlorure de sodium à 0,5 M. Elle est conçue pour l'installation permanente dans les sols. Elle est constituée d'une matrice poreuse en argent recouverte de chlorure d'argent qui offre une augmentation d'un facteur 50 de la surface active de l'électrode (surface active = 500 cm^2). Cette importante surface ainsi que l'état solide de l'électrolyte contribuent aux bonnes performances théoriques de l'électrode en termes de stabilité, précision et durée de vie. De plus, la jonction microporeuse de l'électrode, un cylindre de 25 mm de diamètre pour 50 mm de hauteur, présente également une surface importante qui facilite la qualité du contact électrode-sol.

En contrepartie, l'électrode WE200 possède pour principal défaut un prix unitaire relativement élevé (155 Euros). Néanmoins, avec une durée de vie théorique supérieure à 30 ans, il est fort probable que l'électrode soit utilisable pendant plusieurs saisons de cultures. Si cette durée se confirmait, l'investissement initial serait plus rentable car le prix de l'électrode pourrait alors être amorti sur plusieurs années.

Par ailleurs, les dimensions générales de l'électrode (environ 24 cm de long, 32 mm de diamètre) ne facilitent pas son intégration dans le système. Toutefois, notre application n'impose pas de réelles contraintes de miniaturisation et nous n'avons donc pas considéré que ce point soit bloquant.

Nous avons effectué quelques caractérisations électrochimiques de l'électrode WE200 dans le but de valider expérimentalement qu'elle dispose des bonnes propriétés pour équiper notre système d'analyse final.

ii. Caractérisation de l'électrode de référence WE200

La sensibilité de l'électrode WE200 aux ions chlorures a d'abord été étudiée de manière *in vitro* par ajouts successifs de solution de KCl dans une solution d'acétate de lithium CH_3COOLi à 0,1 M (Figure 107). Le potentiel à courant nul a été mesuré par rapport à une électrode de référence au calomel saturée en KCl (ECS). Sa valeur moyenne s'élève à 15,6 mV vs. ECS et ses variations suivent une pente d'environ 0,5 mV/pCl entre 0,1 M et 1 mM. On peut donc considérer que l'électrode WE200 est effectivement insensible aux variations de concentration en ions chlorures.

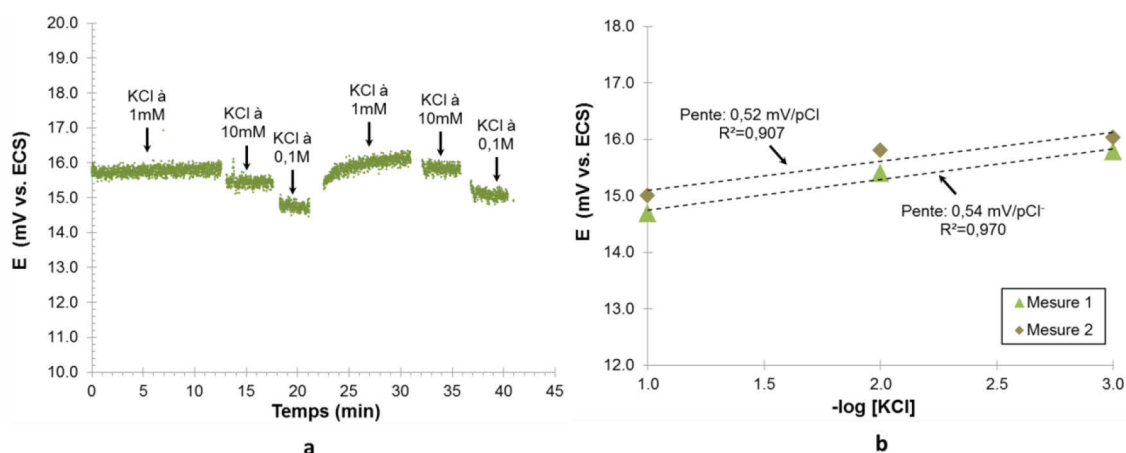


Figure 107 : (a), réponse temporelle aux variations de concentrations en KCl de l'électrode de référence WE200 mesurée par rapport à une électrode au calomel saturée en KCl. (b), courbes de sensibilité aux ions chlorures de l'électrode WE200 établies à partir des données issues de la courbe (a).

D'autre part, la principale contrainte concernant l'électrode de référence est de fournir un potentiel ayant une bonne stabilité temporelle, sans quoi le suivi à long terme de la teneur en nutriments du sol ne serait pas possible avec des capteurs potentiométriques. Nous avons donc évalué ce critère en plaçant l'électrode WE200 dans un pot rempli de 4 kg de sol argilo-limoneux (sol n°3). Les variations de potentiel ont été enregistrées périodiquement pendant une durée de six mois à l'aide d'une électrode de type ECS (Figure 108). Durant toute cette période, l'humidité relative du sol (75%) était maintenue constante via un suivi quotidien de la masse du pot et un arrosage.

L'écart maximal de potentiel constaté au cours des 165 jours est de 20,0 mV. Le potentiel exhibe une dérive linéaire ($R^2=0,895$) d'une valeur de 0,106 mV/jour. Ces variations temporelles sont tout à fait acceptables. La dérive est suffisamment faible pour détecter les variations des tensions de seuil des ISFET dont les dynamiques temporelles devraient être plus rapides. De plus, au vu de la bonne linéarité de la dérive, il est envisageable de prévoir une correction du signal.

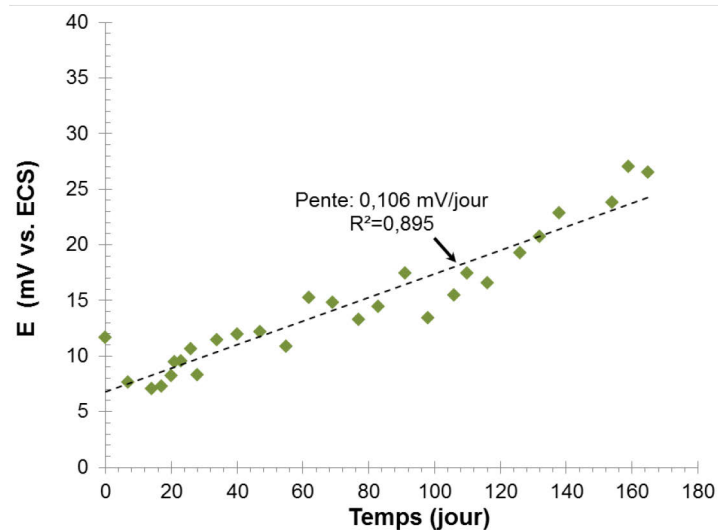


Figure 108 : Evolution temporelle sur six mois du potentiel de l'électrode de référence WE200 placée en sol argilo-limoneux. Les mesures ont été effectuées périodiquement par rapport à une électrode de référence au calomel saturée en KCl

En conclusion, les caractérisations *in vitro* et *in situ* menées sur l'électrode de référence WE200 ont confirmé qu'elle dispose bien des caractéristiques essentielles au succès du projet INNOPERF-Blé. Cette électrode a donc été retenue pour équiper le système d'analyse multi-capteur.

c. Protocole de mise en place du système sur la parcelle

L'une des principales problématiques de la mesure *in situ* avec la technologie ISFET est d'assurer un bon contact avec le sol. Notre étude sur la réponse des pH-ISFET l'avait souligné en mettant également en avant l'influence de la texture du sol (cf. partie 1a). Le protocole de mise en place du système doit donc garantir l'obtention d'un bon contact sol-capteur. La présence de six ISFET sur la sonde rend cette tâche plus compliquée puisque les risques d'un mauvais contact sont multipliés. Contrairement au cas d'un ISFET unitaire simplement assemblé sur un PCB, le système ne peut pas être repositionné dans le sol jusqu'à obtention d'un signal cohérent.

La première étape du protocole consiste à creuser un trou de 10 cm de diamètre sur une profondeur de 60 cm. De telles dimensions nécessitent l'utilisation d'une tarière thermique. La terre issue du forage est récupérée et mise de côté. Le système d'analyse est ensuite positionné dans le trou en ayant pris soin de le rendre solidaire de l'électrode de référence WE200 à l'aide de colliers de serrage. La jonction de l'électrode est positionnée à mi-distance des deux niveaux d'ISFET, soit à approximativement 30 cm de profondeur. La terre mise de côté est tamisée afin d'éliminer les grosses particules (cailloux, débris végétaux, agglomérats de sol). On forme une boue en ajoutant de l'eau jusqu'à obtention d'une texture fine et suffisamment liquide pour assurer un parfait colmatage. Cette boue est alors versée dans le trou contenant le système (Figure 109).



Figure 109 : Mise en place du système dans le sol.

Nous avons testé la validité de ce protocole en mettant en place un système sur une véritable parcelle de blé dur située sur la commune de Rebigue (Haute-Garonne). 5 ISFET sur six ont alors répondu de manière cohérente immédiatement après la mise en place du système. D'autre part, cette première expérience sur une parcelle réelle nous a permis de vérifier le bon fonctionnement du module de communication des données de mesure vers le serveur de Sirea par GPRS.

Les conclusions concernant ce protocole ainsi que, plus généralement, le "packaging" du système sont donc mitigées. Premièrement, nous venons de voir que l'expérience sur parcelle réelle n'a pas abouti à un bon contact sol-ISFET dans 100% des cas. De plus, même en s'aidant d'une tarière thermique, le forage du trou reste une opération relativement ardue et chronophage (quelques dizaines de minutes). Enfin, on peut s'interroger sur la représentativité des mesures au regard de la zone sondée de la parcelle puisque les capteurs sont placés dans un volume de sol dont les propriétés (compaction, texture) ont été modifiées lors de la mise en terre.

Une première piste d'amélioration serait de réduire les dimensions de la base triangulaire du système. Le trou pourrait alors être creusé avec une tarière manuelle de plus petit diamètre. En plus de faciliter l'opération, un diamètre de tarière plus petit conduirait à un plus faible volume de sol « perturbé ». En conséquence, les capteurs seraient plus rapidement en contact avec un sol à l'équilibre et davantage représentatif de la zone sondée de la parcelle. Une seconde piste d'amélioration serait d'améliorer le contact sol-capteur à l'aide d'une solution technique au niveau "packaging". Par exemple, les capteurs ISFET pourraient être recouverts d'un matériau fortement hydrophile, à la manière du mucilage racinaire produit par certaines plantes qui leur sert, entre autres, à stocker l'eau du sol (Figure 110). La solution liquide du sol serait drainée sur les ISFET à travers quelques cm³ d'un matériau judicieusement sélectionné. En plus d'une bonne capacité d'absorption de l'eau, ce matériau devra garantir l'absorption des espèces ioniques du sol et ne pas se dégrader au cours du temps. De plus, cette modification du "packaging" offrirait une protection mécanique des ISFET fonctionnalisés dont la membrane ionosensible peut être abimée lors de la mise en place du système dans le sol ou par les vibrations dues au passage de machines.

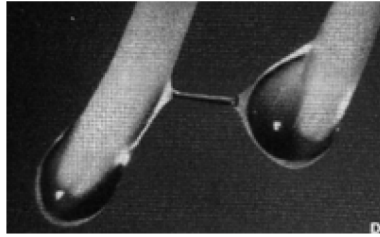


Figure 110 : Photo de mucilages racinaires. Tirée de [11]

4. Caractérisation du système d'analyse multi-capteur

a. Présentation du banc d'essai

Un banc d'essai a été conçu avec l'aide de notre partenaire Sirea dans le but de caractériser le système d'analyse en maîtrisant les paramètres environnementaux ayant un impact sur la réponse des ISFET, tels que la température ou l'humidité du sol (Figure 111).

Ce banc d'essai est constitué d'un tube en PVC de 30 cm de diamètre offrant une contenance de 46 L. L'extrémité basse du tube est fermée et percée de trous pour l'évacuation de l'eau. Le tube est supporté par des pieds en acier inoxydable et posé dans une coupelle prévue pour la rétention et la récupération de l'eau. Quatre lysimètres (modèle Rhizon SMS 19.21.05F) sont positionnés aux profondeurs -15 cm, -30 cm, -45 cm et -60 cm. La récupération de la solution du sol via ces lysimètres se fait par le côté extérieur du tube. Enfin, le contrôle de l'humidité du sol est effectué par pesée sur une balance. Une fois rempli de sol, l'ensemble du banc possède une masse d'environ 70 kg.



Figure 111 : Photo du banc d'essai positionné sur la balance. Les connecteurs des lysimètres apparaissent en bleu le long du tube.

Nous pouvons ainsi simuler au laboratoire des épisodes météorologiques (pluies) et pédologiques (lessivage) ainsi que des pratiques agricoles (irrigation, fertilisation) sans se déplacer sur une parcelle éloignée où ces conditions seraient mal contrôlées. Nous utilisons un arrosoir muni d'une pomme d'arrosage pour imiter les précipitations et répartir les apports d'eau ou d'engrais de manière homogène à la surface du sol. Ainsi, un volume d'un litre d'eau

apporté est équivalent à une pluviométrie d'environ 14 mm. Le lessivage est reproduit en apportant de l'eau alors que le sol en est déjà saturé. La récupération de l'eau dans la coupelle, et éventuellement son analyse, confirme que le phénomène a bien eu lieu. Enfin, il est possible de vérifier la cohérence de la réponse des microcapteurs en faisant analyser par les méthodes conventionnelles les solutions de sol extraites à différentes profondeurs via les lysimètres.

Une première caractérisation du système a été réalisée sur ce banc pendant une durée de deux semaines. Les résultats de cette expérience seront présentés dans la prochaine partie.

b. Première caractérisation du système d'analyse sur le banc d'essai

Après avoir placé le système d'analyse en position verticale au centre du tube, nous l'avons rempli avec 50 kg de sol prélevé sur une parcelle appartenant à notre partenaire industriel Agri-Intranet. Ce sol n'a malheureusement pas été analysé par un laboratoire agréé, nous estimons cependant qu'il possède une texture proche du type limon argilo-sableux offrant des propriétés de drainage de l'eau et d'adsorption cationique sur le complexe argilo-humique. L'humidité relative du sol au moment de la mise en place du système était d'environ 60%. Similairement au protocole de mise en place du système sur parcelle réelle, le sol ajouté au niveau des ISFET était sous forme boueuse pour assurer un meilleur contact sol-capteur.

Le système a été démarré immédiatement après sa mise en place dans le banc d'essai. Nous l'avons programmé pour qu'il se réveille toutes les 5 minutes puis polarise les ISFET en continu durant une minute avant de transmettre la valeur de tension de seuil des six ISFET par GPRS. Nous avons suivi pendant une période de quinze jours les variations des signaux ISFET en fonction de différents apports en eau ou en solution de nitrate d'ammonium (Figure 113). Les moments, quantités et concentrations de ces apports sont indiqués dans le Tableau 29. Au total, les ISFET auront donc été polarisés pendant environ 60 heures. Cette durée n'est pas négligeable et a probablement eu un effet sur le vieillissement des ISFET. Nous avons volontairement choisi une fréquence de réveil très élevée afin de pouvoir suivre précisément les variations de réponse du système. A terme, un à deux réveils par jour seront probablement suffisants pour économiser la batterie et les microcapteurs tout en assurant un suivi optimal.

Étape	Temps (jours)	Événements	Renvoi
0	0	Mise en place du système dans le sol	
1	0,82	2 L d'eau déionisée	
2	1,83	1 L de nitrate d'ammonium à 1 g/L	Figure 112
3	2,14	1 L d'eau déionisée	
4	4,96 puis 5 et 5,04	3 x 1 L d'eau par intervalle d'1 heure Saturation en eau du sol	Figure 114
5	5,17	1 L de nitrate d'ammonium à 1 g/L	Figure 114
6	6,06	1 L d'eau déionisée	
7	7,05	1 L d'eau déionisée	
8	7,98	1 L de nitrate d'ammonium à 1 g/L	
9	11,81	1 L d'eau déionisée	
10	13,17	1 L d'eau déionisée	
11	14,25	1 L de nitrate d'ammonium à 10 g/L	Figure 115

Tableau 29 : Résumé de la séquence des événements au cours des 15 jours de caractérisation du système

Au moment du démarrage du système, seuls les deux capteurs pH-ISFET ont immédiatement renvoyé une valeur cohérente. Les quatre ISFET fonctionnalisés ne répondaient

pas, probablement en raison d'un mauvais contact sol-capteur malgré les précautions prises lors de la mise en place du système dans le banc d'essai. La valeur des signaux des pH-ISFET a confirmé le bon positionnement de l'électrode de référence WE200 dans le sol. Après une journée de test et un apport de 2 L d'eau déionisée (étape 1), les 3 capteurs positionnés à -15 cm présentaient enfin un signal correct, témoignant d'une bonne reconfiguration du sol autour des $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$ et des $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$. Leurs signaux sont restés cohérents jusqu'à la fin de l'expérience à $t = 15$ jours, comme le confirme la continuité des courbes sur la Figure 113. En revanche, les $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$ et les $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$ à -45 cm n'ont fonctionné correctement que de manière ponctuelle au cours des quinze jours de caractérisation du système. Les variations de leurs signaux ne suivaient pas de véritable tendance et ne semblaient pas être corrélées aux variations de concentration en nitrate d'ammonium consécutives aux apports. Seuls les résultats des 3 ISFET localisés à -15 cm seront donc présentés afin de simplifier les figures et les discussions des prochains paragraphes. Par conséquent, la comparaison des signaux des ISFET aux deux profondeurs n'a pas été possible et cette première expérience n'aura malheureusement pas permis de visualiser les flux verticaux d'azote minéral.

A $t = 1,83$ jours, nous avons apporté 1L de nitrate d'ammonium à 1 g/L (étape 2). La réponse du système suite à cet ajout est présentée à la Figure 112. Les tensions de seuil des $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$ et des $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$ ont alors varié d'environ 50 mV et 25 mV, respectivement. Pour ces deux capteurs, ces variations vont dans le sens d'une augmentation des concentrations en ions ammonium et nitrates de facteurs respectifs 10 et 3. Ces variations de tensions sont significatives ce qui prouve que, pour la première fois, notre système a été capable de détecter un apport d'engrais dans un sol réel. L'amplitude de variation plus faible dans le cas du $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$ est très probablement due à une concentration de la solution du sol en ions nitrates initialement plus forte que celle en ions ammonium. La tension de seuil du pH-ISFET n'a changé que de 1-2mV. Cette valeur, négligeable, est cohérente puisque l'apport de nitrate d'ammonium ne doit pas entraîner de modification importante du pH du sol.

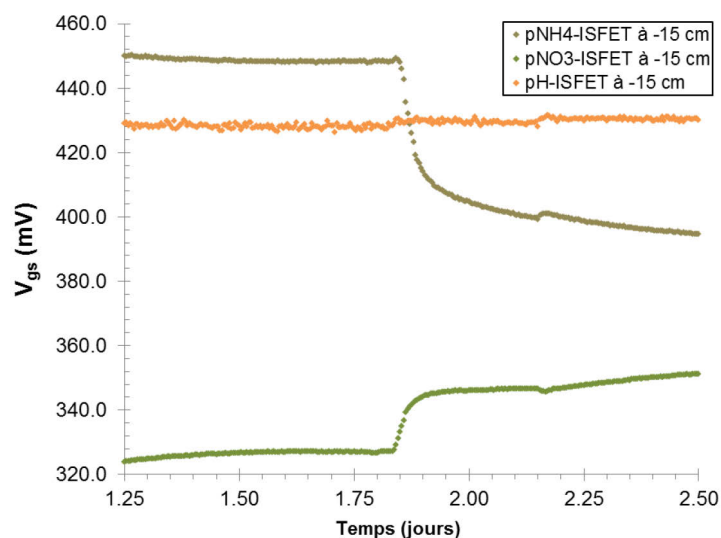


Figure 112 : Réponse des trois ISFET positionnés à -15 cm après un apport d'1 L de solution de nitrate d'ammonium à 1 g/L (étape 2)

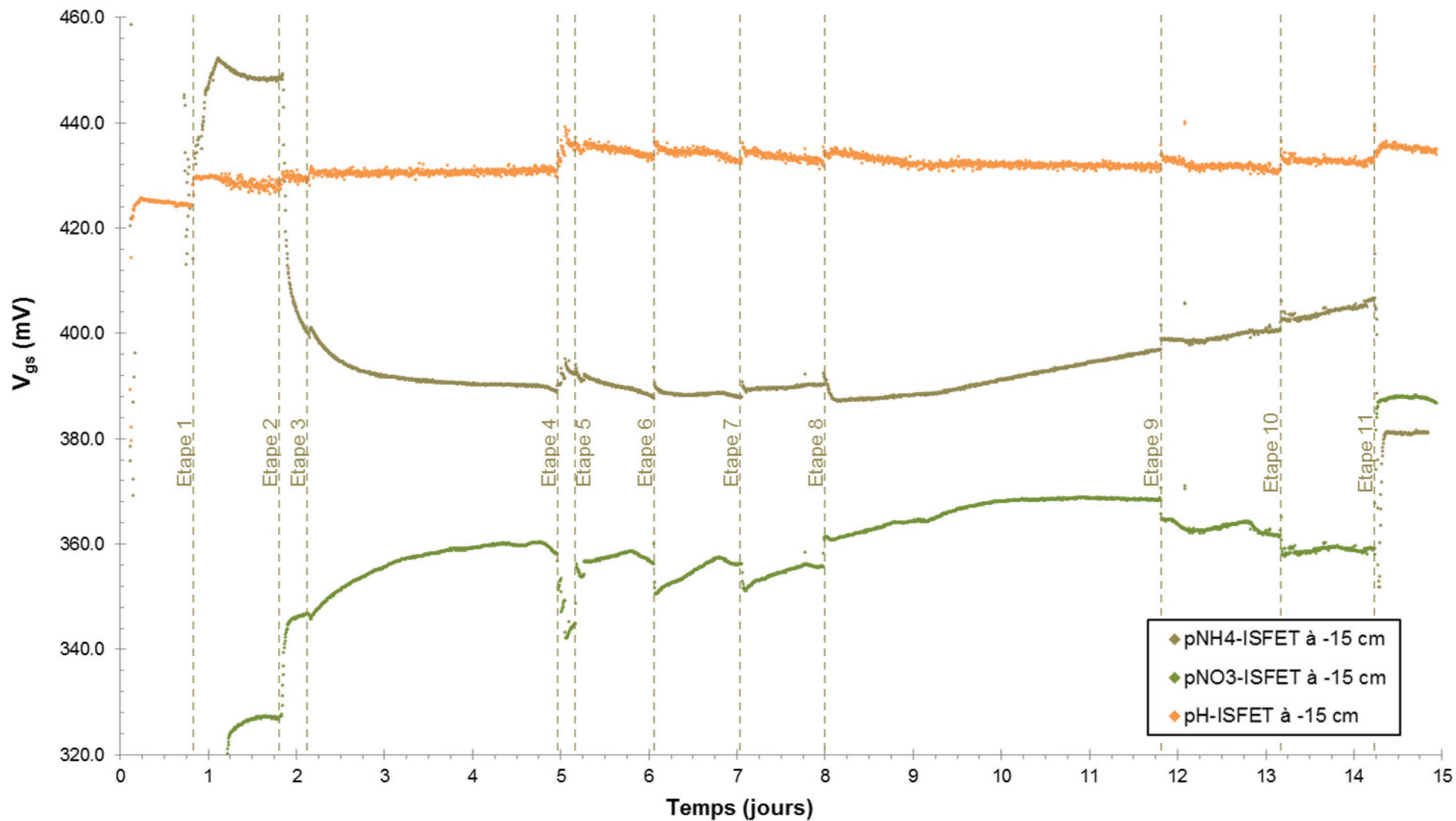


Figure 113 : Réponse des trois ISFET positionnés à -15 cm pendant l'ensemble de l'expérience

La réponse du système au cours des étapes 4 et 5 est détaillée à la Figure 114. Nous avons tout d'abord arrosé le sol suivant une série de trois apports d'eau de 1L en respectant un intervalle d'une heure entre chaque apport (étape 4). La coupelle du banc d'essai s'est progressivement remplie de plus de 1L d'eau. Ce phénomène témoigne de la saturation en eau du sol. Chaque arrosage a entraîné une baisse d'environ 7 mV de la tension de seuil du $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$. Au total, ces variations de signal représentent une diminution de concentration en ions nitrates d'un facteur proche de 2,5. La hausse de l'humidité du sol a entraîné la dilution de sa solution qui a pu être détectée par le $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$. Après saturation du sol en eau, la diminution de la concentration pourrait également être causée par le lessivage des ions nitrates accompagnant le drainage de l'eau en profondeur. Les variations de tension de seuil du pH-ISFET et du $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$ sont plus faibles. Pour ces deux ISFET, la tension de seuil n'a augmenté que de 5-7 mV suite au trois arrosages. Ces valeurs correspondent à une augmentation d'environ 0,12 unité pH et à une diminution de la concentration en ions ammonium d'un facteur proche de 1,4. Contrairement aux ions nitrates, les ions H_3O^+ et NH_4^+ peuvent être adsorbés à la surface des particules négatives constituant le complexe argilo-humique. Il existe donc une réserve d'ions ammonium et hydronium qui peuvent être échangés avec la solution du sol. Cette réserve engendre un effet tampon pouvant expliquer les faibles variations de tensions de seuil. En l'occurrence, la réserve en ions NH_4^+ a pu être constituée lorsque nous avons ajouté 1L de solution de nitrate d'ammonium au sol au cours de l'étape 2.

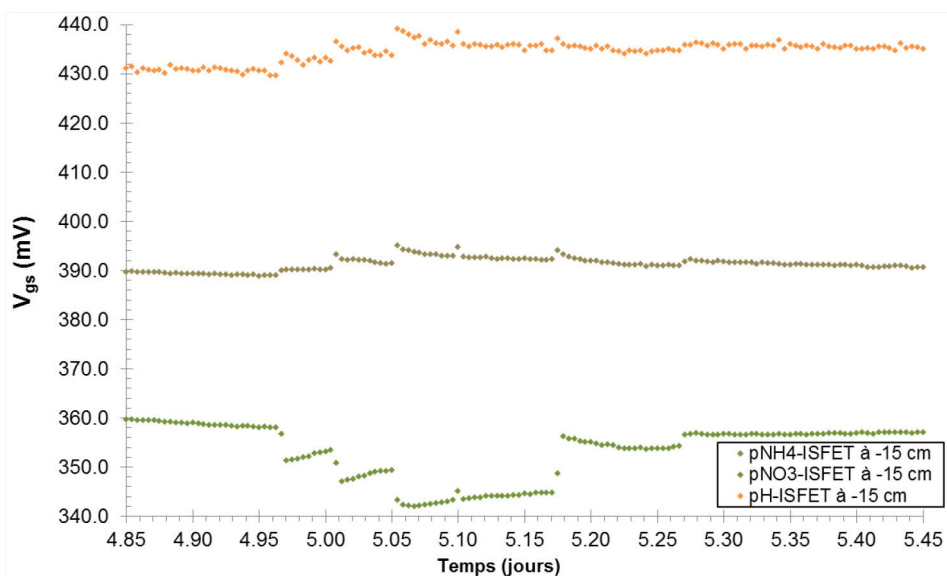


Figure 114 : Réponse des trois ISFET positionnés à -15 cm après une série de trois apports d'1 L d'eau suivie d'un apport d'1 L de nitrate d'ammonium à 1 g/L (étapes 4 et 5).

Puis, à $t = 5,17$ jours, nous avons à nouveau apporté 1L de solution de nitrate d'ammonium à 1 g/L (étape 5). La tension de seuil du $\text{pNO}_3\text{-ISFET}$ a alors augmenté de 12 mV, une valeur équivalente à une augmentation de concentration en ions nitrates d'un facteur proche de 1,7. Cet arrosage n'a provoqué qu'une augmentation temporaire de 2 mV des tensions de seuil du pH-ISFET et du $\text{pNH}_4\text{-ISFET}$, qui sont finalement retournées à leur valeur précédente après quelques dizaines de minutes. Cette faible réponse souligne à nouveau les faibles dynamiques de variations cationiques au sein de la solution du sol.

Entre $t = 5,17$ jours et $t = 14,25$ jours, nous avons répété les étapes d'irrigation et de fertilisation. Le système a alors répondu de manière similaire à ce que nous avons décrit lors des

étapes précédentes. Nous ne donnerons donc pas plus de détails pour ne pas alourdir ce chapitre.

A la fin de l'expérience, à $t = 14,25$ jours, nous avons apporté 1L de solution de nitrate d'ammonium au sol (étape 11). La concentration a été multipliée par dix par rapport aux précédentes étapes de fertilisation, soit 10 g/L. Ce choix avait pour but d'augmenter significativement la concentration en azote minéral, et notamment en ammonium, pour valider que les trois ISFET étaient toujours sensibles après deux semaines de mesures *in situ* en quasi-continu. La réaction du système est présentée à la Figure 115. Une heure après l'ajout d'engrais, la tension de seuil du pNO_3 -ISFET présentait une hausse de près de 30 mV correspondant à une élévation de la concentration en ions nitrates d'un facteur d'environ 4. La réaction du pNH_4 -ISFET s'est faite en deux temps. Sa tension de seuil a tout d'abord chuté de 55 mV au cours de la première heure suivant la fertilisation. Le pNH_4 -ISFET a donc détecté une augmentation de la concentration en ions ammonium d'un facteur proche de 10. Puis, dans un second temps, la tension de seuil s'est élevée de 30 mV jusqu'à atteindre une valeur stable située à -25 mV par rapport à la valeur initiale. Il est difficile d'expliquer avec certitude un tel type de réponse. Une hypothèse serait que les ions ammonium apportés étaient tout d'abord totalement disponibles dans la solution du sol avant d'être progressivement adsorbés à la surface des colloïdes constituant le complexe argilo-humique. La réaction du pH -ISFET est extrêmement faible, conformément au fait qu'un apport d'engrais ne doit pas beaucoup influencer sur le pH du sol. Notre étude de la durée de vie *in situ* du pH -ISFET (cf. partie 1d) nous permet toutefois d'être confiant quant à la conservation de ses propriétés de détection durant cette expérience de quinze jours.

La réponse du pNH_4 -ISFET et du pNO_3 -ISFET au cours de cette ultime étape confirme donc que le système, et les capteurs qui le composent, sont restés fonctionnels durant les 15 jours de l'expérience. Les réponses (ou absence de réponse) observées reflétaient donc bien les variations locales de concentration de la solution du sol.

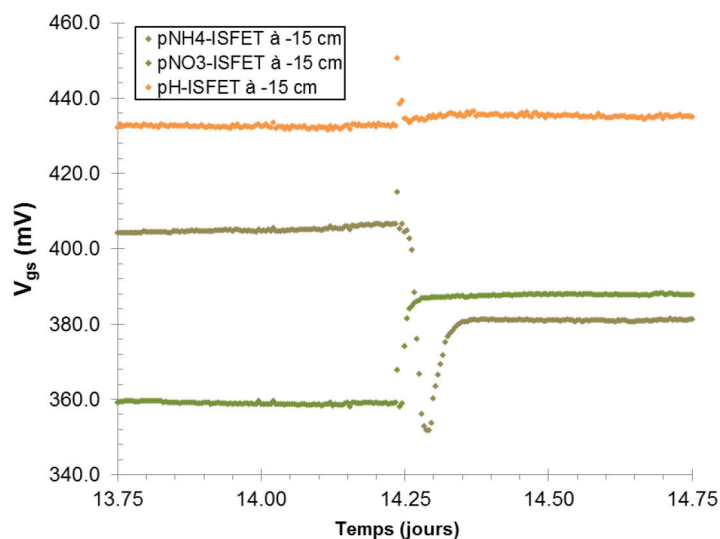


Figure 115 : Réponse des trois ISFET positionnés à -15 cm après un apport d'1 L de solution de nitrate d'ammonium à 10 g/L (étape 11)

En conclusion, la caractérisation du système d'analyse dans le banc d'essai a livré des résultats prometteurs quant à la réalisation des objectifs du projet INNOPERF-Blé. Le système a été capable de détecter des variations de concentrations consécutives à des événements ponctuels tels que pluies, irrigation ou fertilisation. Les concentrations du sol variaient suivant

des dynamiques rapides, provoquant un changement brutal de la pente du signal des ISFET qui se distinguait aisément de la dérive intrinsèque des microcapteurs. A chaque étape, les tensions de seuil des ISFET ont varié dans un sens approprié par rapport aux changements attendus. Toutefois, le système d'analyse simple plus adapté à mesurer les concentrations en ions nitrates dont la forte mobilité au sein de la solution du sol donne lieu à de plus fortes amplitudes de variations que dans le cas des ions ammonium et du pH. A l'avenir, il sera important de déterminer s'il est possible de détecter des changements de concentration issus de processus continus et lents tel que la minéralisation de l'azote organique ou la conversion des ions ammonium en ions nitrates (nitrification). Par exemple, entre $t = 8$ jours et $t = 14$ jours, une variation linéaire de la tension de seuil du pNH_4 -ISFET peut être observée (3,2 mV/jour, Figure 113). Il est cependant difficile d'établir si cette variation est uniquement liée à la dérive intrinsèque du capteur ou si elle reflète un véritable changement de concentration dans le sol. Dans cet exemple, le signal évolue dans le sens d'une diminution de concentration en ions ammonium qui pourrait être causée par la nitrification favorisée par une température ($\approx 20^\circ\text{C}$) et une humidité du sol adaptées. Les analyses futures des solutions de sol prélevées via les lysimètres fourniront des indices pour tenter de résoudre cette question. Ces analyses devraient également nous aider à passer d'une approche essentiellement qualitative à une analyse quantitative des concentrations du sol. Néanmoins, le développement d'un algorithme de traitement des données brutes devra très probablement se baser sur les calculs des variations temporelles à une profondeur donnée et des différences de variations entre les deux profondeurs d'analyse. Comme cette expérience l'a déjà montré, les données devront donc être recueillies avec une fréquence de mesure suffisamment grande pour pouvoir dégager des tendances malgré la dérive intrinsèque des capteurs.

La caractérisation du système d'analyse multi-capteur n'en est qu'à ses débuts. Il faudra encore, entre autres, étudier la reproductibilité des résultats obtenus avec le banc d'essai, allonger la durée de l'expérience à plusieurs mois, travailler avec différentes textures de sol puis finalement se confronter à l'analyse sur des parcelles réelles.

Conclusion

Dans ce dernier chapitre, nous avons validé le concept d'une mesure *in situ* avec les microcapteurs ISFET simplement insérés dans le sol. Nous avons d'abord démontré que les pH-ISFET peuvent fonctionner dans l'ensemble des conditions d'humidité et de texture des sols cultivés, dès lors qu'un contact satisfaisant est établi entre le sol et le capteur. Cette méthode de mesure *in situ* a permis de déterminer le pH de trois sols argilo-limoneux avec une précision satisfaisante par rapport à la méthode standard. Les pNH_4 -ISFET ont été utilisés avec succès pour distinguer le contenu en ammonium de deux sols caractérisés par une activité des micro-organismes différente. De même, nous avons réussi à évaluer avec une précision acceptable la disponibilité des ions nitrates du sol grâce au pNO_3 -ISFET. Au final, ces premiers résultats témoignent des possibilités offertes par la technologie ISFET pour l'analyse à court terme directement sur site, sans passer par une étape d'extraction des nutriments du sol et avec le bénéfice d'obtenir un résultat quasi-immédiat.

La durée de vie des microcapteurs ISFET est un élément essentiel pour le succès du projet INNOPERF-Blé dont l'ambition est d'effectuer le suivi du cycle de l'azote du sol sur une période s'étalant approximativement de décembre à juin. Les caractérisations menées sur les pH-ISFET et pNH_4 -ISFET ont montré qu'ils possèdent déjà une durée de vie suffisante pour l'analyse du sol à long terme en conditions *in situ*. Malheureusement, nous ne sommes pas

encore capables d'affirmer que celle des pNO_3 -ISFET est supérieure à quelques semaines. Ce point crucial devra être éclairci par la suite.

Le suivi en continu et sur le long terme des nutriments azotés et du pH du sol ne serait pas non plus possible sans une intégration des microcapteurs au sein d'un système d'analyse autonome et communicant. Grâce à la collaboration avec notre partenaire Sirea, nous sommes parvenus à concevoir un système permettant l'analyse du sol en assurant l'alimentation électrique des capteurs durant plusieurs mois ainsi que l'envoi des données de mesures sur un serveur. Nous avons également identifié une électrode de référence commerciale qui réunit l'ensemble des propriétés essentielles à la fiabilité du système.

La mise en place de ce système dans le sol est une étape critique qui doit être effectuée de manière à assurer le contact adéquat de l'ensemble des microcapteurs avec le sol. Nous avons élaboré un protocole de mise en place du système qui a permis d'améliorer le nombre d'ISFET fonctionnant correctement mais ce nombre reste malheureusement inférieur à 100%. Ce problème devra absolument être résolu à l'avenir. De plus, nous avons constaté que la réalisation d'un trou de 10 cm de diamètre et 60 cm de profondeur est une opération relativement complexe, même en s'aidant d'une tarière thermique. Il pourrait donc être judicieux de réduire les dimensions du système à un diamètre équivalent inférieur à 10 cm qui permettrait d'utiliser une tarière manuelle et minimiserait le volume de sol perturbé.

Enfin, nous avons conçu un banc d'essai pour pouvoir caractériser notre système d'analyse multi-capteur en maîtrisant les paramètres qui influencent la réponse des ISFET. Auparavant, nous avons montré que la technologie ISFET est adaptée à la détermination ponctuelle sur site de la teneur en azote minéral du sol, à condition d'effectuer préalablement un étalonnage du microcapteur. La première caractérisation du système dans le banc d'essai a montré que cette technologie est également capable d'évaluer qualitativement des variations temporelles de la teneur en azote du sol à plus long terme. Après avoir résolu le problème de mise en place du système dans le sol, nous espérons pouvoir détecter les flux verticaux des ions nitrates et ainsi prévenir leur lessivage.

A ce jour, notre étude de la technologie ISFET n'a pas mis en avant de problématique qui semble absolument bloquante pour la poursuite du projet INNOPERF-Blé et la réalisation de ses objectifs. De nombreuses perspectives et voies d'améliorations s'ouvrent à nous. Elles seront présentées dans la conclusion générale de ce manuscrit.

Bibliographie

- [1] P. Duchaufour, *Introduction à la science du sol: sol, végétation, environnement*. Dunod, 2001.
- [2] "NF X31-107 - Qualité du sol - Détermination de la distribution granulométrique des particules du sol - Méthode à la pipette." [Online]. Available: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-x31-107/qualite-du-sol-determination-de-la-distribution-granulometrique-des-particules-du-sol-methode-a-la-pipette/article/721991/fa124875>. [Accessed: 03-Dec-2017].
- [3] A. Samouëlian, I. Cousin, A. Tabbagh, A. Bruand, and G. Richard, "Electrical resistivity survey in soil science: a review," *Soil Tillage Res.*, vol. 83, no. 2, pp. 173–193, Sep. 2005.
- [4] "ISO 10390:2005 - Qualité du sol -- Détermination du pH." [Online]. Available: <https://www.iso.org/fr/standard/40879.html>. [Accessed: 03-Dec-2017].
- [5] H. Matthiesen, "In situ measurement of soil pH," *J. Archaeol. Sci.*, vol. 31, no. 10, pp. 1373–1381, Oct. 2004.
- [6] "Bougies poreuses Ø31mm ou Ø63mm - SPS 200 series." [Online]. Available: <http://agronomie.sdec-france.com/lysimetres-de-sol-ceramiques-poreuses.html>. [Accessed: 20-Dec-2017].
- [7] E. P. Honig, "Theory and measurement of the suspension effect," *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, vol. 37, no. 1, pp. 249–266, Jun. 1972.
- [8] S. F. Oman, M. F. Camões, K. J. Powell, R. Rajagopalan, and P. Spitzer, "Guidelines for potentiometric measurements in suspensions Part A. The suspension effect (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 79, no. 1, pp. 67–79, 2009.
- [9] I. Humenyuk, "Développement des microcapteurs chimiques CHEMFETs pour l'analyse de l'eau," phdthesis, INSA de Toulouse, 2005.
- [10] Z. Ahmad, *Principles of Corrosion Engineering and Corrosion Control*. Elsevier, 2006.
- [11] "Root Mucilage - Plant Science for Beginners." [Online]. Available: <https://sites.google.com/site/botanyforbeginners/root-mucilage>. [Accessed: 18-Dec-2017].

Conclusion générale

Nos travaux se sont focalisés sur le développement et l'intégration de microcapteurs chimiques pour l'analyse *in situ* du pH et de l'azote minéral du sol. Nous avons proposé un système d'analyse permettant d'évaluer la variabilité locale et temporelle de la parcelle afin d'optimiser la fertilisation azotée en tenant compte des besoins réels du sol et des plantes. Notre approche a été fondée sur une analyse directe de la concentration en ions nitrates et ammonium du sol. Elle se distingue des outils d'aide à la décision (OAD) déjà commercialisés qui se basent généralement sur une évaluation indirecte du contenu en azote de la plante. En particulier, cette approche semble plus adaptée à la prévention du lessivage des ions nitrates dont les conséquences sont néfastes pour l'environnement.

Nos travaux se sont appuyés sur la technologie de microcapteur ISFET. Cette technologie présente en effet de nombreux avantages en vue de l'intégration dans un système dédié à l'analyse sur site : faible coût, rapidité de réponse, solidité, faibles dimensions et faible besoin de maintenance. Initialement dédiée à l'analyse du pH en phase liquide, elle peut être adaptée à la détection des ions ammonium NH_4^+ et nitrates NO_3^- grâce à l'intégration de couches polymériques chimiquement sensibles.

Nous avons tout d'abord fabriqué une puce multi-capteur en silicium. Quelques fonctions supplémentaires ont été intégrées en plus de la structure ISFET classique : un MOSFET pour qualifier la qualité du procédé de fabrication et pouvant servir de capteur de température, une électrode de référence miniature, ainsi que deux électrodes planaires en platine pour la mesure de conductivité et du potentiel « redox ». L'objectif était de rendre notre composant le plus polyvalent possible pour s'adapter aux évolutions possibles du projet INNOPERF-Blé.

Nous avons comparé deux matériaux sensibles aux pH : le nitrure de silicium Si_3N_4 déposé par LPCVD, dont les propriétés sont maîtrisées et connues depuis de nombreuses années au LAAS-CNRS, et l'alumine Al_2O_3 obtenue par la technique de dépôt en couches atomiques ALD. Les caractérisations *in vitro* de ces deux matériaux ont montré que l'alumine possède des propriétés de détection supérieures à celle du nitrure de silicium en termes de sensibilité (58-59 mV/pH contre 48-52 mV/pH) et de sélectivité aux ions alcalins. Néanmoins, un manque de recul concernant la durée de vie des pH-ISFET Al_2O_3 nous a finalement poussés à conserver le nitrure de silicium pour les capteurs pH du projet INNOPERF-Blé.

Le procédé d'intégration des membranes ionosensibles en matrice fluoropolysiloxane (FPSX) a montré une répétabilité satisfaisante malgré le contrôle manuel de la micro-seringue utilisée lors des dépôts. Les formulations de membranes sensibles aux ions ammonium NH_4^+ et nitrates NO_3^- ont été établies grâce à une étude bibliographique. Les caractérisations *in vitro* des pNH_4 -ISFET et pNO_3 -ISFET en matrice FPSX ont démontré la bonne adéquation des propriétés de détection de ces microcapteurs avec les gammes de concentrations ioniques des sols cultivés. Nos pNH_4 -ISFET et pNO_3 -ISFET présentent des sensibilités quasi-nernstiennes de valeurs respectives 59,0 mV/ pNH_4 et 56,5 mV/ pNO_3 dans les gammes de détection [2,5 - 5,0] et [1,5 - 5,0] respectivement. Un soin particulier a été accordé à l'étude de la sélectivité de ces microcapteurs qui, une fois dans le sol, seront inévitablement confrontés à la présence de très nombreuses autres espèces ioniques. Les coefficients de sélectivité de nos pNH_4 -ISFET sont excellents, à l'exception du cas de l'ion potassium K^+ (coefficient de sélectivité: -1,2). L'absence

d'alternative commerciale à la nonactine, l'ionophore de l'ammonium utilisé dans nos membranes, ne nous a malheureusement pas permis de corriger ce point. Le manque de sélectivité est d'ailleurs l'un des principaux éléments qui freinent la commercialisation en masse des capteurs à membrane ionosensible. La solution à ce problème pourra venir de la synthèse de nouveaux ionophores plus sélectifs par les chimistes. Dans le cadre de la poursuite du projet, nous devons évaluer précisément si ce manque de sélectivité constitue un verrou pour la détection de l'ion ammonium dans le sol. Dans le cas du pNO₃-ISFET, le principal ion interférent est l'ion chlorure Cl⁻. Un coefficient de sélectivité satisfaisant de -2,5 a finalement été obtenu suite à un travail d'optimisation de la formulation de la membrane ionosensible. Pour tous les autres ions interférents étudiés, les coefficients de sélectivité du pNO₃-ISFET sont inférieurs à -3,2.

En parallèle de ces travaux, la question de l'électrode de référence a été traitée à travers deux axes principaux. Premièrement, nous avons proposé une méthode de fabrication d'une électrode de référence miniature tout solide en vue de son intégration sur notre puce multi-capteur en silicium. Son insensibilité aux ions chlorures Cl⁻, son faible coût et sa bonne stabilité temporelle laissent envisager une utilisation pour l'analyse ponctuelle sur site. Dans un second temps, nous avons identifié une électrode de référence commerciale adaptée à l'analyse du sol et fiable dans le temps. Elle équipera notre premier prototype de système d'analyse du sol.

Suite aux bons résultats des caractérisations *in vitro*, nous avons pu confronter les microcapteurs à la mesure *in situ* dans le sol. Bien que la technologie ISFET ait été initialement dédiée à l'analyse en phase « purement » liquide, nous avons vérifié que son fonctionnement est correct dans l'ensemble des conditions d'humidité des sols cultivés à condition qu'un contact adéquat soit établi entre le sol et le capteur. Nous avons ainsi pu déterminer le pH de sols argilo-limoneux avec une précision satisfaisante. Des résultats similaires ont été obtenus avec nos pNO₃-ISFET et pNH₄-ISFET, soulignant le potentiel de la technologie ISFET pour l'analyse du sol sur site à court terme. Nous avons notamment pu distinguer le contenu en ammonium de deux sols caractérisés par une activité des micro-organismes différente. La durée de vie de nos pH-ISFET et pNH₄-ISFET est d'au moins six mois dans le sol et autorise donc une surveillance du sol pendant toutes les phases de croissance du blé. Cependant, la durée de vie des pNO₃-ISFET n'a pas été évaluée précisément. Il s'agira d'un des principaux points à étudier dans le cadre de la poursuite du projet.

Les microcapteurs ISFET ont été intégrés dans un système autonome et communicant permettant l'analyse du pH et de la concentration en ions ammonium et nitrates à 15 cm et 45 cm de profondeur. La mise en place du système dans le sol a fait apparaître des difficultés à assurer le contact adéquat des 6 ISFET avec le sol. L'établissement d'un protocole de mise en place a permis d'améliorer ce point sans toutefois le corriger totalement. Le test de notre système en conditions contrôlées s'est montré prometteur. Pendant quinze jours, le système a été soumis à une fréquence de réveil très soutenue et les ISFET sont parvenus à détecter les variations de concentrations ioniques du sol suite aux apports de fertilisants azotés ou d'eau.

De nombreuses perspectives et axes de travail s'ouvrent au terme des premiers résultats obtenus durant cette thèse.

Dans les jours qui suivent la rédaction de ce manuscrit, un système sera implanté sur une parcelle réelle de blé dur. Nous pourrons analyser la réponse du système en fonction des

événements climatiques et des apports d'engrais par l'agriculteur et la comparer aux tests effectués avec le banc d'essai.

En parallèle de cette étude, nous devons identifier une solution pour améliorer le contact sol-capteur lors de la mise en place du système sur la parcelle. Comme cela a déjà été présenté, une première piste serait d'introduire un matériau hydrophile à l'interface sol-capteur. La solution liquide du sol serait absorbée par ce matériau et drainée vers le microcapteur. De plus, en positionnant un disque d'un centimètre carré environ d'un tel matériau au centre de la zone sensible de l'ISFET, la surface d'échange ionique entre le sol et le microcapteur augmenterait. La mesure de l'ISFET serait cette fois représentative d'une « moyenne » locale de la concentration ionique du sol. On s'affranchirait alors de la variabilité spatiale du sol causée par la présence de structures micrométriques et millimétriques (agrégats, pores). Une solution alternative, inspirée des lysimètres, serait de placer les ISFET dans un réservoir initialement rempli d'eau ultrapure et séparé du sol par des parois microporeuses en céramique ou en acier inoxydable. Les ions de la solution du sol diffuseraient naturellement à travers les pores de la paroi. Au bout d'un certain temps, la solution interne du réservoir serait à l'équilibre avec la solution du sol. Cette méthode présente plusieurs avantages. Là encore, la surface d'échange avec le sol serait augmentée par rapport à la situation actuelle où l'ISFET est à nu et il en découlerait une meilleure prise en compte de la variabilité du sol. De plus, l'ISFET se trouverait cette fois dans un milieu d'étude complètement liquide. En revanche, la réactivité du système serait diminuée en raison des constantes de temps associées à la diffusion des espèces ioniques à travers la paroi poreuse. Le système, dans sa version actuelle, renvoie des données représentatives de la concentration ionique « instantanée » du sol. Il faudrait probablement, avec l'approche du réservoir poreux, attendre plusieurs jours pour atteindre l'équilibre, en particulier si l'humidité du sol est faible. Si une telle méthode était retenue, il se poserait également la question de l'intégration de l'électrode de référence.

Une fois la problématique du contact sol-capteur résolue, nous devons vérifier qu'il est possible de détecter le lessivage des ions nitrates par comparaison des signaux des ISFET positionnés à -15 cm et -45 cm de profondeur. Un travail approfondi d'apprentissage du système sera nécessaire pour interpréter correctement les variations des signaux et les implémenter dans un algorithme de traitement. Ce travail devra être fondé sur une étude de répétabilité où il sera observé si le système répond de manière identique dans des conditions de sol similaires (humidité, texture, concentrations ioniques...). Comme nous l'avons déjà évoqué, la question de la dérive intrinsèque de l'ISFET devra être traitée au regard des processus de transformation lents de l'azote du sol (minéralisation, nitrification). Pour mener ce travail, nous devons nous appuyer sur un étalonnage périodique du système rendu possible par l'analyse de prélèvements de solutions du sol par des lysimètres.

Après validation de toutes ces étapes, des améliorations mécaniques du conditionnement ou "packaging" du système devront être réalisées en vue d'une potentielle commercialisation. En plus des réductions de dimensions proposées à la fin du chapitre 4, une intégration monobloc de l'ensemble des fonctions (alimentation, capteurs, communication) contribuerait également à faciliter la mise en place sur la parcelle. Par ailleurs, la communication des données issues des capteurs par l'intermédiaire de modules LoRa ou SigFox semble également être une perspective pertinente à l'heure où l'agriculture « connectée » se développe fortement. Par rapport à la transmission GPRS, ces technologies offrent une couverture longue portée et une faible consommation d'énergie. Ce sont deux points importants dans le cadre de l'agriculture où les

capteurs sont souvent positionnés sur des parcelles isolées et requièrent une longue autonomie sur batterie.

Notre objectif final est de déployer un réseau de systèmes d'analyse autonomes et communicants sur la parcelle. A plus long terme, nous devons donc déterminer la densité spatiale minimale de systèmes à implanter pour que les analyses soient suffisamment représentatives de la variabilité du sol sur la parcelle. De nombreux aspects économiques entrent alors en considération comme le coût unitaire du système et le coût de l'engrais économisé grâce à l'OAD.

Connaissant les défauts de la technologie ISFET (dérive temporelle, sélectivité), l'exactitude de la réponse du système pourrait être évaluée en s'appuyant sur des données générées par d'autres capteurs ou système d'information. Par exemple, un relevé quotidien de la pluviométrie fourni par la station météo la plus proche pourrait aider à confirmer/infirmier l'annonce par le système d'une variation brusque de la concentration en ions nitrates. De même, la prise en compte de l'historique de fertilisation de la parcelle dans le traitement automatique des données permettra, par exemple, de ne pas conclure à une hausse de concentration en ions ammonium quand une fertilisation potassique vient d'être réalisée. Les données météorologiques pourraient également servir à moduler la fréquence de réveil du système pour optimiser sa consommation énergétique. Lorsqu'il pleut, la fréquence de réveil pourrait être augmentée pour collecter momentanément plus de données et améliorer le suivi d'un probable lessivage des ions nitrates. En revanche, la minéralisation sera faible et lente en cas de sol sec et un seul réveil par jour pourrait alors être suffisant.



a



b



c

Figure 116 : (a), une ferme verticale utilisant le système de culture VertiCrop™. Tiré de [1]. (b), développement du projet d'agriculture urbaine « Sole Food Street Farms » à Vancouver (Canada). Tiré de [2]. (c), Représentation du robot agricole imaginé par Simon Blackmore. Tiré de [3]

L'ensemble de ces travaux contribueront, nous l'espérons, à accroître notre connaissance des sols et à aider les agriculteurs à développer des pratiques agricoles efficaces et plus respectueuses de l'environnement. Les avantages de la technologie ISFET pourraient bénéficier à de nombreux autres projets agricoles innovants. L'agriculture urbaine est en plein essor. De multiples idées naissent et se concrétisent, souvent grâce à l'action de groupes de citoyens. Ces projets prennent des formes extrêmement diverses (Figure 116a et b) : jardins partagés, cultures maraichères sur les toitures d'immeubles, cultures hydroponiques verticales.... Les ISFET pourraient combler de nouveaux besoins comme, entre autres, le suivi des concentrations de solutions nutritives utilisées en hydroponie. Par ailleurs, les agriculteurs de demain seront assurément assistés par des robots dans la réalisation des tâches les plus pénibles ou chronophages. Simon Blackmore propose l'idée d'une flotte de petits robots ultralégers travaillant en autonomie pour remplacer les machines agricoles actuelles dont le poids, de plus en plus important, entraîne des problèmes de compaction du sol [4]. Les faibles dimensions de ces robots les autoriseraient à fertiliser ou désherber au cas par cas à l'échelle de la plante individuelle (Figure 116c). De plus, leur autonomie et facilité de déplacement en tout point de la parcelle permettraient d'acquérir des données de mesure avec une excellente résolution spatiale. Cette approche innovante nécessite de nouveaux capteurs embarqués sur les robots pour évaluer la variabilité des sols et des plantes. L'ISFET pourrait ainsi équiper ces futurs robots pour les aider à décider du niveau de fertilisation à appliquer.

Bibliographie

- [1] "Vertical Farming | VertiCrop." [Online]. Available: <http://www.verticrop.com/>. [Accessed: 19-Jan-2018].
- [2] "Canada: Vancouver's Sole Food Street Farms Takes On Poverty With Urban Agriculture — City Farmer News." .
- [3] "A Farm Robot in Your Future." [Online]. Available: <http://www.farmfutures.com/blogs-farm-robot-future-3175>. [Accessed: 19-Jan-2018].
- [4] S. Blackmore, "Towards robotic agriculture," presented at the Autonomous Air and Ground Sensing Systems for Agricultural Optimization and Phenotyping, 2016, vol. 9866, p. 986603.

Annexes

Titre : Conception d'un système d'analyse multi-capteur ISFET pour la surveillance *in situ* de l'azote minéral. Application à la culture du blé dur

Résumé :

L'usage excessif de fertilisants azotés dans les pratiques agricoles modernes est préoccupant car il aboutit, entre autres, à la pollution des nappes phréatiques et à l'eutrophisation des eaux douces et marines. L'analyse du sol peut faciliter la mise en place de nouvelles pratiques agricoles qui tiennent davantage compte des variations temporelles et locales du sol et des plantes. Ces travaux visent donc le développement d'un système d'analyse *in situ*, autonome et communicant pour le suivi en temps réel des teneurs en azote minéral du sol.

Notre système est basé sur la technologie de microcapteur chimique en silicium Ion-Sensitive Field Effect Transistor (ISFET). Une première phase de son développement a été dédiée à la fabrication de microcapteurs génériques pH-ISFET. La problématique de la détermination du pH du sol en insérant les pH-ISFET directement dans le sol a été considérée. Les résultats obtenus par cette méthode *in situ* ont été comparés avec la méthode standard et nous avons examiné l'influence de paramètres propres au sol (humidité, texture, pH) et à l'ISFET (durée de vie, dérive temporelle). Dans un second temps, des puces pNH_4 -ISFET et pNO_3 -ISFET ont été obtenues en fonctionnalisant les puces génériques pH-ISFET grâce à l'intégration de membranes ionosensibles. La composition de ces membranes a été optimisée jusqu'à obtention de propriétés de détection (sensibilité, sélectivité, stabilité...) en adéquation avec les teneurs en ions ammonium et nitrates typiques des sols cultivés. Des premières caractérisations en conditions *in situ* ont alors été effectuées.

Finalement, les capteurs ont été intégrés à un système permettant l'insertion des capteurs dans le sol, leur protection, l'alimentation électrique par batterie et la communication à distance des données de mesure. De premiers résultats, prometteurs, ont été obtenus.

Mots-clés : ISFET ; agriculture ; analyse *in situ* du sol ; membranes ionosensibles ; intégration ; capteurs autonomes communicants ; cycle de l'azote ; microfabrication

Title: Design of an ISFET-based multi-sensor analysis system for *in situ* monitoring of mineral nitrogen. Application to durum wheat

Summary:

Excessive use of nitrogen fertilizers in modern agricultural practices is a concern as it leads to groundwater pollution and eutrophication of fresh and marine waters. Soil testing can enable the introduction of new agricultural practices that take more into account temporal and local variations of soil and plants. This work therefore aims at the development of an *in situ*, autonomous and communicating analysis system for real-time monitoring of the mineral nitrogen contents of soils.

Our system is based on the Ion-Sensitive Field Effect Transistor (ISFET) microsensor technology. A first step of its development was dedicated to the fabrication of generic pH-ISFET microsensors. The problem of determining soil pH by inserting pH-ISFETs directly into the soil was considered. Results obtained by this *in situ* method were compared with the standard method and we examined the influence of soil (moisture, texture, pH) and ISFET parameters (lifetime, time drift). In a second step, pNH₄-ISFET and pNO₃-ISFET chips were obtained by functionalizing the generic pH-ISFET chips with ionosensitive membranes. The composition of these membranes has been optimized until detection properties (sensitivity, selectivity, stability, etc.) were in good accordance with the ammonium and nitrate ion contents of cultivated soils. Characterizations under *in situ* conditions were then carried out.

Finally, the integration in the ground, the protection, the power supply and the remote communication of the sensors were made possible by the integration in a dedicated system. We obtained promising results.

Keywords: ISFET ; agriculture ; *in situ* soil analysis ; ionosensitive membranes ; integration ; autonomous and communicating sensors ; nitrogen cycle ; microfabrication