



**HAL**  
open science

# Fabrication de nano-capteurs électroniques pour la détection de bactéries pathogènes

Yousra Benserhir

► **To cite this version:**

Yousra Benserhir. Fabrication de nano-capteurs électroniques pour la détection de bactéries pathogènes. Electronique. Université de Rennes, 2022. Français. NNT: 2022REN1S047. tel-03907662

**HAL Id: tel-03907662**

**<https://theses.hal.science/tel-03907662>**

Submitted on 20 Dec 2022

**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.

ANNÉE 2022



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

*Mention : Electronique*

**Ecole doctorale MathStic**

présentée par

**Yousra Benserhir**

Préparée à l'IETR UMR CNRS 6164

Institut d'Electronique et des Technologies du numéRique de Rennes

UFR Informatique-Electronique

---

**Fabrication de nano-  
capteurs électroniques à  
base de nanofils de  
silicium pour la détection  
de bactéries pathogènes**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 08/07/2022**

devant le jury composé de :

**ABDELHAMID Errachid,**

Professeur, Institut des Sciences Analytiques (ISA),  
Université Claude Bernard Lyon 1. Rapporteur

**VARENNE Christelle**

Maître de conférences, HDR, Institut Pascal, Université  
Clermont Auvergne. Rapporteur

**HALIL Hamida**

Maître de conférences, HDR, IMS, Université de Bordeaux.  
Examinatrice

**GIRARD Aurélie**

Maître de conférences, IMN, Université de Nantes.  
Examinatrice

**GENESTE Florence**

Directrice de recherche, ISCR, Université de Rennes 1.  
Examinatrice

**PICHON Laurent**

Professeur, IETR, Université de Rennes 1. Examineur.

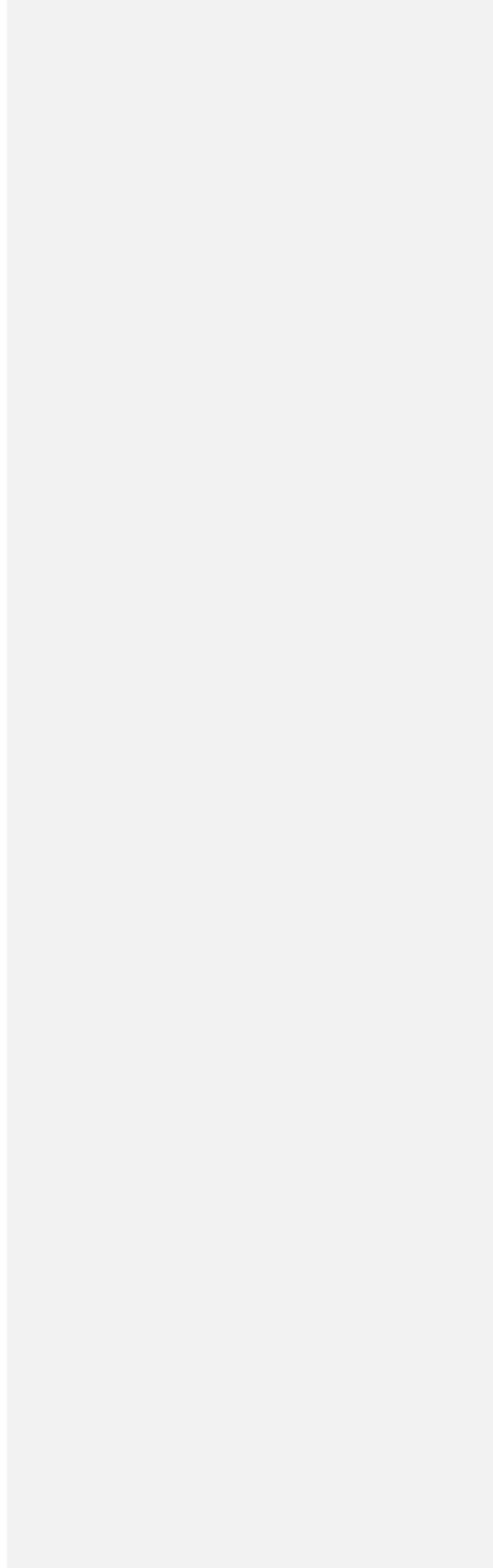
**JOLIVET-GOUGEON Anne**

Professeur, NuMeCan, Université de Rennes 1. Co-directrice  
de thèse

**SALAÛN Anne-Claire**

Maître de conférences HDR, IETR, Université de Rennes 1.  
Co-directrice de thèse.

**ANNÉE 2022**



INTRODUCTION GENERALE.....	17
<b>CHAPITRE 1.....</b>	<b>21</b>
<b>PRESENTATION DE LA BACTERIE <i>E-COLI</i> ET ETAT DE L'ART DES METHODES DE DETECTION .....</b>	<b>21</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>23</b>
<b>II. BACTERIES GRAM NEGATIF, ET GRAM POSITIF.....</b>	<b>24</b>
II.1. BACTERIE GRAM NEGATIF, PAROI CELLULAIRE ET STRUCTURE DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE	24
II.2. BACTERIE GRAM POSITIF, PAROI CELLULAIRE ET STRUCTURE DE L'ENVELOPPE CELLULAIRE	24
<b>III. LES BACTERIES UTILISEES .....</b>	<b>25</b>
III.1. <i>E. COLI</i> ET ANTI-LPS <i>E. COLI</i> .....	25
III.2 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> .....	26
<b>IV. LES BIOCAPTEURS .....</b>	<b>27</b>
IV.1 HISTORIQUE .....	27
IV.2 DEFINITION DU BIOCAPTEUR .....	28
IV.3 DESCRIPTION DU BIOCAPTEUR .....	28
IV.2.1 Le biorécepteur .....	29
a) Différentes techniques d'immobilisation des biomolécules .....	30
b) Immobilisation par greffage covalent .....	32
IV.2.2 Le transducteur .....	32
<b>V. METHODES CONVENTIONNELLES POUR LA DETECTION DES AGENTS PATHOGENES.....</b>	<b>33</b>
V.1 METHODES STANDARD POUR LE DIAGNOSTIC IN VITRO .....	33
V.2 BIOCAPTEUR OPTIQUE .....	35
V.3 BIOCAPTEURS ELECTROCHIMIQUES .....	37
V.3.1 Biocapteurs ampérométriques.....	37
V.3.2 Biocapteurs potentiométriques .....	38
V.3.3 Détection par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) .....	40
V.4 BIOCAPTEUR PIEZOELECTRIQUE.....	41
<b>VI. NANOMATERIAUX ET NANO-OBJETS POUR LA DETECTION DES <i>E. COLI</i> .....</b>	<b>42</b>
VI.1 BIOCAPTEURS ELECTROCHIMIQUES A BASE DE NANOPARTICULES.....	44

## ANNÉE 2022

VI.2 BIOCAPTEURS OPTIQUES A BASE DE NANOPARTICULES.....	45
VI.3 BIOCAPTEURS MAGNETIQUES A BASE DE NANOPARTICULES .....	47
VI.4 BIOCAPTEURS GRAVIMETRIQUES A BASE DE NANOPARTICULES .....	48
VI.5 BIOCAPTEURS A BASE DE NANOTUBES DE CARBONE .....	49
VI.6 BIOCAPTEURS A BASE DE GRAPHENE.....	51
VI.7 BIOCAPTEURS A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM .....	53
<b>VII. RESUME DES DIFFERENTES TECHNIQUES POUR LA DETECTION D'E. COLI.....</b>	<b>54</b>
<b>VIII. CONCLUSION.....</b>	<b>56</b>
<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>57</b>
<b>SYNTHESE ET FABRICATION DE DISPOSITIFS A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM.....</b>	<b>57</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>59</b>
<b>II. TECHNIQUE DE SYNTHESE DES NANOFILS DE SILICIUM .....</b>	<b>60</b>
II.1 SYNTHESSES PAR LA METHODE « BOTTOM-UP » .....	60
II.1.1 Méthode vapeur- liquide-solide (VLS).....	61
II.1.2 Méthode solide liquide solide (SLS).....	63
II.1.3 Matrices poreuses .....	65
II.2 SYNTHESSES PAR LA METHODE « TOP-DOWN » .....	66
II.2.1 La lithographie électronique.....	67
II.2.2 Elaboration par la méthode des espaceurs en lithographie optique .....	67
II.2.3 La nano impression .....	68
<b>III. DISPOSITIF A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM.....</b>	<b>70</b>
III.1 LES TRANSISTORS A BASE DE NANOFILS .....	70
III.1.1 Les transistors verticaux .....	71
III.2 CAPACITE A HAUTE DENSITE D'INTEGRATION .....	73
III.3 LES CELLULES SOLAIRES.....	74
III.4 ELECTRONIQUE NUMERIQUE : INVERSEUR CMOS.....	75
III.5 LES CAPTEURS CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM .....	76
III.5.1 Les capteurs de pH .....	77
III.5.2 Capteur de gaz .....	78
III.5.3 Biocapteur à base de nanofils de silicium .....	79
<b>IV. CONCLUSION .....</b>	<b>81</b>

<b>CHAPITRE 3 :</b> .....	<b>83</b>
<b>FABRICATION DES BIOCAPTEURS A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM.</b> .....	<b>83</b>
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>84</b>
<b>II. METHODES EXPERIMENTALES</b> .....	<b>84</b>
II.1 DEVELOPPEMENT DES NOUVEAUX MASQUES .....	84
II.2 FABRICATION DES NANOCAPTEURS EN SALLE BLANCHE .....	87
II.2.1 Préparation des substrats .....	87
a) Dépôt de la couche d'oxyde de Silicium par « oxydation sèche » .....	87
II.2.2 Création des peignes interdigités.....	89
a) Dépôt d'or pour la croissance des nanofils .....	90
II.2.3 Croissance des nanofils de silicium par la méthode « Vapeur liquide solide » .....	90
II.2.4 Caractérisation électrique des structures interdigitées .....	91
<b>III. MODELE ELECTRIQUE</b> .....	<b>91</b>
III.1 AVANT DEPOT DE BACTERIES .....	91
III.2 APRES DEPOT DE BACTERIES .....	93
<b>IV. FONCTIONNALISATION PAR APTES/GLUTARALDEHYDE</b> .....	<b>93</b>
IV.1 FONCTIONNALISATION DES SURFACES DE SiO <sub>2</sub> .....	93
IV.2 CARACTERISATION DES SURFACES DE SiO <sub>2</sub> APRES FONCTIONNALISATION PAR L'APTES ET LE GLUTARALDEHYDE.....	95
IV.2.1 Caractérisation XPS .....	95
a) Résultats XPS .....	95
b) Résultats MEB .....	97
<b>V. MATERIELS ET METHODES BIOLOGIQUES POUR LA DETECTION D'<i>E. COLI</i></b> .....	<b>100</b>
V.1 SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES .....	100
V.2 ANTICORPS UTILISES .....	100
V.3 MILIEUX DE CULTURES, ET REACTIFS UTILISES .....	101
<b>VI. METHODES DE DETECTIONS DES BACTERIES</b> .....	<b>102</b>
VI.1 METHODE DE DETECTION PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE MEB .....	102
VI.2 METHODE DE DETECTION DES BACTERIES PAR FLUORESCENCE.....	103
VI.3 PROTOCOLES DE DETECTION PAR LA METHODE « ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY » (ELISA).....	106
VI.4 MESURES ELECTRIQUES .....	107

<b>VII. CONCLUSION</b> .....	<b>110</b>
<b>CHAPITRE 4</b> .....	<b>111</b>
<b>RESULTATS ET ETUDES DE LA DETECTION ELECTRIQUE DES BACTERIES</b> .....	<b>111</b>
<b>I. INTRODUCTION</b> : .....	<b>112</b>
<b>II. RESULTATS ELECTRIQUES EXPLORATOIRES PREALABLES A CES TRAVAUX</b> .....	<b>112</b>
<b>III. VALIDATION DU PROTOCOLE DE FONCTIONNALISATION ET DE DETECTION PAR MEB ET PAR FLUORESCENCE</b> .....	<b>115</b>
III.1 ÉTUDE DE FLUORESCENCE EN FONCTION APRES LA FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE ET EN FONCTION DE LA PRESENCE D'ANTICORPS. ....	115
III.2 ÉTUDE DE LA FLUORESCENCE EN FONCTION DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS BACTERIENNES. ....	117
<b>IV. CARACTERISATIONS ELECTRIQUES</b> .....	<b>119</b>
IV.1 CARACTERISATION ELECTRIQUE APRES LA CROISSANCE DES NANOFILS .....	119
IV.2 CARACTERISATION ELECTRIQUE APRES LE GREFFAGE DES ANTICORPS <i>ANTI LPS E. COLI</i> SUR LES NANOFILS .....	120
<b>V. DETECTION ELECTRIQUE DE LA BACTERIE <i>E. COLI</i></b> .....	<b>121</b>
V.1 INFLUENCE DE LA PRESENCE DES ANTICORPS ANTI- <i>E. COLI LPS</i> SUR LA DETECTION ELECTRIQUE DES <i>E. COLI</i> .....	121
V.2 ÉTUDE DE LA VARIATION DE COURANT EN FONCTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE DEPOSEE. ....	123
V.3 ÉTUDE DE LA SENSIBILITE DU BIOCAPTEUR AUX BACTERIES <i>E-COLI</i> .....	124
<b>VI. DETECTION DE LA BACTERIE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i></b> .....	<b>126</b>
VI.1 DETECTION ELECTRIQUE DE <i>S. AUREUS</i> .....	127
VI.2 VALIDATION DU PROTOCOLE DE FONCTIONNALISATION ET DE DETECTION PAR FLUORESCENCE .....	129
VI.3 CARACTERISTIQUES ELECTRIQUES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE DE <i>S. AUREUS</i> .....	130
VI.4 ÉTUDE DE LA SPECIFICITE DE LA DETECTION EN UTILISATION DES ANTICORPS <i>ANTI LPS E. COLI</i> AVEC DES BACTERIES <i>S. AUREUS</i> .....	132
<b>VII. DISCUSSION</b> .....	<b>134</b>
<b>VIII. CONCLUSION</b> .....	<b>135</b>

**ANNÉE 2022**

**CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....137**

**ANNÉE 2022**

**LISTE DES FIGURES**

FIGURE 1: ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DE LA PAROI CELLULAIRE D'UNE BACTERIE GRAM NEGATIF.....	24
FIGURE 2: ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DE LA PAROI CELLULAIRE D'UNE BACTERIE GRAM POSITIF. ....	25
FIGURE 3: ILLUSTRATION INDIQUANT LES ELEMENTS DE LA BACTERIE <i>E. COLI</i> . (HTTP://WWW.ECL-LAB.CA) ....	26
FIGURE 4 : ILLUSTRATION INDIQUANT LES ELEMENTS DE LA BACTERIE <i>S. AUREUS</i> [2].....	27
FIGURE 5 : PRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN BIOCAPTEUR. ....	28
FIGURE 6: DIFFERENTS TYPES DE BIORECEPTEURS UTILISES POUR LA DETECTION BIOLOGIQUE. [7].....	30
FIGURE 7: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES METHODES D'IMMOBILISATION DE L'ELEMENT BIOLOGIQUE. [7].....	31
FIGURE 8: REPRESENTATION D'UN BIOCAPTEUR A RESONANCE DE SURFACE PLASMON.[40] .....	36
FIGURE 9: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CAPTEUR NF-LAPS COMPRENANT UN SYSTEME A TROIS ELECTRODES. D'APRES SHAIBANI ET AL. [49],.....	39
FIGURE 10: IMAGE SCHEMATIQUE D'UNE CELLULE A ECOULEMENT AVEC UNE CONFIGURATION A DEUX ELECTRODES. D'APRES KRUPINSKA ET AL [51],.....	40
FIGURE 11: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN CAPTEUR REALISE A PARTIR D'ELECTRODES EN OR FONCTIONNALISEES D'APRES DE MIRANDA ET AL.[53],.....	41
FIGURE 12: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN BIOCAPTEUR PIEZOELECTRIQUE.....	42
FIGURE 13: ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DE LA PREPARATION DU NANOCOMPOSITE PPY-RGO/AUNPS, SUIVIE DE LA FIXATION D'Ab1 POUR LA DETECTION D' <i>E. COLI K12</i> . D'APRES ZOU ET AL [55]. ....	44
FIGURE 14. PROCESSUS D'ASSEMBLAGE DE LA BIODTECTION PHOTOELECTROCHIMIQUE D' <i>E. COLI O157:H7</i> . LE PROCESSUS I INDIQUE LA REponse PEC BASEE SUR L'APTAMERE/Cds QDs/AU NPNWs COMME CONTROLE. D'APRES DONG ET AL.[57]......	45
FIGURE 15: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SYNTHESE D'UN FILM POLYMERE IMPRIME D' <i>E. COLI</i> PAR LA TECHNIQUE D'IMPRESSION PAR MICROCONTACT. D'APRES ÖZGÜR ET AL. [60]. ....	46
FIGURE 16: DETECTION D' <i>E. COLI</i> UTILISANT UN SMARTPHONE. (A) PREPARATION DES NANOCOMPOSITES GQDs. (B) SYSTEME ECL BASE SUR UN SMARTPHONE AVEC ELECTRODE ITO ET ELECTRODE DE PLATINE. (C) PRINCIPE DE L'ECL POUR LA DETECTION D' <i>E. COLI</i> . D'APRES LI ET AL. [67]......	47
FIGURE 17 : ILLUSTRATION DE LA METHODE D'IMPEDANCE BASEE SUR LES BILLES MAGNETIQUES POUR LA DETECTION D' <i>E. COLI O157 :H7</i> , UTILISANT DES ELECTRODES EN OR INTERDIGITEES. D'APRES WANG ET AL.[68]. ....	47
FIGURE 18: FABRICATION D'UN CAPTEUR A MICROBALANCE A CRISTAL DE QUARTZ (QCM) ET PROCEDURE DE DETECTION D' <i>E. COLI O157:H7</i> . D'APRES MAO ET AL [72]......	49
FIGURE 19: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CAPTEUR NANOSTRUCTURE BASE SUR DES NANOTUBES DE CARBONE : LE PEPTIDE EST FIXE A LA SURFACE DES NTC ET L'INTERACTION DU CAPTEUR AVEC LES BACTERIES EST EVALUEE. D'APRES ANDRADE ET AL. [74]......	50

FIGURE 20: ILLUSTRATION SCHEMATIQUE DE LA FABRICATION DU BIOCAPTEUR <i>E. COLI</i> CNT-FET. D'APRES ZHANG ET AL. [76].	51
FIGURE 21 : SCHEMA DECRIVANT LES DIFFERENTES ETAPES DE LA FABRICATION D'UN CAPTEUR FET (1) AUTO-ASSEMBLAGE DE RGO (2) DEPOT D'UNE COUCHE ATOMIQUE D'AL <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (3) DEPOT DE AuNPs (4) IMMOBILISATION D'ANTI- <i>E. COLI</i> LPS ET (5) DETECTION D' <i>E. COLI</i> D'APRES THAKUR ET AL. [78].	52
FIGURE 22 : DIAGRAMME DE PHASE Au-Si [88]	62
FIGURE 23: FIGURE 24 : SCHEMA REPRESENTATIF DU MECANISME VLS (A) FORMATION OU DEPOT DES GOUTTES CATALYTIQUES (OR) SUR LE SUBSTRAT, (B) CHAUFFAGE DU SUBSTRAT ET ENVOI DU GAZ PRECURSEUR (SILANE) (C) SURSATURATION DE GOUTTE, ET CRISTALLISATION A L'INTERFACE GOUTTE-S	62
FIGURE 24: IMAGE MEB INDIQUANT LA SURFACE DES CAPTEURS APRES LA CROISSANCE DES NANOFILS DE SILICIUM PAR LA METHODE VLS. SOURCE IETR.	63
FIGURE 25: SYNTHESE DES NANOFILS PAR LA METHODE SLS : NANOFIL DE TYPE GG (GROUNDED GROWTH) (A), NANOFIL DE TYPE SG (B), IMAGES MEB DE NANOFILS TYPE GG (SUSPENDE-GROWTH) [89].	64
FIGURE 26: (A) TRANSISTOR A EFFET DE CHAMP A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM OBTENU PAR CROISSANCE SLS GUIDEES DANS UNE GOUITIERE DE SILICIUM AMORPHE IMAGE MEB (B). (C) IMAGE TEM D'UN NANOFIL MONOCRISTALLIN[89].	65
FIGURE 27: (A) MATRICE SERVANT A LA SYNTHESE DES NANOFILS ; (B) IMAGE MEB INDIQUANT DES NANOFILS REALISES GRACE A UNE MATRICE NANO-POREUSE.[90].	65
FIGURE 28 : ILLUSTRATION DES ETAPES TECHNOLOGIQUES DE FABRICATION DE NANOFILS DE SILICIUM UTILISANT LA LITHOGRAPHIE PAR FAISCEAU D'ELECTRONS COMME PROCEDE DE MASQUAGE (A), IMAGE MEB DE TRANSISTOR MOS DONT LE CANAL EST UN NANOFIL DE SILICIUM (DIAMETRE 15 NM) FABRIQUE PAR PROCEDE DE MASQUAGE DEFINI PAR LITHOGRAPHIE ELECTRONIQUE (B) [92].	67
FIGURE 29: SCHEMA DE REALISATION DES NANOFILS DE SILICIUM PAR LA METHODE DES ESPACEURS[93] : ...	68
FIGURE 30 : SCHEMA DE PRINCIPE DE LA NANO-IMPRESSON : (A) IMPRESSION DES MOTIFS, (B) SEPARATION DU MOULE, (C) ILLUSTRATION DES MOTIFS APRES LE RETRAIT DES RESIDUS PAR GRAVURE.	69
FIGURE 31: IMAGE MEB DE NANOFILS REALISES PAR LA NANO-IMPRESSON SUR SUBSTRAT SOI[96].	70
FIGURE 32: STRUCTURE DE TRANSISTORS A EFFET DE CHAMP A BASE DE NANOFIL (SGNWFET) : (A) TRANSISTOR A NANOFIL HORIZONTAL, (B) TRANSISTOR A NANOFIL VERTICAL[97].	71
FIGURE 33 : DE GAUCHE A DROITE : NANOFIL DE SILICIUM VERTICAL ET REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU TRANSISTOR A NANOFIL VERTICAL (A). VUE DE DESSUS DE PLUSIEURS TRANSISTORS A NANOFIL VERTICAL (B). COUPE HORIZONTALE (C) ET VERTICALE (D) D'UN TRANSISTOR METTANT EN EVIDENCE UN NANOFIL (CANAL) COMPLETEMENT RECOUVERT PAR LA GRILLE[98].	72
FIGURE 34: IMAGES MEB ORIGINALE ET COLORISEE D'UNE COUPE D'UN TRANSISTOR VERTICAL A NANOFIL DE SILICIUM [100]	72
FIGURE 35 : CARACTERISTIQUES ELECTRIQUES DU TRANSISTOR A NANOFIL VERTICAL PRESENTE SUR LA FIGURE 35 : (A) CARACTERISTIQUE DE SORTIE POUR 131 NANOFILS EN PARALLELE AVEC -2,5V<-1V ET UN PAS DE 0,5V, (B) CARACTERISTIQUE DE TRANSFERT POUR 20 NANOFILS EN PARALLELE AVEC VDS = -0,25V (COURBE EN BLEUE) ET VDS = -1,25V (COURBE EN ROUGE)[98].	73

FIGURE 36 : (A) ILLUSTRATION DE CAPACITE A HAUTE DENSITE, (B) DIFFERENTES ETAPES DU PROCEDE DE FABRICATION [111]..... 74

FIGURE 37 : DE LA GAUCHE VERS LA DROITE : IMAGE MEB DE NANOFILS SYNTHETISES PAR VLS AVEC DU BISMUTH COMME CATALYSEUR, SCHEMA D'ILLUSTRATION DE LA DIODE NIP REALISEE SUR SUBSTRAT DE VERRE RECOUVERT DE ZNO, CARACTERISTIQUE J-V D'UNE DIODE AINSI REALISEE [100]..... 74

FIGURE 38 : INVERSEUR CMOS A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM DOPE N ET P REALISES SUR UN SUBSTRAT EN PLASTIQUE. (A) ILLUSTRATION 3-D- AND (B) VUE DE DESSUS DE L'INVERSEUR A L'AIDE D'UN MICROSCOPE OPTIQUE. IMAGES MEB DES TRANSISTORS TYPE N (C) ET TYPE P (D). IMAGES REALISEES AVEC UNE ECHELLE=5 MM [102] ..... 75

FIGURE 39: CARACTERISTIQUES ELECTRIQUES DES TRANSISTORS TYPE N (COURBE ROUGE) ET TYPE P (COURBE BLEUE). (A) CARACTERISTIQUES DE TRANSFERT (B) CARACTERISTIQUES DE SORTIE[114]..... 76

FIGURE 40 : (A) CARACTERISTIQUES EN STATIQUE D'UN INVERSEUR A NANOFILS DE SILICIUM, (B) CARACTERISTIQUE DE TRANSFERT EN STATIQUE, GAIN DE TENSION ET COURANT D'ALIMENTATION EN FONCTION DE LA TENSION D'ENTREE AVEC VDD = 1.5 V [102] ..... 76

FIGURE 41 : MESURE DU PH A L'AIDE DE RESISTANCES A BASE DE NANOFIL DE SILICIUM. (A) NANOFIL FONCTIONNALISE PAR L'APTES. (B) VARIATION DE LA CONDUCTANCE EN FONCTION DE LA VALEUR DU PH[108] ..... 78

FIGURE 42 : DETECTION DE GAZ A L'AIDE DE RESISTANCE A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM DOPES DE TYPE P : (A) DETECTION DE NO<sub>2</sub> D'APRES ET (B) DETECTION DE NH<sub>3</sub>[107]..... 78

FIGURE 43 : ILLUSTRATION D'UN CAPTEUR A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM AYANT SUBI DIVERSES ETAPES DE FONCTIONNALISATION EN VUE DE LA DETECTION DE L'ADN[117]..... 79

FIGURE 44: IMAGES MEB MONTRANT UNE BACTERIE FIXEE SUR UN NANOFIL EN Si ET L'IMAGE FUSIONNEE CORRESPONDANTE DES MICROGRAPHIES DE FLUORESCENCE DES NANOFILS EN Si. D'APRES JEONG ET AL[84] ..... 80

FIGURE 45: REPRESENTATION DE L'ANCIEN MASQUE AVEC QUATRE CELLULES DE PEIGNES INTERDIGITES, A) LA CELLULE P INDIQUANT LES ELECTRODES AVEC UN NOMBRE DE DENTS VARIABLES : 2, 20, 40, 100. .... 85

FIGURE 46: IMAGES MEB INDIQUANT LA SURFACE DE L'ANCIEN CAPTEUR AVANT ET APRES LE DEPOT DES BACTERIES. .... 85

FIGURE 47 : A) SCHEMA REPRESENTATIF DU NOUVEAU DESIGNE DU CAPTEUR UTILISE DURANT NOS TESTS, B) IMAGES MEB INDIQUANT LE NOUVEAU DESIGNE DU CAPTEUR ET LA CROISSANCE DES NANOFILS DE SILICIUM SUR LES PEIGNES INTERDIGITES..... 86

FIGURE 48: IMAGE INDIQUANT L'HYDROPHOBICITE DU SUBSTRAT DU SILICIUM, TEST DE MICROGOUTTE SUR LA NOUVELLE STRUCTURE DE CAPTEUR. .... **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 49 : SUBSTRAT APRES CROISSANCE D'UNE COUCHE D'ISOLATION SiO<sub>2</sub>..... 88

FIGURE 50: PRESENTATION DES ETAPES DE PREPARATION DE LA SURFACE AVANT LA CREATION DES PEIGNES INTERDIGITES, A) OXYDATION THERMIQUE SECHE, B) DEPOT DE Si-POLY DOPEE N<sup>+</sup> PAR LPCVD. .... 88

FIGURE 51 : PHOTOLITHOGRAPHIE DU PREMIER MASQUE (DEFINITION DES ELECTRODES EN FORMES DE PEIGNES INTERDIGITES) ..... 88

## ANNÉE 2022

FIGURE 52: A) ETAT DE LA SURFACE APRES UNE GRAVURE IONIQUE REACTIVE, B) IMAGE AU MICROSCOPE OPTIQUE INDIQUANT DES RESIDUS SUR LES PEIGNES INTERDIGITES APRES LA GRAVURE (RISQUE DE COURT-CIRCUIT).....	
FIGURE 53: REPRESENTATION DE LA SURFACE APRES LA DERNIERE ETAPE (« LIFT-OF »F) DE FABRICATION DU NANOCAPTEUR, INDIQUANT LA ZONE DE PRESENCE DE L'OR AU MILIEU DES PEIGNES INTERDIGITES. ....	90
FIGURE 54: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES RESISTANCES A BASE DES NANOFILS DE SI SYNTHETISES PAR LE MECANISME VLS ET IMAGES MEB DES PEIGNES INTERDIGITES APRES LA CROISSANCE DES NANOFILS. ....	91
FIGURE 55: PRINCIPE DES MESURES ELECTRIQUES ET MODELE ELECTRIQUE EQUIVALENT. ....	92
FIGURE 56.: MODELE ELECTRIQUE APRES LA FONCTIONNALISATION DES NANOFILS DE SILICIUM ET LE DEPOT DES BACTERIES SUR LA SURFACE DES CAPTEURS. ....	93
FIGURE 57: REACTEUR CHIMIQUE POUR LE DEPOT DE L'APTES ET DU GLUTARALDEHYDE .....	94
FIGURE 58: ETAPES DE LA FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DES NANOFILS DE SILICIUM AVEC DEUX COUCHES ORGANIQUES (APTES ET GLUTARALDEHYDE .....	94
FIGURE 59 : A) SPECTRES DE PHOTOEMISSION C1S ET B) N1S DES SURFACES DE SiO <sub>2</sub> MODIFIEES PAR APTES/GLUTARALDEHYDE C) TENEUR EN O1S, Si2P, C1S ET N1S EN FONCTION DU TEMPS DE REACTION POUR L'IMMOBILISATION DU GLUTARALDEHYDE. ....	97
FIGURE 60: IMAGE MEB INDIQUANT L'ETAT DE LA SURFACE DES NANOFILS APRES LE DEPOT D'APTES ET DE GLUTARALDEHYDE EN PHASE VAPEUR, REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU NANOFIL.....	98
FIGURE 61: FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DES NANOFILS AVEC LE GOBS. ....	99
FIGURE 62: A) SPECTRES DE PHOTOEMISSION N1S DE SURFACES DE SiO <sub>2</sub> MODIFIEES PAR GOPS B) TENEUR EN C1S EN FONCTION DU TEMPS DE REACTION POUR L'IMMOBILISATION DE GOPS. ....	99
FIGURE 63:GREFFAGE DES ANTICORPS SUR LA SURFACE DES NANOFILS APRES LA FONCTIONNALISATION APTES/GLUTARALDEHYDE .....	100
FIGURE 64: DILUTIONS SERIELLES DE LA SUSPENSION BACTERIENNE MERE, ET METHODE DE DENOMBREMENT DES BACTERIES SUR MILIEU GELOSE.....	
FIGURE 65 : IMAGE OBTENUE A L'AIDE DU MEB DE LA PLATEFORME NANO RENNES INDIQUANT LA PRESENCE DES BACTERIES SUR DES NANOFILS DE SILICIUM. ....	103
FIGURE 66 : : DEUX PLAQUES EN VERRE, AVEC DES NANOFILS DE SILICIUM SUR LA SURFACE, UTILISEES POUR LES TESTS DE FLUORESCENCE, A) ANTICORPS <i>ANTI-E. COLI</i> LPS, B) ANTICORPS <i>ANTI-E. COLI</i> LPS+ <i>E. COLI</i> 10 <sup>8</sup> UFC/ML, C) <i>E. COLI</i> , D) TEMOIN EAU DISTILLEE.....	105
FIGURE 67 : LES TROIS RINÇAGES EFFECTUES SUR DES PLAQUES EN VERRE AVEC DES NANOFILS DE SILICIUM, ANTICORPS <i>ANTI-E. COLI</i> ET <i>E. COLI</i> GFP 10 <sup>8</sup> UFC/ML .....	105
FIGURE 68: TESTS DE FLUORESCENCE 1) TROIS CONCENTRATION TESTEES 10 <sup>3</sup> ,10 <sup>6</sup> , ET 10 <sup>8</sup> UFC/ML, 2) TESTS CROISES : ANTICORPS <i>ANTI-E. COLI</i> LPS+ <i>S. AUREUS</i> GFP / TEMOIN ANTICORPS <i>ANTI-E. COLI</i> LPS. .	106
FIGURE 69: SURFACE DU SUBSTRAT DE SILICIUM AVEC LES 14 CAPTEURS. ....	

FIGURE 70 CARACTERISTIQUE I(V) DES RESISTANCES A BASE DE NANOFILS DE SILICIUM AVEC DES ELECTRODES EN PEIGNE INTERDIGITES DE 20, 40 ET 100 DENTS. ENCART : VARIATIONS DE LA CONDUCTANCE ELECTRIQUE EN FONCTION DU NOMBRE DE DENTS A 0,2 V, 2 V ET 4 V[82] ..... 113

FIGURE 71: A) IMAGE MEB DE LA SURFACE APRES LE DEPOT DES BACTERIES SUR LES PEIGNES INTERDIGITES, B) RESULTATS ELECTRIQUES DE LA DETECTION D'E. COLI SUR UN CAPTEUR SANS FONCTIONNALISATION AVEC 40 DENTS INTER DIGITEES.[82]..... 114

FIGURE 72: VARIATION DE LA RESISTANCE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE DEPOSEE SUR DES CAPTEURS AVEC UN NOMBRE DE DENTS DES PEIGNES INTERDIGITES VARIABLE (20, 40 ET 100).[82] ..... 114

FIGURE 73 : IMAGE MEB INDIQUANT L'ETAT DE LA SURFACE DES NANOFILS ET L'ACCROCHAGE DES E. COLI . ..... 115

FIGURE 74 : RESULTATS DE LA DETECTION D'E. COLI OBTENUS PAR LE MICROSCOPE A FLUORESCENCE A) SANS ANTICORPS NI BACTERIES, B) EN PRESENCE DES BACTERIES SANS ANTICORPS, C) EN PRESENCE DES BACTERIES ET DES ANTICORPS. .... 116

FIGURE 75: A) SEUILLAGES DES IMAGES PAR UN IMAGE J, B) NOMBRE DE BACTERIES ACCROCHEES SUR UNE SURFACE DE 5.4 μM<sup>2</sup>..... 117

FIGURE 76: RESULTATS DE LA FLUORESCENCE SUR DES SUBSTRATS DE VERRE RECOUVERTS DE NANOFILS DE SILICIUM FONCTIONNALISES A) ANTICORPS ANTI-E. COLI LPS (TEMOIN) B) ANTICORPS ANTI- E. COLI LPS + E. COLI 10<sup>3</sup> UFC/ML, C) ANTICORPS ANTI-E. COLI LPS + E. COLI 10<sup>6</sup> UFC/ML, D) ANTICORPS ANTI E. COLI LPS + E. COLI 10<sup>8</sup> UFC/ML. GROSSISSEMENT X 20 ..... **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 77: NOMBRE D'E. COLI GFP ACCROCHES SUR LES NANOFILS DE SILICIUM SUR UNE SURFACE SCANNEE DE 5.4 μM<sup>2</sup>.....

FIGURE 78 : A) SCHEMA DU CAPTEUR APRES LA CROISSANCE DES NANOFILS ET B) REPONSE ELECTRIQUE DE CAPTEUR APRES LA CROISSANCE DES NANOFILS DE SILICIUM I(V). ....

FIGURE 79: SCHEMA D'UN NANOFIL APRES LA FONCTIONNALISATION CHIMIQUE, LA FIXATION DES ANTICORPS ET LA SATURATION DES SITES NON SPECIFIQUES AVEC UN AGENT BLOQUANT. .... 120

FIGURE 80: REPONSE ELECTRIQUE DE CAPTEUR COURBE I(V) APRES LA FONCTIONNALISATION ET LA FIXATION DE L'ANTI LPS E. COLI..... 121

FIGURE 81 : ETAT DE LA SURFACE DE NANOFILS A) AVEC FONCTIONNALISATION + BACTERIES B) AVEC FONCTIONNALISATION + ANTICORPS+ AGENT BLOQUANT + BACTERIES. .... 121

FIGURE 82: COURBES I(V) REPRESENTENT RESPECTIVEMENT LE NIVEAU DE COURANT DU CAPTEUR AVEC LA FONCTIONNALISATION CHIMIQUE + ANTICORPS ANTI-E. COLI LPS (COURBE NOIRE), FONCTIONNALISATION + BACTERIES E. COLI SANS ANTICORPS (COURBE ROUGE), ET FONCTIONNALISATION + ANTICORPS ANTI-E. COLI LPS + BACTERIES E. COLI (COURBE BLEUE). REPRESENTATION EN : A) ECHELLE LINEAIRE, B) ECHELLE LOGARITHMIQUE..... 122

FIGURE 83: ETAT DE LA SURFACE DU CAPTEUR APRES L'ACCROCHAGE DES BACTERIES E. COLI..... 123

FIGURE 84: ETUDE DU COURANT EN FONCTION DE LA CONCENTRATION BACTERIENNE DEPOSEE (A) AVEC LES ANTICORPS ANTI E. COLI LPS LA COURBE NOIRE QUI REPRESENTE LE TEMOIN (LE BLANC), ET LES COURBES

ROUGE, BLEU, ET VERTE POUR DES CONCENTRATIONS DE BACTERIES RESPECTIVEMENT DE  $10^3$ ,  $10^6$  ET  $10^8$  UFC/ML, (B) LA VARIATION DU COURANT PAR RAPPORT AU TEMOIN EST DONNEE SUR L'HISTOGRAMME INDIQUANT LA VARIATION DELTA I POUR LES 3 CONCENTRATIONS BACTERIENNES DEPOSEES A LA SURFACE DU CAPTEUR A UNE TENSION DE 1V..... 124

FIGURE 85 : VARIATION DU COURANT SUR LE MEME CAPTEUR EN FONCTION DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS BACTERIENNES VARIANT DE  $10^2$  UFC/ML A  $10^8$  UFC/ML ..... 125

FIGURE 86: HISTOGRAMME INDIQUANT LE DELTA I(A) DES 14 CAPTEURS POUR CHAQUE CONCENTRATION DEPOSEE A 1V..... 126

FIGURE 87: REGRESSION LINEAIRE DU DELTA I POUR DIFFERENTES CONCENTRATIONS BACTERIENNES DEPOSEES SUR LE MEME CAPTEUR A UNE TENSION DE POLARISATION DE 1 V. .... 126

FIGURE 88 : ETAT DE LA SURFACE DES NANOFILS DE SILICIUM APRES LA FIXATION DES ANTI PROTEINES A S. AUREUS ET LA BACTERIE S. AUREUS..... 127

FIGURE 89 : A) VARIATION DU COURANT EN FONCTION DE LA PRESENCE DE L'ANTI-S. AUREUS PROTEINE A, (COURBE NOIR) ANTI- S. AUREUS PROTEINE A, (COURBE ROUGE) ANTI-PROTEINE A S. AUREUS + S. AUREUS  $10^8$ UFC/ML, (COURBE BLEU)  $10^8$ UFC/ML..... 128

FIGURE 90: IMAGE MEB DE S. AUREUS ACCROCHES SUR DES NANOFILS DE SILICIUM, FONCTIONNALISES A) FORME DE COCCI DES S. AUREUS, B) DES AMAS EN FORME DE GRAPPE DES S. AUREUS..... 129

FIGURE 91 : RESULTATS DE LA DETECTION DE S. AUREUS FLUORESCENCE A) AVEC LES ANTICORPS ANTI- S. AUREUS PROTEINE A, B) EN PRESENCE DES BACTERIES SANS ANTICORPS ANTI- S. AUREUS PROTEINE A, C) EN PRESENCE DE S. AUREUS ET DES ANTICORPS ANTI- S. AUREUS PROTEINE A. GROSSISSEMENT X20. .... 130

FIGURE 92 : A) RESULTATS DE LA CARACTERISATION ELECTRIQUE EN FONCTION DES CONCENTRATIONS BACTERIENNES DE S. AUREUS, B) SEUILLAGES DES IMAGES PAR UN FIJI (IMAGE J), NOMBRE DE S. AUREUS ACCROCHES SUR  $5,4 \mu\text{m}^2$  ..... 131

FIGURE 93 : RESULTATS DE LA FLUORESCENCE A) ANTICORPS ANTI-S. AUREUS PROTEINE A (TEMOIN) B) ANTICORPS ANTI- S. AUREUS PROTEINE A+ S. AUREUS  $10^3$  UFC/ML, C) ANTICORPS ANTI- S. AUREUS PROTEINE A + S. AUREUS  $10^6$  UFC/ML, D) ANTICORPS ANTI- S. AUREUS PROTEINE A + S. AUREUS  $10^8$  UFC/ML. GROSSISSEMENT X20..... 132

FIGURE 94 : ETAT DE LA SURFACE DES NANOFILS SUR LES CAPTEURS, A) ANTICORPS ANTI-E. COLI LPS, B) ANTICORPS ANTI-E. COLI LPS+ S. AUREUS  $10^8$  UFC/ML..... 133

FIGURE 95: REPONSE ELECTRIQUE DU CAPTEUR AVEC LES ANTICORPS ANTI-E.COLI LPS AVANT ET APRES LE DEPOT DE S. AUREUS. .... 134

**ANNÉE 2022**

**ANNÉE 2022**

## Introduction générale

Les nanosciences, les nanotechnologies et les nanomatériaux constituent des enjeux majeurs pour la santé, l'environnement, la sécurité et le confort de demain. On associe au préfixe « nano » une dimension mille fois inférieure à celle du micron (l'épaisseur moyenne d'un cheveu est de 100 micromètres, la taille moyenne d'un atome est de 0,1 nanomètre). A l'échelle sub-micronique ou nanométrique (de 100 nm à 0,1 nm), de nouvelles propriétés physiques et de nouveaux phénomènes apparaissent, et mènent à de nouveaux défis autant techniques que scientifiques. C'est grâce au développement de nombreux outils de manipulation (lithographie, gravure,...), de synthèse et d'observation tels que le Microscope à effet Tunnel (STM), le Microscope à balayage électronique (MEB), le Microscope à force atomique (AFM), Microscope optique à champ proche (SNOM), ...), que ces nouveaux phénomènes ont été découverts, continuent d'être mis en évidence et deviennent petit à petit maîtrisables. Aujourd'hui, les applications industrielles associées à ces effets nanométriques sont multiples et dans des champs de plus en plus divers.

Les propriétés particulièrement intéressantes des dimensions nanométriques trouvent en particulier un écho dans le développement de nouveaux capteurs. En effet, ces dernières décennies ont vu l'apparition des capteurs biologiques appelés plus souvent des biocapteurs. Ces nouveaux dispositifs d'analyse ont connu un développement assez remarquable grâce aux demandes de contrôle (notamment en hygiène) dans différents domaines tels que l'environnement, l'alimentation, la sécurité domestique et industrielle ... Généralement, la conception de biocapteur est basée sur l'association d'une entité biologique faisant office de biorécepteur à un transducteur physique. Ce biorécepteur assure la bio-reconnaissance lors de l'interaction avec l'analyte cible. Cette bio-reconnaissance est aisément mesurable et peut être directement associée à la concentration de l'analyte cible présente dans l'échantillon à analyser (grâce au transducteur, suite à la génération d'un signal électrique par exemple).

Trois types de biomolécules spécifiques existent, jouant le rôle de biorécepteurs, donnant naissance respectivement à des biopuces, des capteurs enzymatiques et des immunocapteurs : les acides nucléiques (ADN, ARN), les enzymes et les immuno-espèces (antigènes, anticorps). Dans le cas de l'immunocapteur, l'identification (d'un antigène par un anticorps ou réciproquement) s'effectue suite à une réaction d'affinité entre les deux espèces, permettant la formation d'un complexe que l'on peut mettre en évidence.

## ANNÉE 2022

Les performances des outils de détection actuels sont souvent jugées insuffisantes, à cause principalement de seuils de détection élevés ou de temps de diagnostic relativement longs. Une priorité est ainsi de développer des systèmes d'identification rapides présentant une grande sensibilité avec une bonne sélectivité, dans des dispositifs compacts qui pourront être associés à des systèmes de détection électronique intégrés ou embarqués. C'est dans cet objectif que les travaux présentés dans ce manuscrit ont été menés, en associant plusieurs disciplines telles que la microélectronique, la physique, la chimie, la microbiologie et l'électronique.

Ce travail de thèse porte sur l'élaboration d'un biocapteur basé sur des nanofils de silicium pour une détection électrique des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) en milieu liquide. Certaines souches de cette espèce bactérienne peuvent être responsables de maladies chez l'Homme (diarrhées aqueuses ou sanglantes, vomissements, nausée, infections urinaires...).

Nous avons fait le choix de fabriquer un capteur à base de nanofils, ces derniers présentant des propriétés spécifiques particulièrement intéressantes grâce à leur taille réduite, un rapport surface/volume élevé, et une grande sensibilité à l'environnement auquel ils sont soumis. Les nanofils sont ainsi de bons candidats pour la mise en œuvre de capteurs biologiques ou chimiques. Ils présentent également une capacité d'intégration importante dans la réalisation des dispositifs électroniques intégrés en technologie silicium CMOS (Complementary Metal Semiconductor Semiconductor). Le capteur électronique développé dans ce travail est basé sur une résistance électrique fabriquée à partir de nanofils de silicium, utilisé pour une détection directe par mesure électrique de la bactérie *E. coli*.

Le premier chapitre de ce manuscrit présente la bactérie *E. coli* utilisée dans notre étude, ainsi que la bactérie *S. aureus* qui servira pour l'étude de spécificité du capteur. Un état de l'art sur les méthodes conventionnelles pour la détection des agents pathogènes sera présenté en faisant un focus sur les nanomatériaux et les nano-objets pour la détection des *E. coli*.

Le second chapitre est une étude bibliographique sur la synthèse des nanofils de silicium ainsi que sur les divers dispositifs associés. Il décrit les principales techniques de fabrication des nanofils, suivant les approches « top-down » et « bottom-up » et les principaux dispositifs électroniques à base de ceux-ci.

Le troisième chapitre décrit les étapes de fabrication des dispositifs à base de nanofils. Nous y détaillons la synthèse des nanofils de silicium, la fabrication de résistances ainsi que leurs caractéristiques électriques, puis les étapes de préparation de la surface des nanofils avant le

## ANNÉE 2022

dépôt des bactéries : (1) la fonctionnalisation, (2) les étapes de la fixation des anticorps spécifiques à la bactérie à détecter, et (3) la présentation des différentes méthodes de détection utilisées durant nos travaux (microscope électronique à balayage, fluorescence, protocoles de détection par la méthode « *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* » (ELISA)).

Le quatrième chapitre présente les résultats associés à la détection par fluorescence, et par mesure électrique, avant et après la fonctionnalisation de la surface, le dépôt des anticorps, et le dépôt de bactéries. Une étude est également présentée, montrant l'impact de la concentration bactérienne des deux espèces bactériennes (*E. coli* et *S. aureus*) déposées. La dernière partie de ce chapitre met en avant la spécificité de la détection, en utilisation des anticorps anti-lipopolysaccharide (*anti-LPS*) d'*E. coli* en présence de *S. aureus*.

Une synthèse générale de l'ensemble des résultats obtenus ainsi que les perspectives à donner à ce travail concluent le manuscrit.

**ANNÉE 2022**

# Chapitre 1

## **Présentation de la bactérie *Escherichia coli.* et état de l'art des méthodes de détection**

**ANNÉE 2022**

## I. Introduction

Les maladies infectieuses ont toujours été considérées comme l'un des principaux défis pour la survie de l'humanité en raison de l'émergence périodique d'épidémies anciennes et nouvelles.

Les biocapteurs ont été proposés comme méthodes analytiques rapides et rentables pour surveiller les bactéries dans les échantillons d'intérêt. Un biocapteur est un dispositif d'analyse qui intègre un élément de reconnaissance biologique avec un transducteur physique pour générer un signal mesurable, proportionnel à la concentration des analytes. Dans le schéma général d'un biocapteur, l'élément de reconnaissance biologique répond au composé cible et le transducteur convertit la réponse biologique en un signal détectable, qui peut être mesuré par voie électrochimique, optique, acoustique, mécanique, calorimétrique ou électronique, puis corrélé avec la concentration de l'analyte. Différents types de biocapteurs disponibles sous forme de dispositifs électriques et optiques peuvent détecter sélectivement des espèces biologiques. Un bon biocapteur doit non seulement répondre à de faibles concentrations d'analytes, mais aussi avoir la capacité de discriminer les espèces en fonction des molécules de reconnaissance qui sont immobilisées sur sa surface [1].

Ce chapitre se concentre sur les avancées récentes dans le domaine des biocapteurs pour la détection de bactéries pathogènes et plus particulièrement d'*Escherichia coli*. En raison du grand intérêt des nanomatériaux pour améliorer la sensibilité et la sélectivité des biocapteurs, une attention particulière est portée sur le rôle des nano-objets dans les biocapteurs. Ainsi, après une description des méthodes conventionnelles de détection d'*E. coli*, les méthodes alternatives de biocapteurs sont présentées avec un bref rappel des principales méthodes de transduction (optique et électrochimique). Ensuite, le rôle des nanomatériaux ou des nano-objets sur les performances des biocapteurs est détaillé et une comparaison entre les différents biocapteurs est effectuée en termes de gamme de concentrations et de limites de détection.

On distingue deux types de bactéries : à Gram positif et à Gram négatif, présentant une charge électrique négative contenue dans leur membrane.

## II. Bactéries Gram négatif, et Gram positif

Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont différenciées par la technique de coloration de Gram. La coloration de Gram a été développée par Cristian Gram en 1884. La différence principale entre les bactéries Gram positif et Gram négatif est que Les bactéries à Gram positif contiennent une paroi épaisse de peptidoglycane avec de l'acide teichoïque, ce qui permet à la bactérie de mieux retenir le violet de gentiane lors de la coloration de Gram. La membrane externe des bactéries à Gram négatif peut être contre-colorée en rose par de la fushine.

### II.1. Bactérie Gram négatif, paroi cellulaire et structure de l'enveloppe cellulaire

La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif a une épaisseur de 5 à 10 nm et contient une monocouche de peptidoglycane plus fine que chez les Gram positif. Le squelette du peptidoglycane est partiellement réticulé chez les bactéries Gram-négatif. L'acide lipoteichoïque ne se trouve pas dans la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif. Les bactéries Gram négatif présentent une membrane externe, située à l'extérieur de la paroi cellulaire, qui a une épaisseur de 7,5 à 10 nm. Dans la membrane externe des bactéries Gram négatif, on trouve des lipopolysaccharides (LPS « endotoxines »). La membrane externe est ancrée de manière non covalente dans des lipoprotéines, qui sont liées de manière covalente à la couche de peptidoglycane. (Figure 1)

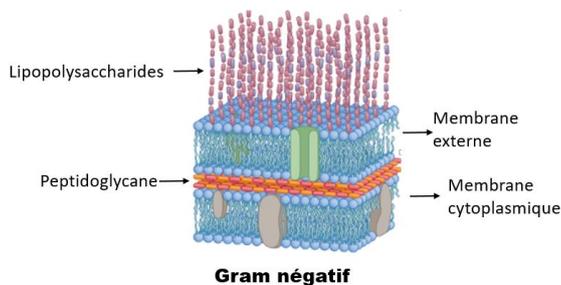


Figure 1: illustration schématique de la paroi cellulaire d'une bactérie Gram négatif.

### II.2. Bactérie Gram positif, paroi cellulaire et structure de l'enveloppe cellulaire

Les bactéries Gram positif contiennent une paroi cellulaire continue appelée *sacculus*, d'une épaisseur de 20 à 80 nm. La paroi cellulaire est composée de peptidoglycane connu aussi

sous le nom de muréine. Les peptidoglycanes contiennent un squelette glycanique composé à la fois d'acide muramique N-acétylé et de glucosamine. Chez les bactéries Gram positif (figure 2), ce squelette glycanique est fortement réticulé avec les oligopeptides. Les antibiotiques  $\beta$ -lactamines ciblent l'enzyme transpeptidase qui intervient dans la réticulation. Dans certaines bactéries Gram positif, on trouve de l'acide lipoteichoïque portant une forte charge électrique négative, et lié de manière covalente au squelette du peptidoglycane.

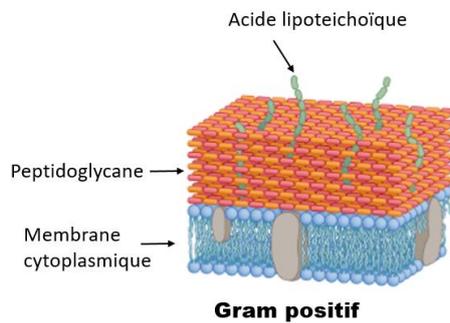


Figure 2: illustration schématique de la paroi cellulaire d'une bactérie Gram positif.

### III. Les bactéries utilisées

Durant cette thèse, le choix des bactéries s'est porté sur les espèces *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), respectivement Gram négatif et positif. Dans un premier temps, les expérimentations (tests de fluorescence, visualisation au microscope électronique à balayage (MEB), caractérisation électrique, validation des protocoles) ont été réalisées en utilisant *E. coli*. Dans un deuxième temps, une fois le protocole validé, les mêmes tests ont été réalisés afin de tester la spécificité de détection avec l'espèce *S. aureus*.

#### III.1. *E. coli* et anti-*E. coli* LPS

Les *E. coli* font partie de la flore commensale des hommes et des animaux. La plupart des types d'*E. coli* ne sont pas pathogènes et font partie du microbiote intestinal. Mais quelques souches, telles que *E. coli* O157: H7, peuvent causer des douleurs abdominales et des diarrhées, lesquelles peuvent évoluer vers des formes sanglantes (colites hémorragiques, syndrome hémolytique et urémique). Des vomissements et de la fièvre peuvent aussi

survenir. De simple bactérie commensale, *Escherichia coli* peut aussi devenir un agent pathogène responsable d'autres types d'infections : infections urinaires, cholécystites... Elle peut aussi être impliquée dans des infections nosocomiales. La transmission peut se faire par ingestion ou indirectement via des contaminations fécales.

*E. coli* est un bacille (bactérie en forme de bâtonnet) Gram négatif, peuplant la microflore intestinale ou l'écosystème des mammifères et des oiseaux. La classification des *E. coli* est divisée entre 150 et 200 sérogroupes, déterminés par les antigènes somatiques (O), capsulaires (K), fimbriaux (F) et flagellaires (H) (figure 3).

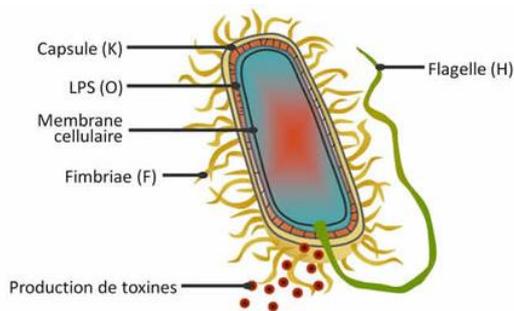


Figure 3: illustration indiquant les éléments de la bactérie *E. coli*. (<http://www.ecl-lab.ca>)

Le LPS est un composant majeur de la membrane cellulaire des bactéries Gram négatif, contribuant grandement à l'intégrité structurelle des bactéries et protégeant la membrane de certains types d'attaques chimiques. C'est une endotoxine, qui induit une forte réponse du système immunitaire normal des animaux. La fonction du LPS fait l'objet de recherches expérimentales depuis plusieurs années en raison de son rôle dans l'activation de nombreux facteurs de transcription, qui deviennent actifs après stimulation par le LPS. Le LPS induit également de nombreux types de médiateurs impliqués dans le choc septique.

### III.2 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est un cocci (bactérie de forme sphérique) à coloration de Gram positive. Il mesure de 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre.

Les *S. aureus* sont des bactéries ubiquitaires, elles font partie de la flore résidente de la peau de l'homme et des animaux. La densité de la colonisation est variable selon les territoires, la zone préférentielle de *S. aureus* chez l'homme est la muqueuse nasale ; d'autres sites peuvent

être colonisés : périnée, vagin, muqueuse digestive... Environ 30% des individus hébergent cette espèce de façon intermittente.

L'efficacité de *S. aureus* en tant qu'agent pathogène peut être attribuée à son arsenal de facteurs de virulence parmi lesquels les toxines sécrétées jouent un rôle important. Les principales toxines de *S. aureus* peuvent être divisées en trois grands groupes (figure 4) :

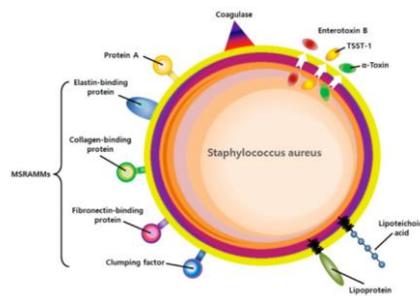


Figure 4 : illustration indiquant les éléments de la bactérie *S. aureus*[2]

les toxines porogènes (PFT), les toxines exfoliantes (ET) et les superantigènes (SAGs). Les toxines porogènes peuvent être divisées en quatre types : hémolysine- $\alpha$  (Hla ou  $\alpha$ -toxine), hémolysine- $\beta$ , leucotoxines et modulines solubles dans le phénol (PSM). Les toxines de *S. aureus* sont liées à certaines maladies comme le syndrome du choc toxique (SCT), le syndrome de la peau ébouillantée staphylococcique (SCE), la pneumonie nécrosante ou les infections cutanées profondes. Les toxines sont capables d'endommager les membranes cellulaires de l'hôte, soit en dégradant les connexions intercellulaires, soit en modulant les réponses immunitaires [3].

## IV. Les biocapteurs

### IV.1 Historique

Le sujet des biocapteurs a été évoqué la première fois par Leland Clark en 1956, dans le but de mesurer la concentration d'oxygène dissout dans le sang [4], par la suite en 1962 le même capteur a été adapté pour quantifier le taux de glucose dans le sang [5]. Ce dernier était constitué de l'enzyme glucose oxydase (GOx) piégé à la surface d'une électrode de platine par une membrane à dialyse en polyéthylène permettant la diffusion des substrats et des

produits de la couche enzymatique. Le premier biocapteur potentiométrique a été réalisé en 1969 par Guilbault et Montalvo pour la détection de l'urée[6].

#### IV.2 Définition du biocapteur

Un biocapteur, comme tout outil d'analyse, est un dispositif de saisie d'informations. Les performances des biocapteurs sont généralement évaluées expérimentalement par leur sensibilité, leur limite de détection, leur gamme linéaire et dynamique, leur reproductibilité et/ou leur sélectivité. Les autres paramètres évalués incluent le temps de réponse, la stabilité opérationnelle et de stockage du capteur. Idéalement, la surface de détection est régénérée pour que le transducteur soit recyclable. Toutefois, dans certains cas, notamment dans le domaine de l'analyse clinique, l'usage unique peut être plus adapté.

#### IV.3 Description du biocapteur

Un biocapteur est un outil analytique qui convertit une réponse biologique en un signal mesurable, traitable et quantifiable. Le schéma de la figure 5 présente les différents constituants d'un biocapteur :

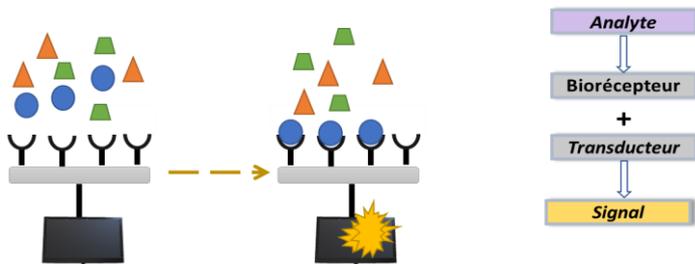


Figure 5 : Présentation schématique d'un biocapteur.

Un biocapteur est constitué par deux éléments essentiels, un biorécepteur qui peut se présenter comme un anticorps, un aptamère, de l'ADN, ou une enzyme, ces biorécepteurs se lient sélectivement à la molécule cible à détecter (analyte). Celle-ci se trouve dans un

échantillon sous forme pure ou dans un milieu complexe (culture cellulaire, sang, urine, aliments ...).

La reconnaissance entre l'analyte et le biorécepteur se produit au niveau d'une architecture interfaciale (électrode seule ou électrode+polymères, électrode+nanotubes de carbone, électrode +nanoparticules métalliques...) appelée un transducteur.

Le transducteur génère un signal qui est amplifié et converti en un signal de sortie interprétable.

Le signal est modifié avant et après la reconnaissance biologique en fonction des concentrations détectées d'analyte. Ce signal peut être électrochimique, optique, piézoélectrique, spectroscopique, ou calorimétrique.....(Tableau 1)

TABLEAU 1: EXEMPLE DE CATEGORIES DE BIOCAPTEUR

Biocapteurs	Sensibles aux variations :
Calorimétrique	Température
Optique	Absorbance, chimiluminescence, fluorescence, résonance plasmique de surface
Piézoélectrique	Masse
Electrochimique	Courant (ampérométrique), potentiel (potentiométrique), conductivité (conductimétrique), impédance

#### IV.2.1 Le biorécepteur

Le biorécepteur constitue le premier maillon du biocapteur. Il permet l'identification de l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif. Le biorécepteur assure ainsi la reconnaissance moléculaire, associée ou non à la transformation de l'espèce à mesurer. Cette modification, très localisée, de l'espèce présente dans l'échantillon, se fait généralement par l'intermédiaire d'une molécule active immobilisée (par exemple comme le montre la figure 6 : enzyme, anticorps, ADN, cellule entière, micro-organisme...), qui transforme ce substrat en un produit détectable par le transducteur. Dans un biocapteur, le biorécepteur offre une spécificité et une sensibilité élevée pour un groupe particulier d'analytes, ainsi qu'une réponse rapide. Plusieurs types de biorécepteurs ont été utilisés comme moyen de reconnaissance moléculaire pour le développement de biocapteurs. Parmi ces biorécepteurs, on cite par

exemple les biocapteurs à enzymes qui utilisent généralement des enzymes spécifiques pour la capture et la génération catalytique d'un produit qui est alors directement mesuré grâce à une large gamme de transducteurs (électrochimiques, optiques, thermiques, acoustiques...). Ce type de biocapteurs a été souvent utilisé pour la quantification de contaminants tels que les pesticides, herbicides ou antibiotiques .... Le biorécepteur microorganisme est utilisé comme biocapteur pour la synthèse pharmaceutique, le traitement des eaux usées et l'industrie alimentaire.



Figure 6: différents types de biorécepteurs utilisés pour la détection biologique. [7]

#### a) Différentes techniques d'immobilisation des biomolécules

Un point essentiel pour la fabrication d'un biocapteur est le greffage des biomolécules actives (enzymes, anticorps, cellules, ou tissus...) sur la surface du transducteur. Différentes procédures d'immobilisation du biorécepteur ont été développées dans le but d'avoir une immobilisation efficace et stable des biomolécules actives sur la surface du transducteur, de maintenir complètement les propriétés biologiques des biomolécules actives et garantir une accessibilité et une réactivité maximales du biorécepteur [8], [9]. La sélection d'une méthode d'immobilisation appropriée dépend de la nature de la molécule biologique, du type du transducteur utilisé, des propriétés physico-chimiques de l'analyte et des conditions opératoires du biocapteur [10]. Il existe plusieurs techniques d'immobilisation que l'on peut subdiviser en procédés physiques et en procédés chimiques (figure 7).

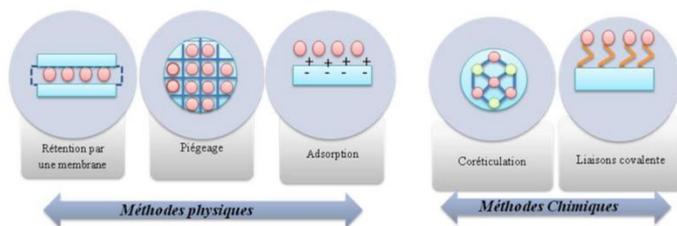


Figure 7: représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation de l'élément biologique. [7]

Préalablement, l'immobilisation physique laisse le biorécepteur intact, mais la faiblesse de la liaison (forces de Van der Waals) peut entraîner une perte du biorécepteur et une sensibilité élevée aux paramètres physico-chimiques ( $t^\circ$ , pH,...). Ce type de rétention exploite la grande différence de taille entre la molécule sonde et la cible, d'où l'idée de créer une barrière semi-perméable pour retenir la molécule. L'immobilisation par adsorption est basée sur l'établissement d'interactions de faible énergie de type ionique, polaire ou hydrophobe ou encore des liaisons hydrogènes et des forces Van der Waals, entre les groupes fonctionnels de la molécule active (biorécepteur) et la surface de support (le transducteur). L'immobilisation par piégeage consiste à incorporer la molécule biologiquement active dans une matrice organique (polymères) ou inorganique (argiles). Nous trouvons aussi la rétention par une membrane qui consiste en une technique d'immobilisation connue sous le nom Langmuir-Blodget (LB). Elle repose sur l'adsorption de biomolécule sur une monocouche de tensio-actif, comme l'octodécylamine (ODA) grâce à la force électronique. On obtient un film Langmuir-Blodget (LB) dans lequel la biomolécule est emprisonnée entre deux couches d'ODA. Une fois déposés sur le transducteur, ces films sont traités avec des vapeurs de glutaraldehyde pour améliorer leur stabilité. Tandis que l'immobilisation chimique implique la formation d'une liaison chimique entre la molécule active et un groupe réactif d'un agent d'immobilisation ou du support. La liaison se réalise, soit par création d'une vraie liaison covalente (fixation covalente sur support active) soit par coréticulation basée sur l'interaction entre une protéine de charge (comme l'albumine) et un agent bifonctionnel, pour la formation d'un réseau [11]. L'immobilisation chimique présente souvent l'avantage de stabiliser la protéine et de permettre une utilisation prolongée [12].

Le développement des biocapteurs réalisés dans ce travail se base sur le greffage des molécules par des liaisons covalentes. Ainsi, nous nous intéresserons, dans ce qui suit, à définir ce type de liaison.

#### b) Immobilisation par greffage covalent

L'utilisation des liaisons covalentes permet d'obtenir une bonne stabilité de vie de la biomolécule active greffée sur l'électrode. Elle permet également d'avoir de fortes liaisons qui assurent une meilleure fixation de la biomolécule sur la surface du transducteur. Cette technique est basée sur la réaction entre un groupement fonctionnel de la molécule active et un groupement fonctionnel du support préalablement activé. Les groupements fonctionnels disponibles pour les enzymes ou les protéines proviennent des chaînes latérales des acides aminés, notamment les groupements  $\epsilon$ -amine de la lysine, carboxyle de l'aspartate et du glutamate, sulfhydryles de la cystéine et hydroxyphénolique de la tyrosine. Des réactifs bifonctionnels, tels que le glutaraldéhyde et carbodiimide sont aussi très utilisés pour l'immobilisation des protéines. D'autres stratégies utilisent des interactions d'affinité spécifique entre les molécules préalablement fixées aux supports et les molécules sondes à immobiliser.

Pour assurer des liaisons covalentes, des surfaces métalliques (telles que l'or et l'argent) peuvent être fonctionnalisées avec des groupements amines, hydroxyles ou carboxyles en réagissant avec des aminoalcanethiols, hydroxyalcanethiols et carboxylalcanethiols simultanément. Plus récemment, des électrodes métalliques sur lesquelles sont déposés, par voie électrochimique, des films de polymère conducteur fonctionnalisé permettent l'immobilisation des biomolécules actives par liaison covalente.[7]

#### IV.2.2 Le transducteur

Le transducteur représente l'autre élément du biocapteur. Il sert à exploiter la modification biochimique du substrat par le biorécepteur pour le transformer en signal exploitable. On peut dire que le transducteur assure la conversion d'un type d'énergie dans un autre. Suivant le type de réaction et les substances libérées ou consommées, on choisira le transducteur le plus adapté. Le choix du transducteur dépend aussi de l'application du biocapteur. Différents systèmes de transduction, basés sur des principes différents, sont généralement utilisés afin de convertir la reconnaissance moléculaire en un signal exploitable. D'une part, des transducteurs non spécifiques et applicables peuvent être employés, indiquant des paramètres

généraux tels que l'enthalpie de réaction (thermistance), le changement de la masse (cristal piézoélectrique), ou l'épaisseur de la couche (réflectométrie). D'autre part, une indication spécifique peut être réalisée avec les électrodes potentiométriques pour des espèces comme  $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $NH_3$ ,  $CO_2$  ou  $H_2O_2$ .

## V. Méthodes conventionnelles pour la détection des agents pathogènes

### V.1 Méthodes standard pour le diagnostic *in vitro*

La visualisation des bactéries au microscope optique (coloration de Gram ou de Ziehl, immunofluorescence, immunomarquage...) [13] manque souvent de sensibilité et de spécificité, à moins que cette dernière ne soit améliorée par l'utilisation d'anticorps spécifiques et marqués (par exemple avec un fluorochrome). Le microscope électronique permet une visualisation plus précise des bactéries, internes ou externes, mais il est peu spécifique [14] et peu accessible. Les facteurs de virulence bactériens peuvent également être mis en évidence par des cultures cellulaires, en étudiant l'effet cytopathogène (toxicité), la capacité d'adhésion et/ou d'invasion cellulaire, mais reste du domaine de la recherche. Les méthodes de culture restent les plus utilisées mais leur intérêt est limité pour les bactéries nécessitant un temps d'incubation long ou pour les bactéries viables non cultivables (sous stress...), et nul pour les bactéries pour lesquelles aucun milieu de culture n'a été décrit. Des mesures quantitatives ou semi-quantitatives des bactéries par dénombrement bactérien sur milieu gélosé ou par cytométrie de flux [15] ont également été proposées. De nombreuses méthodes basées sur la détection d'antigènes [16] ou de toxines spécifiques [17] ont été développées, afin d'augmenter la spécificité et la sélectivité de la détection : agglutination de particules de latex sensibilisées, détection immunoenzymatique rapide d'antigènes (tests immunochromatographiques sur membranes, Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)...) [18]. Une autre alternative consiste à quantifier les anticorps sériques (sérologie) générés par une stimulation *in vivo* par des antigènes bactériens [19]. Cette méthode est très spécifique en fonction des antigènes utilisés *in vitro*, et de nombreux tests existent (ex : ELISA...) [20], mais sont limités par la sensibilité souvent liée à la cinétique d'apparition et de disparition des anticorps, et dont les résultats peuvent varier en fonction des antigènes bactériens et des potentielles réactions croisées [21]. Des méthodes de confirmation peuvent être utilisées pour augmenter la spécificité du test, comme le Western blot ou l'immunoblot

(différentes protéines sont séparées sur une membrane qui sert de support de réaction, ce qui permet de préciser contre quelles protéines spécifiques les anticorps sont dirigés).

De nombreuses méthodes de biologie moléculaire ont été développées, basées sur la détection d'acides nucléiques, souvent après amplification moléculaire, allant de la simple PCR (Polymerase Chain reaction) aux récentes méthodes NGS (Next generation Sequencing) [22]. Parmi celles-ci, on peut citer l'hybridation moléculaire et ses variantes (hybridation avec amplification du signal ou ADN<sub>b</sub>), l'amplification génique ou PCR/ PCR multiplex, les puces à ADN [23], le séquençage nucléotidique et ses dérivés (NGS, panels syndromiques...). Ces méthodes ont permis d'étudier les microbiotes dans leur totalité, dans différentes conditions, et de les comparer. Les méthodes traditionnelles de clonage d'une séquence d'ADN dans un vecteur avec réplication dans une cellule vivante nécessitent des jours ou des semaines de travail. L'utilisation de la PCR, dans les diagnostics moléculaires ou les laboratoires de recherche, est maintenant acceptée comme la référence pour la détection d'acides nucléiques d'origines diverses [24]. Il existe différentes méthodes de PCR, basées sur la détection de l'ARN ou de l'ADN, qu'elles soient qualitatives ou quantitatives, en temps réel, simples ou multiplexes. Ces méthodes nécessitent une petite taille d'échantillon et sont des techniques extrêmement sensibles et rapides [25], qui ne nécessitent pas d'étape de culture bactérienne. Des mutations dans la séquence ciblée peuvent conduire à des résultats faussement négatifs, et une contamination (si les conditions strictes de manipulation ne sont pas respectées) à des résultats faussement positifs. L'analyse par PCR en temps réel peut être réalisée plus rapidement et détecter simultanément plusieurs espèces (multiplex), en quelques heures, mais nécessite toujours un équipement et des réactifs spécifiques [26]. Gadsby et al [27] ont détecté huit cibles bactériennes qui peuvent être quantifiées de manière fiable à partir d'échantillons d'expectoration jusqu'à une concentration de 100 unités formant colonies (UFC)/réaction (8333 UFC/mL). Aujourd'hui 22 cibles peuvent être détectées simultanément dans un échantillon biologique à analyser [28].

Ces méthodes sont toujours confrontées à des problèmes tels que le temps d'analyse important et la complexité du processus. Une méthode alternative pour la détection des micro-organismes est l'utilisation de biocapteurs, qui combinent un mécanisme de reconnaissance biologique avec une technique de transduction physique. Ainsi, un certain nombre de méthodes et de technologies de fabrication ont été développées pour viser les performances suivantes (mais difficiles à satisfaire simultanément) : haute sensibilité, faible limite de

détection, détection et identification simultanées de différentes souches, analyse en temps réel, et surtout portabilité et facilité d'utilisation pour la surveillance *in-situ*.

## V.2 Biocapteur Optique

Parmi les différents systèmes de capteurs, les biocapteurs optiques permettent un diagnostic facile à utiliser, rapide, portable, multiplexé et rentable. Dans cette partie, nous passons en revue les avancées récentes en matière de biocapteurs optiques pour le diagnostic des pathogènes, en particulier les capteurs colorimétriques et plasmoniques, et nous introduisons les technologies et les stratégies qui constituent ces biocapteurs optiques avec de telles performances de détection. Des exemples récents de biocapteurs optiques sont présentés et leurs avantages et limites sont discutés.

Les transducteurs optiques représentent une catégorie de méthodes de signalisation courantes et populaires, toutes impliquant un changement optique dans la couche de détection, y compris l'absorption, la transmission, la diffusion, la réflexion, la réfraction et l'émission, à la suite d'interactions entre l'analyte et l'élément de reconnaissance. Les capteurs optiques sont généralement basés sur la colorimétrie, l'absorption UV, la fluorescence, la chimiluminescence, la diffusion Raman améliorée par la surface (SERS) ou la résonance plasmonique de surface (SPR), qui peuvent être détectés à l'œil nu ou par un instrument de détection optique, avec les avantages suivants : polyvalence, absence de destruction, sensibilité, universalité et détection simultanée de plusieurs cibles [29]. Plusieurs équipes de recherche ont travaillé sur le développement de ce type de capteur en utilisant des substrats, basés sur des matériaux pouvant être à l'échelle nanométrique, par exemple : papier, lame de verre, polymère, multicouche sur substrat de verre, microparticule de polystyrène, nanoparticules d'or (AuNPs), nanofils d'or (AuNWs), nanotube de carbone, plaque d'or [30].

Les biocapteurs colorimétriques ont attiré une grande attention en raison de leur lecture facile et de leur détection visuelle rapide à l'œil nu ou à l'aide d'un équipement portable et peu coûteux, qui peut être utilisé pour détecter les analytes en fonction de la variation de couleur [31] ; [28]. Ainsi, Ji et al. [32] ont développé un capteur colorimétrique avec des dendrimères polyamidoamine à terminaison amine chargés positivement pour capturer les bactéries et ont rapporté une limite de détection de  $1,0 \times 10^4$  cellules/mL. D'autres équipes ont validé la détection de protéines [33], de bactéries [34], de virus [35] et de cellules cancéreuses [36], avec des nanoparticules d'or fonctionnalisées. En 2013, les systèmes hybrides constitués de

nanoparticules d'or et de sondes fluorescentes assemblées en surface ont été exploités pour la détection par allumage fluorescent de liposaccharides. Les résultats ont montré que la sensibilité et la sélectivité du LPS dépendaient fortement de l'affinité de liaison entre les sondes fluorescentes et les Au NPs [37]. Toujours en 2013, Zagorovsky et al [38] utilisé, pour la détection d'ADN, un capteur colorimétrique modifié par des nanoparticules d'or (GNP) et cette étude a montré une limite de détection de 500 pM d'ADN pathogène. Le succès des GNP dont la taille varie de 1 nm à plusieurs centaines de nanomètres est dû à leurs fortes propriétés de diffusion de la lumière. L'intensité de la diffusion de la lumière est fonction de la taille de la particule. De plus, les GNP peuvent être facilement conjuguées à une ou plusieurs protéines ou à une ou plusieurs molécules d'ADN modifiées par des liaisons sulfhydryles. Ces propriétés font des GNP un outil utile pour la détection moléculaire ultrasensible [39].

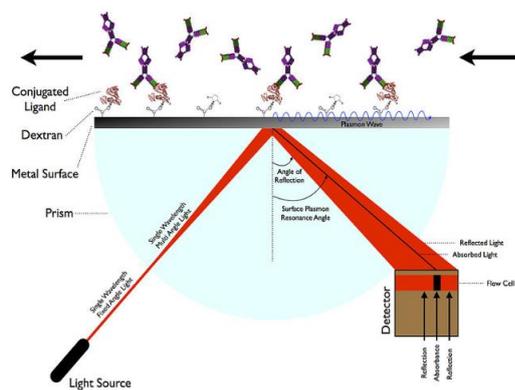


Figure 8: représentation d'un biocapteur à résonance de surface plasmon.[40]

L'une des dernières tendances notables dans le domaine des biocapteurs est le développement et l'application de biocapteurs plasmoniques pour la détection de pathogènes. Deux biocapteurs plasmoniques majeurs utilisent la résonance plasmonique de surface (SPR) (figure 8) et la spectroscopie Raman améliorée en surface (SERS), des outils de détection stables et sensibles qui peuvent détecter de faibles concentrations bactériennes [41]. La détection d'*E.coli* O157:H7 par un capteur à résonance plasmonique de surface a utilisé trois méthodes de préparation d'échantillons de bactéries : non traitées (viables), tuées par la

chaleur puis trempées dans de l'éthanol à 70 %, et lissées par un détergent. La surface de détection SPR était constituée d'un anticorps monoclonal immobilisé sur une monocouche d'alkanethiols auto-assemblés (SAM) terminés par -COOH et -OH sur une surface en or. La limite de détection (LOD) de chaque méthode est déterminée par le décalage minimum mesurable de la longueur d'onde de résonance correspondant à la liaison spécifique d'*E.coli* O157:H7 et à la liaison ultérieure d'un anticorps pour l'amplification. Les échantillons contenant du détergent produisent la limite de détection la plus basse, soit  $10^4$  UFC/mL, tandis que la limite de détection était de  $10^5$  UFC/mL pour les échantillons tués par la chaleur et de  $10^6$  UFC/mL pour les échantillons non traités, respectivement[40].

### V.3 Biocapteurs électrochimiques

Les biocapteurs électrochimiques ont été intensivement étudiés et bien développés pour la détection des bactéries pathogènes. Les avantages des biocapteurs électrochimiques par rapport à d'autre sont, un faible coût, une réponse rapide, la possibilité de fonctionner dans des solutions turbides et la possibilité de miniaturisation.

#### V.3.1 Biocapteurs ampérométriques

L'une des techniques de détection électrochimique la plus utilisée est la détection ampérométrique. Les capteurs ampérométriques mesurent les changements de courant ou de potentiel causés par l'oxydation ou la réduction de l'analyte électrochimiquement actif dans le système. La réaction d'oxydoréduction implique directement ou indirectement l'analyte, et une relation linéaire entre la concentration de l'analyte et le courant mesuré peut être observée [42], [43].

Les exemples suivants illustrent les différentes méthodes de fabrication de capteurs ampérométriques pour la détection d'*E.coli*, ainsi que leurs limites de détection. Le développement d'une plateforme de biodétection ampérométrique pour la détection d'*E.coli* O157:H7 pathogène a été proposé par Dhull et al. [44]. Le biocapteur développé fonctionne sur le principe des interactions anticorps-antigène, où l'anticorps est lié de manière covalente à la surface de la matrice en couche mince d'oxyde de nickel préparée par pulvérisation. Les capteurs ont une large gamme de détection linéaire de  $10^7$  à  $10^1$  cellules/mL avec une limite de détection significativement basse de 1 cellule/mL. Les biocapteurs se sont révélés très

spécifiques et sélectifs vis-à-vis de l'espèce cible, même dans des échantillons composés de plusieurs espèces bactériennes.

Dans une autre étude, une méthode de détection facile d'*E.coli* a été établie sur la base de l'activité enzymatique de la -D-galactosidase (Gal) intracellulaire [45]. La bactérie a d'abord été traitée avec un inducteur d'expression génétique (isopropyl--D-thiogalactopyranoside IPTG), conduisant à l'augmentation du niveau d'expression de Gal à l'intérieur d'*E.coli*. Ensuite, l'hydrolyse du 1-naphtyl-D-galactopyranoside en 4-aminonaphtol par Gal a eu lieu, facilitant par un traitement de perméabilisation la détection de la bactérie. La détection électrochimique du 4-aminonaphtol amplifiée par un cycle d'oxydoréduction électrochimique a conduit à une limite de détection de  $10^5$  UFC/mL pour 30 min de traitement IPTG. Grâce à cette méthode, une limite de détection de 1,0 UFC/mL a été atteinte avec un traitement IPTG de 4 heures, sans amplification d'ADN ni protocole d'immunodosage [45].

Un autre immunocapteur ampérométrique a été développé pour la détection rapide d'*E.coli* O157:H7 tué par la chaleur [46]. Cet immunocapteur a été préparé comme suit. Tout d'abord, le chlorhydrate de 11-amino-1-undécane-thiol (AUT) à longue chaîne et à terminaison amine a été auto-assemblé sur la surface d'une électrode en or pour former une monocouche ordonnée, orientée, compacte et stable avec des groupes fonctionnels -NH<sub>2</sub> qui pourraient immobiliser des nanoparticules d'or. Ensuite, des couches successives de AuNPs et d'un nanocomposite formé par la combinaison de chitosan-nanotubes de carbone multiparois et de nanoparticules de SiO<sub>2</sub>/thionine ont été ajoutées. Enfin, l'anticorps *anti-E.coli* O157:H7 a été lié de manière covalente à la monocouche d' AuNP et sa bioactivité a été mesurée par ampérométrie. Dans des conditions optimales, la courbe d'étalonnage pour *E.coli* O157:H7 avait une plage de travail de  $4,12 \times 10^2$  -  $4,12 \times 10^5$  UFC/mL, et le temps total d'analyse était inférieur à 45 minutes.

### V.3.2 Biocapteurs potentiométriques

Les biocapteurs potentiométriques mesurent la différence de potentiel électrique ou la force électromotrice entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Le processus électrochimique est non faradique, avec un courant nul ou négligeable dans la cellule électrochimique, et la différence de potentiel est générée par l'accumulation de la densité de charge à la surface de l'électrode de travail. Une équipe espagnole a démontré que la détection et l'identification sans marquage de bactéries vivantes dans des échantillons complexes réels peuvent être réalisées en quelques minutes et directement, par une méthode simple et sélective, en utilisant un biocapteur potentiométrique basé sur un aptamère. Ce biocapteur

utilise des nanotubes de carbone à paroi comme excellent transducteur ion-électron et des aptamères immobilisés de manière covalente comme éléments de biorecognition. Une détection hautement sélective de bactéries vivantes avec une réponse linéaire immédiate allant jusqu'à  $10^4$  UFC/mL a été validée avec une limite de détection de 6,0 UFC/mL [47]. Dans le même contexte, un capteur potentiométrique a été développé par Tian et al. [48]. Il s'agit d'un capteur potentiométrique adressable par la lumière (LAPS) réalisé avec des nanoréseaux de ZnO hautement orientés, utilisé pour la détection sans marqueur d'ADN bactérien pour la détection de l'ADN d'*E.coli* O157:H7.

La fonctionnalisation de la surface a été réalisée en utilisant l'immobilisation covalente de l'ADN simple brin (ssDNA) de la sonde spécifique sur la surface du capteur. Les résultats indiquent que des changements de signaux distincts peuvent être enregistrés pour détecter le ssDNA d'*E.coli* cible dans la gamme de concentration  $10^{-10}$  UFC/mL. La limite inférieure de détection du ssDNA cible correspondait à  $1,0 \times 10^2$  UFC/mL d' *E.coli* O157:H7.

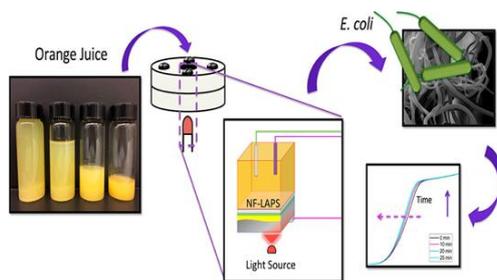


Figure 9: Représentation schématique du capteur NF-LAPS comprenant un système à trois électrodes. D'après Shaibani et al. [49],

Shaibani et al. [49] ont développé des capteurs pour la détection d'*E.coli* dans le jus d'orange, en utilisant un capteur potentiométrique adressable par la lumière (LAPS) portable en nanofibre. Ils ont choisi comme couche sensible une nanofibre d'hydrogel de poly (vinyl/alcool)/poly (acide acrylique) (PVA/PAA) électrospunté sensible au pH et fonctionnalisé avec du D-mannose. Ce capteur a permis la détection en temps réel des espèces bactériennes en moins d'une heure, avec une limite de détection de  $10^2$  UFC/mL. Une haute sélectivité du biocapteur pour *E.coli* par rapport à la *Salmonella Typhimurium*, fermenteur de sucre, a été obtenue, attribuée par les auteurs à la présence de D-mannose à la surface de la nanofibre.

### V.3.3 Détection par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS)

Les mesures d'impédance sont devenues de plus en plus populaires en tant qu'outil de détection sans marqueur pour de nombreux types de biocapteurs, au cours des dernières années. Le principe de la détection par spectroscopie d'impédance électrochimique est basé sur l'analyse en fonction de la fréquence de l'impédance complexe générée entre l'électrode de travail et la contre électrode. Les biocapteurs basés sur les mesures d'impédance sont préparés sur des électrodes de telle sorte que le transfert d'électrons est modulé sélectivement par l'analyte [50]. Un biocapteur électrochimique très sensible a été développé par Krupinska et al [51] pour la détection d'*E. coli* dans l'eau suivant cette méthode. Le système de détection est fabriqué à l'aide de deux électrodes en or dans une cellule à écoulement modifiée avec des anticorps polyclonaux contre *E. coli* (figure 10). Les résultats sont prometteurs et montrent que la détection sans marqueur de traces d'*E. coli* est possible avec une modification simple et directe de la surface de l'électrode pour une gamme de détection linéaire allant de 10 à  $10^3$  UFC/ml.

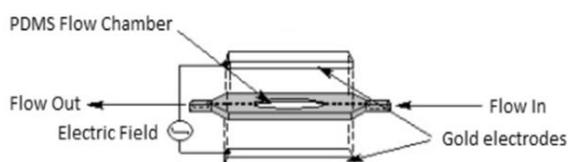


Figure 10: Image schématique d'une cellule à écoulement avec une configuration à deux électrodes. D'après Krupinska et al [51].

Toujours avec la même méthode de détection, l'immobilisation des anticorps à l'électrode d'or a été effectuée par un intermédiaire acylamino ester stable généré par le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) et le N-hydrosuccinimide (NHS), qui pourrait condenser les anticorps de manière reproductible et dense sur la monocouche auto-assemblée (SAM). La résistance du transfert électrique augmente en fonction de l'immobilisation des anticorps et de l'adhésion des cellules *E. coli* à l'électrode. Ce changement est directement détecté par spectroscopie d'impédance électrochimique en présence de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  comme sonde redox [52]. Afin de détecter les bactéries Gram négatif, une équipe brésilienne a choisi de travailler sur des biocapteurs avec des électrodes en or, fonctionnalisées avec des nanoparticules d'or modifiées avec de la cystéine, auxquelles ils ajoutent des peptides antimicrobiens de type clavanine A (figure 11). Les modifications au

niveau des électrodes ont été évaluées par spectroscopie d'impédance électrochimique et analysés par voltamétrie cyclique [53] . Le capteur différencie avec succès les concentrations d'*E.coli* ATCC 2522 entre  $10^1$  et  $10^4$  UFC. Par conséquent, le biocapteur proposé est une alternative utilisable et simple pour la détection bactérienne avec une utilisation possible pour une détection quantitative.

Les biocapteurs présentés dans cette section ont démontré leurs performances en termes de sensibilité, de sélectivité et de reproductibilité. En utilisant différents types de matériaux, les chercheurs dans ce domaine ont pu démontrer leur capacité optique, électrique ou chimique pour la détection de micro-organismes.

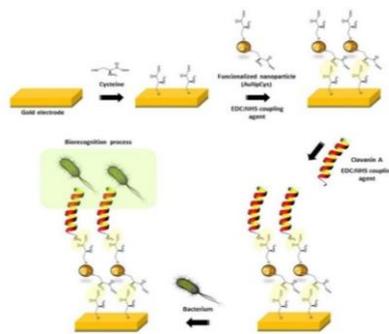


Figure 11: Représentation schématique d'un capteur réalisé à partir d'électrodes en or fonctionnalisées  
D'après De Miranda et al.[53],

#### V.4 Biocapteur piézoélectrique

Pour comprendre comment fonctionne un capteur de force piézoélectrique, nous devons d'abord l'examiner de l'intérieur. Nous trouverons toujours un cristal piézoélectrique, comme le quartz, au cœur du capteur. Les matériaux piézoélectriques sont des matériaux qui produisent une charge électrique lorsqu'ils sont soumis à une contrainte mécanique. Le principe est très simple : la charge électrique obtenue est proportionnelle à la contrainte mécanique appliquée. Un amplificateur de charge peut convertir cette charge en un signal de 0...10 V facile à mesurer. En fin de compte, la tension de sortie est proportionnelle à la contrainte mécanique.

Ces biocapteurs sont basés sur la mesure de l'oscillation d'un cristal de quartz sur lequel est immobilisé le composé biologique (figure 12). En effet, un cristal de quartz présente l'avantage de pouvoir osciller sous l'effet d'un stimulus électrique lorsqu'il est plongé partiellement ou totalement dans un milieu liquide. Cette caractéristique permet de quantifier tout changement de masse à la surface du cristal de quartz à condition que les propriétés physico-chimiques du milieu soient connues. Une modification de la masse va entraîner un changement quantifiable de la fréquence de résonance. Ces biocapteurs présentent l'avantage de donner des réponses rapides mais ont une sélectivité qui dépend de la couche active et peuvent manquer de sensibilité en fonction du système oscillant utilisé.

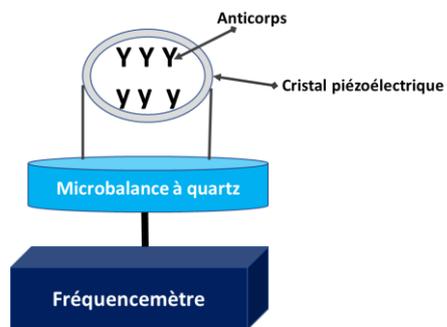


Figure 12: représentation schématique d'un biocapteur piézoélectrique..

## VI. Nanomatériaux et nano-objets pour la détection des *E. coli*

L'utilisation des nanoparticules et des nano-objets augmente dans le domaine de la santé et du bien-être, notamment pour la détection ou l'étude de leurs effets sur les bactéries pathogènes. En raison de leur petite taille (<100 nm), les nanoparticules ont une surface spécifique plus importante que les mêmes matériaux à plus grande échelle. Les effets quantiques sont importants et peuvent être bénéfiques pour la biodétection. En outre, en dessous d'une taille d'environ 20 nm, une réactivité de surface accrue apparaît en raison de l'énergie de surface [54]. C'est cette caractéristique qui leur confère une réactivité chimique et de nouvelles propriétés physiques (optiques, mécaniques, électriques et magnétiques) qui

sont intéressantes pour interagir avec les systèmes biologiques, notamment dans le cas de la reconnaissance des espèces biologiques.

Les nanoparticules sont utilisées soit pour leur capacité à amplifier le signal de détection, soit pour leurs actions biologiques sur la détection. De plus, l'utilisation des nanoparticules est compatible avec la fabrication de biocapteurs ultra-sensibles, rapides, petits et portables (par exemple utilisables sous forme de patches). Ainsi, les nanoparticules contribuent à l'émergence de nouvelles techniques de détection mais aussi de nouvelles méthodes de transduction.

En ce qui concerne la détection d'agents pathogènes, les efforts se concentrent sur certaines propriétés des nanoparticules [55], [56]. Il existe plusieurs méthodes de détection d'espèces biologiques, dont *E. coli*, utilisant les propriétés spécifiques des nanoparticules, dont les plus courantes et les plus prometteuses sont les méthodes de détection électrochimique, optique, magnétique et gravimétrique.

D'autre part, les progrès récents des micro-nanotechnologies ont conduit à l'émergence de dispositifs innovants avec l'intégration de nano-objets tels que les nanofils (Silicon nanowires NWs), les nanotubes de carbone (Carbon nanotubes CNTs) et les nanomatériaux dans les biocapteurs.

L'utilisation de biocapteurs à base de nanoparticules/nano-objets combinant un mécanisme de reconnaissance biologique et une technique de transduction physique est très prometteuse pour détecter des agents pathogènes rapidement et avec précision. En raison de leur rapport surface/volume élevé, les nanostructures sont des sondes fonctionnelles et potentielles pour la détection d'espèces biologiques, car leurs dimensions sont comparables à celles des espèces chimiques et biologiques à détecter. Ces éléments peuvent être associés à des couches sensibles spécifiques pour permettre une détection chimique sélective. De plus, l'utilisation de nanostructures est compatible avec la miniaturisation des biocapteurs, ce qui offre plusieurs avantages, notamment une consommation réduite d'échantillons et de réactifs et une sensibilité accrue avec des puces jetables rentables grâce à la production de masse. Ces nano-objets en tant que nano-capteurs biochimiques sont prometteurs pour une détection sans marqueur, en temps réel et sensible aux biomolécules. Leur fonctionnalisation basée sur la modification chimique des surfaces permet une détection plus spécifique. Ils ont montré un grand intérêt dans les nombreuses études de biorecognition pour des analyses biologiques telles que l'ADN, les protéines, les bactéries ou les virus.

### VI.1 Biocapteurs électrochimiques à base de nanoparticules

Les effets combinés des propriétés électroniques et de l'activité électro-catalytique de certaines nanoparticules peuvent être un avantage pour la détection électrochimique (voltamétrie, impédancemétrie, ampérométrie...). En général, ces méthodes combinent des outils pour l'amélioration du signal électrochimique, et la reconnaissance d'éléments biologiques.

Par exemple, un matériau anodique, combiné à des nanoparticules liées à un agent biologique pour cibler les bactéries ou agissant comme des marqueurs, peut être utilisé dans les biocapteurs. Différents signaux de détection peuvent alors être obtenus en fonction de la méthode de détection. En particulier, un travail récent [55] a rapporté la détection d'*E. coli* en utilisant la voltampérométrie différentielle à impulsions, en intégrant des nanoparticules d'or sur la surface d'un composite polypyrrole-oxyde de graphène réduit (PPy-rGO) pour l'immobilisation d'un anticorps de capture (Ab1), et conjugué sur un composite polypyrrole-nanoparticules d'or dopé au ferrocène pour l'immobilisation d'un anticorps de détection (Ab2) (figure 13). Dans ce cas, la fixation de l'Ab2 permet la génération d'électrons par l'oxydation du ferrocène. En raison de la surface de détection importante, de la bonne conductivité et de la biocompatibilité du nanocomposite, la détection sans enzyme d'*E. coli* K12 a été démontrée, avec une gamme linéaire de  $1,0 \times 10^1$  à  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL et une faible limite de détection de 10 UFC/mL.

Une autre approche pourrait être l'utilisation d'un matériau anodique combiné à des nanoparticules pour augmenter la surface de l'électrode de travail et améliorer le transfert d'électrons, conduisant à un signal électrochimique plus élevé.

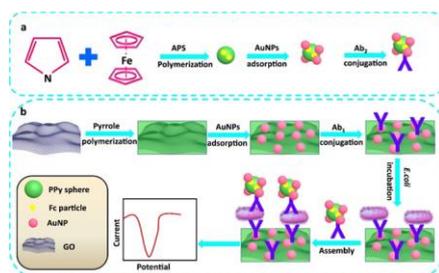


Figure 13: Illustration schématique de la préparation du nanocomposite PPy-rGO/AuNPs, suivie de la fixation d'Ab1 pour la détection d'*E. coli* K12. D'après Zou et al [55].

Une autre étude récente a rapporté la détection photo-électrochimique de bactéries avec des nanofils d'oxyde de zinc (ZnO) modifiés avec des nanoparticules d'or (AuNPs) et des « quantum dots » de CdS (CdS-QDs) comme matériau photo anodique[57]. En effet, l'oxyde de zinc est un bon semi-conducteur pour les biocapteurs de détection photochimique[58], et sa forme en nanofils augmente la surface de l'électrode. Dans ce cas, les « quantum dots » favorisent l'absorption de la lumière de l'UV à la région visible et les nanoparticules d'or améliorent le transfert des électrons. Dans l'étude rapportée par Dong et al[57], la détection d'*E. coli* O157:H7 a été assurée après l'assemblage de l'élément de reconnaissance biologique aptamère au complexe ZnO/AuNPs/QDs-CdS (figure 14). Les résultats ont montré une détection linéaire sur une gamme de 10 à 10<sup>7</sup> UFC/mL avec une limite de détection de 1,125 UFC/mL. Cette approche est une bonne alternative pour une détection des bactéries à faible bruit, rapide et ultra-sensible par rapport à la détection électrochimique classique.

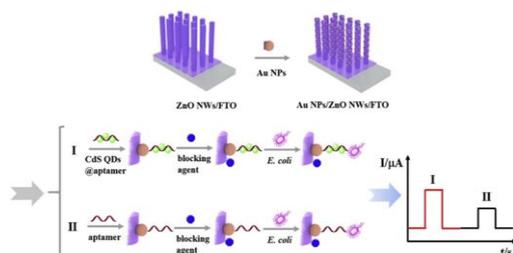


Figure 14. Processus d'assemblage de la biodétection photoélectrochimique d'*E. coli* O157:H7. Le processus I indique la réponse PEC basée sur l'aptamère/CdS QDs/Au NPNWs comme contrôle. D'après Dong et al. [57].

## VI.2 Biocapteurs optiques à base de nanoparticules

Les principales méthodes de détection optique d'*E. coli*, basées sur les nanoparticules, sont la colorimétrie, la fluorescence et la résonance plasmonique de surface (SPR). En particulier, l'utilisation de nanoparticules est particulièrement intéressante pour la détection d'éléments biologiques par la technique SPR, grâce à la présence de pics d'absorption intenses conduisant à une amplification de la détection, ou au changement d'indice de réfraction à la surface du capteur en fonction de la concentration de l'analyte et permettant d'étudier des interactions moléculaires en temps réel et sans marquage. Par exemple, une étude a montré une réduction de la limite de détection de *E. coli* par un facteur de 5500 par rapport à un capteur sans utilisation de nanoparticules d'or [59]. Plus récemment, une détection SPR hautement sélective d'*E. coli* à une faible limite de détection de 0,57 UFC/mL dans l'urine a

été rapportée en utilisant des nanoparticules d'argent piégées dans un mélange de polymères imprimés pour augmenter la sensibilité du capteur (figure 15) [60].

Dans le cas d'une détection par fluorescence, des « quantum dots » semi-conducteurs (CdSe/Zn,...) combinés avec un agent biologique sont utilisés, en raison de leurs propriétés de fluorescence d'une intensité plus élevée que les fluorophores classiques [61], [62]. Dans le cas des « quantum dots », il est possible d'adapter leur spectre d'émission de fluorescence en fonction de leur taille et de leur composition [63], [64], ce qui les rend très attractifs pour la détection des bactéries. De plus, grâce à la grande sélectivité de ces biorécepteurs, une détection multiple dans le même échantillon pourrait être possible [65], [66].

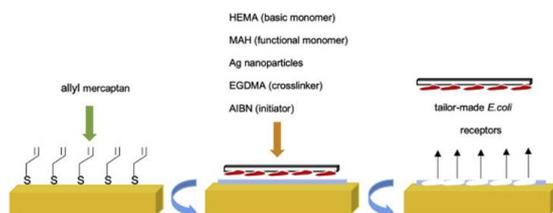


Figure 15: Représentation schématique de la synthèse d'un film polymère imprimé d'*E. coli* par la technique d'impression par microcontact. D'après Özgür et al. [60].

Récemment, une étude à partir d'un smartphone utilisant des complexes type « quantum dots » de graphène/nanoparticules d'argent (GQDs/AgNPs) pour la détection d'*E. coli* a été démontrée [67] (figure 16). Dans ce cas, les « quantum dots » de graphène sont utilisés pour amplifier et stabiliser le signal luminescent, les modules fonctionnels sur smartphone pour l'excitation de la tension et la capture de la luminescence, et l'analyse de l'image de luminescence ; sur la base de ce système, la détection d'*E. coli* a été démontrée dans une réponse linéaire dans la gamme de concentration  $10^{-10}$  à  $10^{-7}$  UFC/mL avec une limite de détection de 5 UFC/mL.

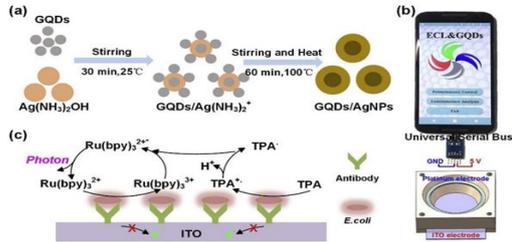


Figure 16: Détection d'E. coli utilisant un smartphone. (a) Préparation des nanocomposites GQDs. (b) Système ECL basé sur un smartphone avec électrode ITO et électrode de platine. (c) Principe de l'ECL pour la détection d'E. coli. D'après Li et al. [67].

### VI.3 Biocapteurs magnétiques à base de nanoparticules

Les nanoparticules magnétiques possèdent des propriétés spécifiques (biocompatibilité, non-toxicité et présence de groupes fonctionnels) et présentent un intérêt pour les biocapteurs ultrasensibles et la détection de pathogènes multiples. De plus, certaines nanoparticules magnétiques hybrides fournissent des méthodes de détections variées et efficaces grâce au couplage de leurs propriétés magnétiques à leurs propriétés électriques [68],[69] ou optiques [70]-[71]. En particulier, la combinaison de nanoparticules magnétiques avec des agents biologiques est une stratégie efficace pour l'identification, la pré-concentration et la séparation d'une souche bactérienne dans un analyte donné par l'application d'un champ magnétique. Les nanoparticules magnétiques peuvent être utilisées comme supports homogènes pour la capture de cibles et l'électrode comme élément de détection.

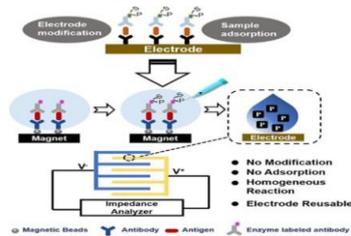


Figure 17 : Illustration de la méthode d'impédance basée sur les billes magnétiques pour la détection d'E. coli O157:H7, utilisant des électrodes en or interdigitées. D'après Wang et al.[68].

Par exemple, la combinaison d'un complexe sandwich à double anticorps (bille magnétique-anticorps monoclonal anti-*E. coli* O157:H7)-(*E. coli* O157:H7)-(anticorps anti-*E. coli* O157:H7 marqué par une enzyme) a été utilisée pour la détection d'*E. coli* O157:H7, en utilisant un système d'impédance à électrodes d'or interdigitées [68].

Dans ce cas, des limites de détection allant linéairement de  $10^2$  à  $10^6$  UFC/mL ont été atteintes. Un autre travail, a rapporté la détection d'*E. coli* dans le lait dans la gamme  $5-10^8$  UFC/mL avec une limite de détection de 10 UFC/mL par une méthode de fluorescence combinant des « quantum dots » de carbone synthétisés à partir d'écorce d'orange avec des nanoparticules magnétiques ( $Fe_3O_4$ ) préparées par une méthode simple, non polluante, à faible coût et rapide [71].

#### VI.4 Biocapteurs gravimétriques à base de nanoparticules

La méthode de détection gravimétrique est basée sur une microbalance en matériau piézoélectrique (quartz, titanate de plomb zirconium-PZT...) dont le principe est la mesure de la variation de masse, liée à la variation de la fréquence de résonance du matériau piézoélectrique corrélée à la masse de l'analyte déposé sur l'électrode de la microbalance. Grâce aux avantages des nanoparticules positionnées sur une des électrodes de la balance, une meilleure immobilisation des biorécepteurs est possible, et ainsi une amplification du signal de détection et une meilleure sensibilité du capteur peuvent être atteintes. Plusieurs études ont démontré les avantages de l'utilisation de nanoparticules pour la détection d'*E. coli*, mais peu d'études ont rapporté leur détection par la méthode gravimétrique. Cependant, des travaux antérieurs ont montré qu'il est possible d'améliorer les performances d'un biocapteur pour la détection d'*E. coli* O157:H7 par rapport à un capteur conventionnel.

Par exemple, le fait d'utiliser l'affinité élevée et spécifique de liaison à la biotine de la streptavidine pour fixer les nanoparticules d'or ou d'oxyde de fer au brin d'ADN complémentaire, a conduit à des limites de détection de  $2,0 \times 10^3$  UFC/mL et  $2,67 \times 10^2$  UFC/mL, respectivement (figure 18) [72]. Des travaux plus récents ont montré une limite de détection plus élevée, inférieure à  $5 \times 10^5$  UFC/mL et supérieure à  $10^6$  UFC/mL, par chargement direct sur l'électrode en matériau PZT (sans aucune modification des bactéries) [73].

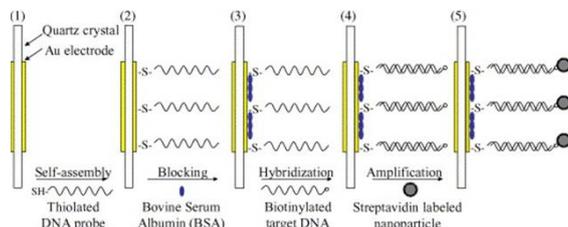


Figure 18: Fabrication d'un capteur à microbalance à cristal de quartz (QCM) et procédure de détection d'*E. coli* O157:H7. D'après Mao et al [72].

### VI.5 Biocapteurs à base de nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone sont aussi considérés comme des matériaux intéressants pour les applications de biodétection, car ces nano-objets peuvent être fonctionnalisés avec des anticorps ou des aptamères pour la détection d'espèces bactériennes. Ils peuvent être synthétisés sous forme de nanotubes de carbone à paroi unique (SWNT-Single Wall Carbon Nano Tube) composés d'une seule couche d'atomes de carbone, avec des rapports d'aspect très élevés (diamètres de l'ordre de 1 nm). A titre d'exemple, Andrade et al. [74] proposent une nouvelle approche pour le développement de biocapteurs nanostructurés basés sur des nanotubes de carbone (CNTs) et des peptides antimicrobiens pour la détection de bactéries (figure 19). Les électrodes en or ont été recouvertes d'une monocouche auto-assemblée de cystéine. Les groupes carboxyles terminaux des NTCs activés par EDC/NHS (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide /N-hydroxysuccinimide) ont permis l'immobilisation covalente des NTCs sur la surface, et ensuite, du peptide antimicrobien clavanine A (ClavA) sur les NTCs. La ClavA immobilisée en surface a ensuite été utilisée pour détecter différentes concentrations de cellules bactériennes par des mesures de spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE). Les agents infectieux testés étaient *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus subtilis*. Ce biocapteur était capable de distinguer des concentrations bactériennes dans la gamme de  $10^2$ - $10^6$  UFC /mL pour *E. coli*, et les auteurs ont montré la capacité du capteur à différencier les bactéries Gram négatif (*E. coli* et *K. pneumoniae*) des bactéries Gram positif grâce à des interactions électrostatiques et hydrophobes avec ClavA.

Par ailleurs, les transistors à effet de champ (FET) à base de nanotubes de carbone sont des configurations récentes de dispositifs de détection. Lorsque le matériel biologique est adsorbé sur la surface des CNT, un transfert d'électrons se produit, ce qui modifie leur conductivité électrique.

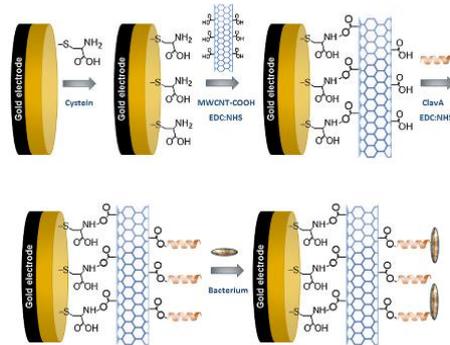


Figure 19: Représentation schématique du capteur nanostructuré basé sur des nanotubes de carbone : le peptide est fixé à la surface des NTC et l'interaction du capteur avec les bactéries est évaluée. D'après Andrade et al. [74].

Cette propriété a été utilisée pour des biocapteurs en fonctionnalisant des transistors à effet de champ basés sur des nanotubes de carbone à mono-feuillets (SWCNT-FET) fonctionnalisés avec un aptamère pour la détection d'*E. coli* par des mesures électriques [75]. Dans ce cas, les SWNT-FET ont montré une diminution de la conductance électrique de plus de 50% après la fixation de  $10^7$  UFC/mL d'*E. coli* sur le SWNT-FET. D'autres travaux ont rapporté [76] l'utilisation de SWCNT-FET fonctionnalisés avec une solution de PASE (1-pyrenebutanoic acid succinimidyl ester) comme molécule de liaison et des anticorps anti-*E. coli* (figure 20). Les changements de la résistance électrique du CNTFET indiquent la possibilité de ce dispositif comme biocapteur pour détecter *E. coli* O157:H7, et une concentration aussi faible que  $8,2 \times 10^2$  UFC/mL a été détectée.

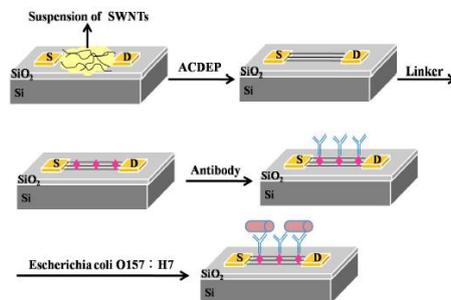


Figure 20: Illustration schématique de la fabrication du biocapteur *E. coli* CNT-FET. D'après Zhang et al. [76].

## VI.6 Biocapteurs à base de graphène

Le graphène est un remarquable matériau bidimensionnel (2D) qui suscite un grand intérêt en raison de son exceptionnelle conductivité électrique et thermique et de son bon comportement mécanique, avec des applications prometteuses dans les dispositifs électroniques, notamment les capteurs. Les méthodes les plus courantes de synthèse du graphène sont le dépôt chimique en phase vapeur (CVD) et l'exfoliation mécanique. Le graphène, qui est une feuille plate d'un seul atome d'épaisseur composée d'atomes de carbone parfaitement disposés en un réseau en nid d'abeille, et présente un grand potentiel pour la biodétection. Huang et al. ont démontré la faisabilité d'un biocapteur à base de graphène pour détecter électriquement *E. coli* avec une sensibilité et une spécificité élevées [77]. Pour détecter spécifiquement *E. coli*, des anticorps anti-*E. coli* ont d'abord été immobilisés sur le film de graphène via l'ester succinimidyle de l'acide 1-pyrène-butanoïque lié au graphène par empilement. Une augmentation significative de la conductance du dispositif en graphène a été observée après exposition à *E. coli* K12 à une concentration aussi faible que 10 UFC/mL, tandis qu'aucune réponse significative n'a été déclenchée par une concentration élevée d'une autre souche bactérienne. Des dispositifs FET à base de graphène fonctionnalisés avec des anticorps ou des peptides antimicrobiens (AMP) ont aussi été utilisés pour la détection électronique d'*E. coli*. Thakur et al. ont développé un transistor à effet de champ à base d'oxyde de graphène thermiquement réduit (rGO FET) passivé par une couche ultrafine d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  (figure 21) [78]. L'auto-assemblage de thiol a été utilisé pour ancrer le GO aux électrodes Au interdigitées avec des doigts espacés de 2  $\mu\text{m}$ .

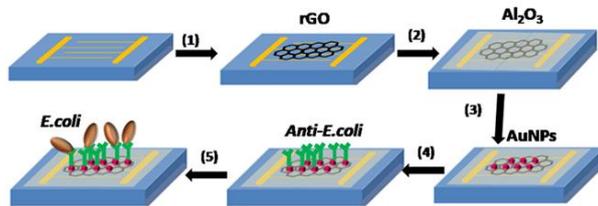


Figure 21 : Schéma décrivant les différentes étapes de la fabrication d'un capteur FET (1) auto-assemblage de rGO (2) dépôt d'une couche atomique d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  (3) dépôt de AuNPs (4) immobilisation d'anti-*E. coli* et (5) détection d'*E. coli* D'après Thakur et al. [78].

Pour fixer une grande quantité d'anti-*E. coli*, des nanoparticules d'au (NP) fonctionnalisées par du glutathion ont été pulvérisées sur le FET. L'anti-*E. coli* fixé à la surface des NP d'au capture sélectivement les *E. coli*, ce qui entraîne une modification de la conductivité électrique du canal rGO. La conductivité électrique du capteur a été enregistrée en mesurant le changement du courant de drain pour différentes concentrations de solutions d'*E. coli*. La forte densité de charges négatives à la surface des cellules d'*E. coli* a fortement modulé la concentration des porteurs de charge majoritaires dans la monocouche, ce qui permet de surveiller en temps réel la concentration d'*E. coli* dans un échantillon donné. Avec une faible limite de détection unicellulaire, le capteur FET présentait une plage de détection linéaire de 1 à 100 UFC dans un volume d'échantillon de 1  $\mu\text{L}$  (soit  $10^3$  à  $10^5$  UFC/mL) [78].

Des techniques ont également été utilisées pour produire des nanorubans de graphène de moins de 10 nm de large, qui sont intéressants en raison du confinement quantique des électrons et des effets de bord. À titre d'exemple, Chen et al. ont mis en évidence un nouveau dérivé du graphène, l'oxyde de graphène réduit holey (hRGO), fonctionnalisé avec de la Magainin I chargée positivement pour lier les bactéries Gram-négatives par interaction électrostatique [79]. Même après la fonctionnalisation, ce matériau a conservé ses propriétés électroniques. D'autres auteurs ont aussi démontré la faisabilité d'un biocapteur à base de graphène pour détecter électriquement *E. coli* avec une sensibilité et une spécificité élevées [80].

Kaur et al. ont utilisé les interactions bactériennes-ADN à l'aide d'un capteur à électrode nanostructurée, en utilisant des CNT dans les directions transversale et longitudinale et le pontage ultérieur avec du téréphtalaldéhyde (TPA), pour former du graphène d'armature ponté en 3D. Ce matériau présente des propriétés électriques améliorées et facilite la fonctionnalité

chimique. Il a été fonctionnalisé avec un aptamère ADN anti-*E. coli* spécifique. Le capteur aptastructuré développé a démontré une faible limite de détection et une sensibilité de  $\sim 10^1$  UFC/mL envers *E. coli* [81].

### VI.7 Biocapteurs à base de nanofils de silicium

Les nanofils de silicium sont également des sondes fonctionnelles potentielles pour la détection des agents pathogènes en raison de leurs propriétés physiques uniques. Leur structure unidimensionnelle fournit le plus petit confinement pour le transport des électrons dans la direction longitudinale, leur grande surface favorise l'interaction entre les cellules cibles et les nanomatériaux, ce qui conduit à une plus grande sensibilité. Ils offrent des avantages uniques pour le développement de capteurs de pathogènes à plusieurs égards. Ces avantages à petite échelle sont la possibilité de production en masse et la réduction des coûts unitaires grâce aux progrès récents des technologies de micro et nanofabrication compatibles avec la technologie du silicium CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor), rendant possible la fabrication de laboratoire sur puce pour la détection rapide des bactéries, ce qui pourrait révolutionner la prévention sanitaire. Quelques travaux ont été rapportés sur l'utilisation des SiNWs comme unités sensibles pour les espèces chimiques et biochimiques, mais peu ont rapporté la pertinence de l'utilisation de réseau de nanofils de silicium, en particulier pour la détection des bactéries.

L'intérêt des capteurs utilisant les SiNWs comme unités sensibles repose sur une grande surface de contact (rapport surface/volume élevé pour chaque nanofil) permettant des interactions potentielles importantes avec les bactéries, induisant un changement de la conduction électrique à travers le réseau de nanofils de silicium après leur fixation. En effet, lorsque le dispositif avec des nanofils fonctionnalisés est exposé à des macromolécules ayant une charge électrique nette positive ou négative, cela conduit à une modification de la densité de charge à la surface du nanofil, et donc à une modification de la résistance électrique globale. Ainsi, Le Borgne et al [82] ont démontré la détection d'*E. coli* ATCC 35218 dans la gamme  $8 \times 10^3$ - $8 \times 10^8$  UFC/mL en utilisant une résistance électrique basée sur un réseau de SiNWs non fonctionnalisés. D'autres travaux ont montré que les nanostructures favorisent l'adhésion des cellules, y compris des bactéries. En particulier, Wang et al. [83] ont rapporté que la densité de greffage sur les réseaux de nanofils modifiés était beaucoup plus élevée que sur le silicium massif, ce qui conduit à une adhésion bactérienne plus élevée sur les réseaux de nanofils. En outre, certaines études ont montré que ces nanostructures et leurs propriétés

physico-chimiques spécifiques peuvent être utilisées pour réguler les réponses et les mouvements des cellules bactériennes.

## VII. Résumé des différentes techniques pour la détection d'*E. coli*

Nous avons expliqué précédemment que la détection rapide et sensible des bactéries pathogènes est extrêmement importante pour le diagnostic médical ou pour le contrôle des agents pathogènes dans divers produits alimentaires. Les limites de la plupart des méthodes de diagnostic conventionnelles sont un manque d'ultra-sensibilité ou un retard dans l'obtention des résultats.

Le tableau 1 compare l'état de l'art des biocapteurs basés sur des nano-objets mesurant la présence ou l'activité d'*E. coli*, en termes de sensibilité, spécificité, reproductibilité, ainsi que les limites et avantages de la simplicité et de la transportabilité liés à la méthode de détection. La détection devient plus sensible et plus flexible en utilisant des nanoparticules comme marqueurs, et les méthodes de détection électrique en temps réel sont dominants par rapport aux méthodes optiques.

Les biocapteurs basés sur des nano-objets pour la détection d'*E. coli* présentent un intérêt particulier pour une détection sans marqueurs, en temps réel, ultra-sensible et sélective, afin de lutter efficacement contre les infections d'origine alimentaire, par exemple.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés au développement de ces capteurs en raison de leur intégration potentielle dans les laboratoires biologiques sur puce, qui les distinguent des autres technologies de capteurs disponibles aujourd'hui.

## ANNÉE 2022

Table 1: résumé des récents biocapteurs basés sur des nano-objets pour la détection d'*E. coli*.

Nano-material	Bacteria	Detection technique	Range concentration (UFC/mL) <sup>a</sup>	Detection limit (UFC/mL) <sup>a</sup>	Characteristics
ZnO nanorods array	<i>E. coli</i> O 157:H7 (DNA)	Light-addressable potentiometry	10 - 10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	Label-free, sensitive and effective detection of bacterial DNA [49]
Cysteine modified gold NPs	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Cyclic voltammetry and impedance spectroscopy	1- 10 <sup>4</sup>	-	Viable, simple and specific detection [54]
Polypyrrole-reduced graphene oxide modified gold nanoparticles	<i>E. coli</i> K12	Pulse difference voltammetry	10 - 10 <sup>7</sup>	10	Enzyme free, good stability, high selectivity and excellent reproducibility detection [58]
ZnONWS/AuNPs/QD-Cds composites	<i>E. coli</i> O 157:H7	Photo-electrochemical (amperometry)	10 - 10 <sup>7</sup>	1.125	Low noise, fast, and ultrasensitive detection [59]
Silver nanoparticles	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Surface plasmon resonance	1.5x10 <sup>1</sup> - 1.5x10 <sup>6</sup>	0.576	Real-time, label-free, selective, and low detection limit [62]
Graphene quantum dots/SilverNPs nanocomposites	<i>E. coli</i>	Electrogenerated chemiluminescence	10 - 10 <sup>7</sup>	5	Low-cost, real-time, smartphone based detection [69]
Carbon quantum dots/magnetic nanoparticles(Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	<i>E. coli</i> O 157 :H7	Fluorescence	500 - 10 <sup>6</sup>	487	Sensitive, specific detection with low-cost, simple method for preparation of nanocomposites[84]
Single walley carbon nanotubes	<i>E. coli</i>	Impedance spectroscopy	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	Differentiation of Gram-negative and Gram-positive bacteria, good reproducibility, very sensitive[72]
Single walley carbon nanotubes	<i>E. coli</i> O157:H7	Conductance measurements	8.2x10 <sup>2</sup> - 8.2x10 <sup>8</sup>	-	Real-time detection, and compatible with electronic platform [78]
Graphene	<i>E. coli</i> K12	Conductance measurements	10 - 10 <sup>5</sup>	-	Real-time detection, and compatible with electronic platform[79]
Graphene	<i>E. coli</i> ATCC 25922	Conductance measurements	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>5</sup>	-	Real-time detection, and compatible with electronic platform[80]
Graphene	<i>E. coli</i> O78:K80:H11	Cyclic voltammetry and impedance spectroscopy	10 -10 <sup>6</sup>	-	Real-time, sensitive and specific detection [83]
Silicon nanowires array	<i>E. coli</i> ATCC 35218	Conductance measurements	8x10 <sup>3</sup> - 8x10 <sup>8</sup>	-	Real-time detection, and compatible with CMOS electronic platform [83]

## VIII. Conclusion

Ce premier chapitre nous a permis de décrire spécifiquement les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), respectivement Gram négatif et positif, qui seront utilisées dans nos expérimentations. Nous avons également décrit et comparé différents types de biocapteurs développés pour surveiller la contamination bactérienne dans les échantillons d'intérêt. Un tableau des différentes techniques nous a permis de comparer l'état de l'art dans ce domaine. En raison du grand intérêt des nanomatériaux pour améliorer la sensibilité et la sélectivité des biocapteurs, une attention particulière est portée sur le rôle des nano-objets dans les biocapteurs.

Le travail présenté dans ce manuscrit s'est focalisé sur la fabrication d'un biocapteur basé sur des nanofils de silicium pour la détection par mesure électrique en temps réel de bactéries pathogènes. Le choix du silicium comme matériau de fabrication des nanofils se justifie par le fait que ce dernier se positionne comme le candidat idéal et qu'il est l'élément le plus utilisé et le mieux maîtrisé dans le domaine de la micro-électronique.

Dans le chapitre II, nous présenterons les principales techniques de synthèses des nanofils de silicium, ainsi que des dispositifs à base de ces nanofils.

## **Chapitre 2**

# **Synthèse et fabrication de dispositifs à base de nanofils de silicium**

**ANNÉE 2022**

## I. Introduction

L'électronique intégrée ne cesse de se développer suite à une demande de réalisation de circuits électroniques et de micro-systèmes intégrés de plus en plus performants, plus précisément en termes de miniaturisation mais aussi intégrant de nouvelles fonctionnalités grâce aux développements des nanosciences et des nanotechnologies. Ils sont présents dans plusieurs domaines comme la mécanique, l'électronique, la médecine actuellement en plein essor, et constituent un domaine transversal entre la physique, la chimie et la biologie. Parmi les nombreux nano-objets, les nanofils suscitent actuellement un grand intérêt pour leurs propriétés induites par leur structure unidimensionnelle. Un nanofil présente une structure unidimensionnelle mille fois plus fine qu'un cheveu. Les nanofils présentent des propriétés importantes vis-à-vis des problématiques de relaxation, de transport et de confinement électronique ou optique. A l'échelle nanométrique, la matière présente des propriétés particulières qui peuvent justifier une approche spécifique. Il s'agit bien-sûr des propriétés quantiques, mais aussi des effets du rapport de surface / volume, ou encore d'effets de bord. Grâce au facteur de forme (rapport surface/volume) élevé des nanofils, leur utilisation comme éléments sensibles laisse une grande possibilité de développement de capteurs innovants présentant une sensibilité élevée, particulièrement intéressant par exemple pour le diagnostic des maladies infectieuses ou la détection de la mutation d'ADN[89].

Par ailleurs, les nanofils de silicium s'inscrivent dans la course vers la miniaturisation pour augmenter la densité d'intégration des composants microélectroniques dans les circuits intégrés. Le choix du silicium comme matériau de fabrication des nanofils se justifie par le fait que, ce dernier se positionne comme le candidat idéal et qu'il est l'élément le plus utilisé et le mieux maîtrisé dans le domaine de la micro-électronique. Les applications potentielles des nanofils de silicium sont nombreuses vis-à-vis de leurs méthodes de fabrication et leurs dimensions. Comme pour les dispositifs microélectroniques classiques, ces nanofils peuvent être utilisés pour des applications dans l'électronique, les capteurs et l'optique. En particulier, la fabrication de transistors à effet de champ avec un nanofil comme élément de canal, ainsi que l'intégration de ces transistors pour le développement de tels capteurs fait actuellement l'objet de nombreuses études. Les nanofils peuvent également être utilisés dans les diodes PIN, comme éléments de dispositifs comme contacts électriques, ou encore comme partie active du composant s'ils possèdent des propriétés semi-conductrices adéquates. Enfin, les nanofils ont un intérêt particulier comme éléments sensibles pour les capteurs biologiques.

Ce chapitre a pour but de présenter les principales techniques de synthèses des nanofils de silicium, dans le domaine de la nanotechnologie, ainsi que les dispositifs à base de ces nanofils, et d'explicitier la méthode utilisée dans nos travaux.

## II. Technique de synthèse des nanofils de silicium

La synthèse des nanofils de silicium peut être effectuée selon deux approches possibles : ascendante (bottom-up) ou descendante (top-down).

### II.1 Synthèses par la méthode « Bottom-up »

L'approche ascendante ou la méthode « bottom-up », repose sur l'assemblage de blocs élémentaires (atomes ou molécules) pour constituer les nanofils. Plusieurs méthodes de synthèses utilisant cette approche existent, les plus connues sont : la méthode VLS (Vapeur Liquide Solide) et la méthode SLS (Solide Liquide Solide) dont la croissance des nanofils se fait à l'aide d'un catalyseur métallique (Or, cuivre, aluminium...).

Il existe des méthodes de croissance en solution et d'autres en phase vapeur [90]. Les méthodes en phase vapeur ont été largement utilisées pour l'élaboration des nanofils. Elles incluent les méthodes physiques telles que l'ablation laser [91] et l'évaporation thermique [92] et les méthodes chimiques telles que le dépôt chimique en phase vapeur CVD (Chemical Vapor Deposition). Les méthodes dites en solution incluent le dépôt électrochimique combiné à des Template (ou matrices)[93].

L'avantage de ces méthodes est la production à grande échelle et à bas coût. Les méthodes en phase vapeur permettent un meilleur contrôle de la morphologie des nanofils par rapport à celles en solution [94]. Aujourd'hui, ce sont ces méthodes qui dominent la croissance des nanofils et sont utilisées pour produire des composants semi-conducteurs intégrables dans des composants électroniques. Même avec leurs coté avantageux, elles restent relativement coûteuses. Elles permettent de faire croître des nanofils de différents types de matériaux et offrent un contrôle de la croissance, fournissant la possibilité de réaliser des structures complexes avec les nanofils. Autant les méthodes de fabrication de nanofils sont multiples, autant les types de matériaux produisant des nanofils le sont aussi. Citons les nanofils de métaux, les nanofils de carbures, les nanofils d'oxydes et les nanofils de semi-conducteurs.

Dans la suite, les 3 principaux modes de croissance des nanofils sont présentés.

### II.1.1 Méthode vapeur- liquide-solide (VLS)

La méthode VLS est un mécanisme de croissance interprété pour la première fois par Ellis et Wagner[85], et revu par la suite par Wanger, et Givargizov[85], [86].

Une fois la surface recouverte de métal- catalyseur, le point essentiel dans le mécanisme de croissance VLS est le fait que la goutte forme un alliage liquide à la température de croissance, généralement supérieure à celle de l'eutectique. Dans le cas de l'alliage Au/Si, tandis que la température de fusion de l'or est de 1063°C (figure 1), la température d'eutectique de l'alliage égale à 363°C (avec une composition atomique en Si est de 18,6%) (Figure.22).

La croissance des nanofils passe par 3 étapes :

- (i) L'incorporation sélective des espèces à faire croître depuis la phase vapeur dans la goutte métallique
- (ii) La diffusion de ces espèces à travers et sur la surface de la goutte
- (iii) La cristallisation à l'interface entre la goutte et le substrat

La croissance des nanofils de silicium se fait le plus souvent par procédé CVD. Dans ce cas, le gaz précurseur (le plus souvent du silane) est injecté, et sous l'effet de la température, il va se décomposer d'après l'équation de réaction simplifiée suivante :



La croissance des nanofils de silicium se réalise à l'aide d'or comme catalyseur (le plus utilisé), présenté sur la figure 23. Les atomes de silicium avec les gouttes d'or vont s'associer pour créer un alliage Si-métal jusqu'à saturation en silicium des gouttes. L'injection continue du gaz silane permet la saturation en silicium de la goutte, les atomes de silicium vont s'accumuler à la base des nano-gouttes, puis s'auto-assembler pour former du silicium cristallin. Il se produit alors une croissance qui apparaît sous forme de nanofils dont le diamètre dépend de celui des nano gouttelettes de métal. Une croissance épitaxiale des nanofils est possible à partir d'un substrat de silicium monocristallin (sous certaines conditions de pression, de température de préparation de l'état de surface du substrat).

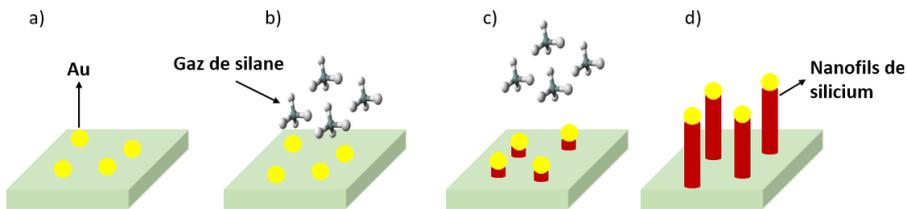
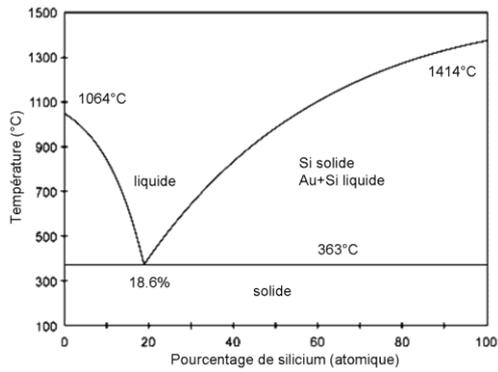


Figure 23: Figure 24 : Schéma représentatif du mécanisme VLS (a) Formation ou dépôt des gouttes catalytiques (or) sur le substrat, (b) chauffage du substrat et envoi du gaz précurseur (silane) (c) sursaturation de goutte, et cristallisation à l'interface goutte-s

La mise en œuvre de la croissance de nanofils par la méthode VLS est peu complexe. Il s'agit néanmoins d'un procédé assez peu reproductible. En effet la croissance des nanofils s'effectue le plus souvent aléatoirement et elle présente une dispersion dans le diamètre des nanofils. De plus, cette technique n'est pas compatible avec la technologie planaire CMOS classique, et une étape de report des nanofils est peut être nécessaire pour une intégration dans des dispositifs électroniques. Toutefois, la méthode VLS laisse entrevoir de réelles perspectives pour le développement d'une électronique 3D (pour la réalisation de transistors verticaux) [87].

De plus, la variation de la composition à l'intérieur du nanofils en contrôlant la composition de la phase vapeur est possible avec cette technique, permettant un dopage des nanofils en silicium lors de la croissance.

La figure 24 montre un cliché MEB de nanofils de silicium obtenus à 460°C par la méthode VLS utilisant l'or comme catalyseur et le silane comme gaz précurseur.

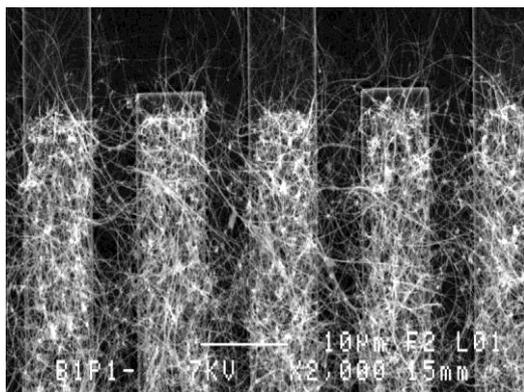


Figure 24: image MEB indiquant la surface des capteurs après la croissance des nanofils de silicium par la méthode VLS. Source IETR.

### II.1.2 Méthode solide liquide solide (SLS)

La technique de croissance SLS a été réalisée pour la première fois par le Laboratoire de Physique des Interfaces et des Couches Minces (LPCIM) de l'école Polytechnique. Elle permet la synthèse des nanofils à basse température (200-350°C) en utilisant l'indium comme catalyseur (température d'eutectique Si/In  $T=180^{\circ}\text{C}$ ). Les nanoparticules d'indium, sont obtenues par l'application d'un plasma PECVD (Plasma Enhanced-CVD) d'oxygène sur une couche d'ITO (Indium Tin Oxide) initialement déposée sur le substrat. Un dépôt de silicium amorphe est ensuite réalisé par voie PECVD sur le substrat. La synthèse d'un nanofil de silicium s'effectue par absorption du silicium amorphe par la nano-gouttelette d'indium qui se déplace sous l'effet d'un recuit pour former le nanofil (figure 25) [88]. La révélation de ces nanofils est obtenue par gravure plasma de la matrice de silicium amorphe n'ayant pas participé à la formation des nanofils. Deux types de nanofils différents selon la vitesse de déplacement des nano-gouttelettes d'indium sont obtenus [89]:

- Le type GG (Grounded-Growth) suivant lequel les nanofils restent en contact avec le substrat,
- Le type SG (Suspended-Growth) où les nanofils sont suspendus.

Au-delà de l'avantage d'être réalisé à basse température, ce procédé permet de contrôler la forme géométrique des nanofils. En effet, le rapport entre l'épaisseur de la couche de silicium amorphe et la taille des nano-gouttelettes d'indium influence la direction de croissance ainsi que la forme des nanofils. Ainsi, si ce rapport est inférieur à 1, l'allure des nanofils sera plutôt rectiligne[89].

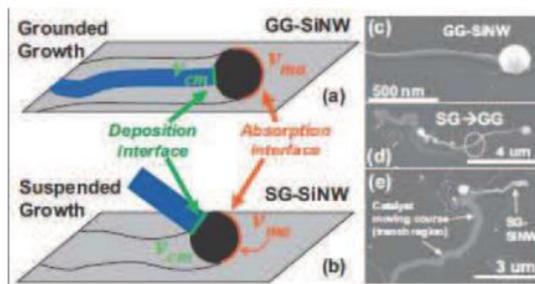


Figure 25: Synthèse des nanofils par la méthode SLS : nanofil de type GG (Grounded Growth) (a), nanofil de type SG (b), images MEB de nanofils type GG (Suspended-Growth) [89].

Enfin, à la différence du procédé VLS, la méthode SLS permet une croissance bidimensionnelle (c'est-à-dire à la surface du substrat) et directionnelle des nanofils de silicium monocristallin à partir de motifs en silicium amorphe prédéfinis, laissant entrevoir la possibilité de réalisation de transistors de façon reproductible en technologie planaire classique (figure 26).

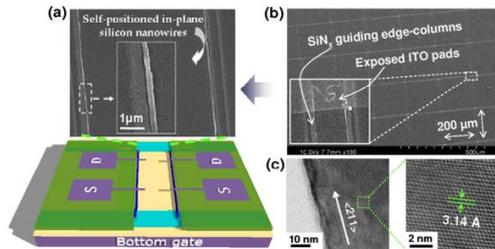


Figure 26: (a) transistor à effet de champ à base de nanofils de silicium obtenu par croissance SLS guidée dans une gouttière de silicium amorphe image MEB (b). (c) Image TEM d'un nanofil monocristallin[89].

### II.1.3 Matrices poreuses

Cette méthode de synthèse des nanofils à l'aide d'une matrice se réalise en remplissant de matière un réseau poreux constituant la matrice (le plus souvent en alumine). Dans ce cas, une matrice 3D généralement en alumine composée de nanopores est fabriquée sur un substrat de silicium [90]. Ces nanopores sont ensuite recouverts par un matériau semi-conducteur (généralement silicium). Le remplissage se réalise par différentes voies : électrochimique (anodisation), injection à haute pression, ou par évaporation. Néanmoins, c'est la voie électrochimique qui semble être la mieux adaptée. L'étape finale consiste à enlever la matrice poreuse par dissolution, il en résulte un réseau de nanofils verticaux particulièrement longs et continus comme indiqué sur la figure 27:

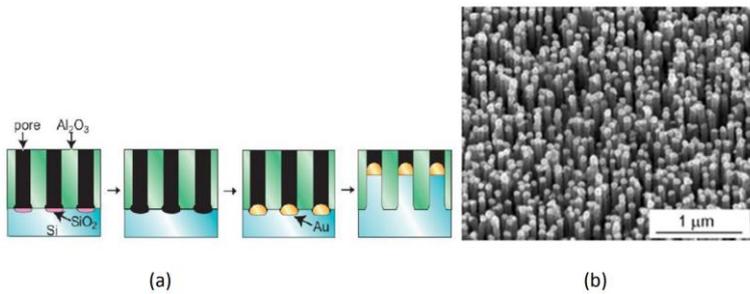


Figure 27: (a) matrice servant à la synthèse des nanofils ; (b) image MEB indiquant des nanofils réalisés grâce à une matrice nano-poreuse.[90]

## II.2 Synthèses par la méthode « top-down »

Dans le domaine de l'industrie microélectronique, la technique « top-down » est l'approche la plus utilisée [91], pour la réalisation d'objets à l'échelle nanométrique car les étapes qui y interviennent sont semblables à celles généralement utilisées dans la fabrication des composants en électronique. Cette approche permet de réduire les dimensions d'un matériau jusqu'à ce que cette réduction d'échelle conduise à la réalisation de motifs. L'approche « top down » regroupe les différentes étapes issues de la microélectronique (dépôt, lithographie, gravure, ...) pour l'obtention d'objets à l'échelle nanométrique (dont les nanofils). L'inconvénient de cette approche est principalement dû aux problèmes liés aux limites de résolution des procédés de photolithographie (permettant la réalisation en masse des composants microélectroniques). Ces procédés, extrêmement performants pour la fabrication de structures dont les dimensions se situent en deçà d'une centaine de nanomètres, doivent faire face à des problèmes technologiques quasi insolubles pour accroître leur résolution. Nous parlons aujourd'hui de lithographie UV et RX. L'approche « top down » regroupe les différentes étapes issues de la microélectronique (dépôt, lithographie, gravure, ...) pour l'obtention d'objets à l'échelle nanométrique (dont les nanofils).

L'inconvénient de cette approche est principalement dû aux problèmes liés aux limites de résolution des procédés de photolithographie (permettant la réalisation en masse des composants microélectroniques). Ces procédés, extrêmement performants pour la fabrication de structures dont les dimensions se situent en deçà d'une centaine de nanomètres, doivent faire face à des problèmes technologiques quasi insolubles pour accroître leur résolution. Nous parlons aujourd'hui de lithographie UV et RX (<10 nm) afin d'aller largement en bas du seuil des 100 nm, seuil critique pour la fabrication de nano-objets. Leurs coûts très élevés ne laissent pas une chance pour une mise en œuvre rapide de ces nouvelles technologies. La lithographie par faisceau d'électrons est actuellement la seule capable de graver des nanostructures de quelques nanomètres. Malheureusement, cette technique est incompatible avec une production industrielle en masse du fait du caractère séquentiel de l'écriture des motifs.

Les technologies associées qui se déclinent sous plusieurs variantes sont présentées dans la suite :

- La lithographie électronique
- La méthode des espaceurs
- La nano impression.

### II.2.1 La lithographie électronique

La lithographie électronique (ou lithographie e-beam) est un processus permettant de réaliser des motifs par bombardement électronique dans un matériau choisi. Cette méthode permet d'atteindre des limites de résolution impossibles à atteindre avec la photolithographie optique classique. La lithographie e-beam a trouvé diverses formes d'applications dans la recherche et l'industrie du semi-conducteur et dans ce qu'il est convenu d'appeler les nanotechnologies.

La photolithographie électronique dans la pratique est le plus souvent utilisée pour la création des motifs sur une résine sensible aux électrons par modification chimique (polymérisation). Les étapes de cette photolithographie appliquée pour la réalisation de nanofils de silicium sont présentées sur l'illustration 28.

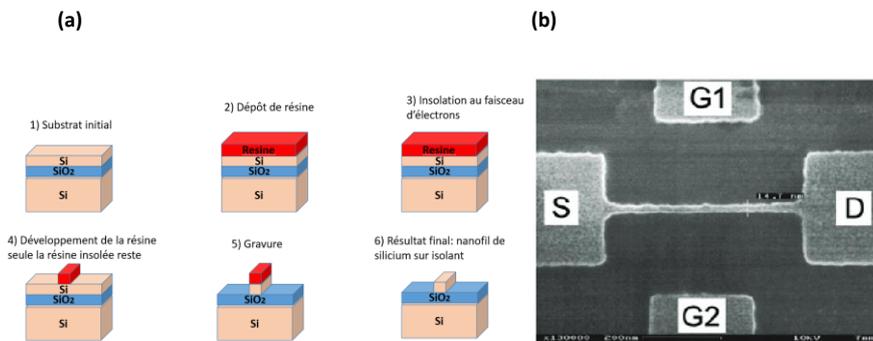


Figure 28 : illustration des étapes technologiques de fabrication de nanofils de silicium utilisant la lithographie par faisceau d'électrons comme procédé de masquage (a), image MEB de transistor MOS dont le canal est un nanofil de silicium (diamètre 15 nm) fabriqué par procédé de masquage défini par lithographie électronique (b) [92].

### II.2.2 Elaboration par la méthode des espaceurs en lithographie optique

La méthode des espaceurs fait appel à une technologie compatible avec la technologie MOS conventionnelle, et ne nécessite pas d'outils lithographiques spécifiques. Elle met en œuvre des techniques de dépôt CVD en couches minces, la photolithographie UV classique et la gravure par voie plasma. Les espaceurs ainsi réalisés par cette méthode peuvent être utilisés comme nanofils. La fabrication d'espaceurs est couramment utilisée en technologie CMOS submicronique pour l'isolation des parties actives des composants. Avec un avantage majeur d'être assez simple à mettre en œuvre et se déroule comme le montre la figure 29. Dans un

premier temps le matériau est déposé (par exemple de l'oxyde de silicium) puis gravé par voie sèche pour la réalisation d'une marche. Les conditions opératoires de cette première étape de gravure sont optimisées afin d'assurer une bonne verticalité des flancs de la marche servant de support à la formation des espaceurs-nanofils.

En second lieu un dépôt d'une couche de silicium amorphe (ou polycristallin) par procédé LPCVD (Low Pressure CVD) est réalisé. Cette couche est ensuite gravée par voie sèche. Le but de cette seconde gravure (anisotrope) est d'obtenir un résidu situé sur les flancs de la marche, grâce à l'épaisseur de la couche de silicium plus importante sur ces flancs. Ces résidus de taille nanométrique le long de la marche constituent les nanofils en silicium (amorphe ou polycristallin)[93].

La technique des espaceurs présente un avantage important en permettant la réalisation de réseaux de nanofils parallèles sur des grandes surfaces en technologies planaire. De plus, elle est compatible avec les procédés de fabrication des circuits dans l'industrie microélectronique[94].

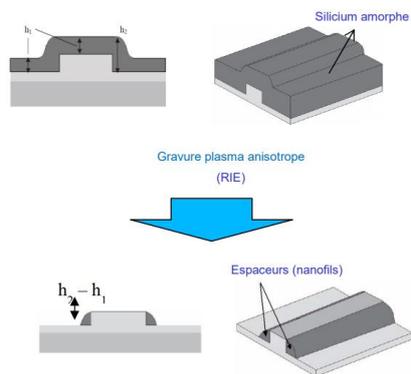


Figure 29: Schéma de réalisation des nanofils de silicium par la méthode des espaceurs [93] :

### II.2.3 La nano impression

La nano-impression est une méthode basée sur la création de motifs nanométriques à partir d'un moule. Pour sa réalisation, un premier dépôt de polymère (ou résine) sur substrat est effectué, suivi d'une impression par transfert des motifs du moule vers le polymère (principe

du tampon encreur). Puis une gravure sèche est réalisée afin d'éliminer les traces indésirables de résine et obtenir des motifs bien définis. Le moule utilisé est constitué d'un verre ou d'une résine suffisamment dure dont les motifs nanométriques ont été réalisés généralement par procédé e-beam. Les deux types de nano-impression les plus couramment utilisées sont la nano-impression thermique et la nano-impression assistée par UV.

La nano-impression thermique se réalise avec le transfert des motifs du masque vers une résine spéciale (PMMA). Elle s'effectue grâce au chauffage de la résine à 200°C, puis une compression ( $13 \times 10^6$  Pa) du moule sur la résine (figure 30)[95]

La nano-impression assistée par UV est semblable à la nano-impression thermique à la différence qu'elle associe une résine liquide qui durcit après exposition aux rayons UV [95] Cette méthode s'adapte bien aux autres procédés traditionnels de la microélectronique. Elle présente l'avantage d'atteindre les résolutions voisines de la lithographie e-beam tout en étant moins coûteuse.

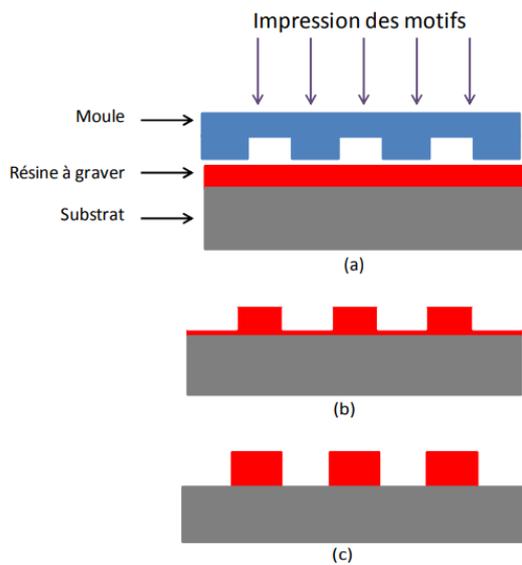


Figure 30 : schéma de principe de la nano-impression : (a) impression des motifs, (b) séparation du moule, (c) illustration des motifs après le retrait des résidus par gravure.

Les images MEB de la figure 31 montrent un exemple de réalisation de nanofils de silicium par nano-impression. Une bonne résolution du moule, ainsi qu'un choix adéquat du type de résine, de la température et/ou de la pression favorisent une bonne définition des motifs.

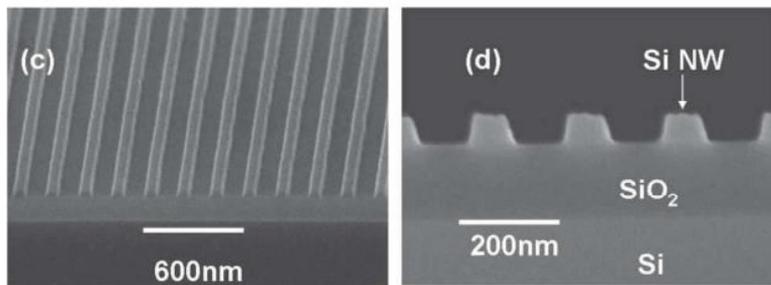


Figure 31: Image MEB de nanofils réalisés par la nano-impression sur substrat SOI[96]

### III. Dispositif à base de nanofils de silicium

Pour des différents domaines (électronique intégrée, bioélectronique), de nombreuses études se sont focalisées sur l'étude et la réalisation des composants basés sur des nanofils de silicium. A ce jour, les résultats obtenus ont démontré la faisabilité d'un large choix des dispositifs à base des nanofils, comme par exemple des résistances, transistors à effet de champ, inverseur CMOS, cellules solaires, capteurs.....

Cependant, les performances électriques des dispositifs sont fortement corrélées à la méthode de synthèse des nanofils. Des efforts en termes d'optimisation puis de reproductibilité font l'objet de nombreuses études. La suite de ce chapitre est dédiée à la présentation de quelques dispositifs basés sur les nanofils de silicium.

#### III.1 Les transistors à base de nanofils

Pour remplacer les MOSFET (*Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*) classiques, les transistors à effet de champ à base de nanofils de silicium présentent une excellente alternative, dû au fait que leur la réalisation permet une réduction des dimensions actuelles et donc l'augmentation du taux d'intégration. L'intégration des nanofils dans le transistor ouvre aussi la voie pour l'exploration d'autres applications comme les capteurs (bio) chimiques du

fait que ces nanofils possèdent un rapport surface sur volume important permettant une grande sensibilité aux espèces chimiques et biologiques.

Dans cette partie les différents types de transistors à effet de champ réalisés avec des nanofils de silicium comme zone de canal seront présentés.

Dans la technologie des transistors à effet de champ classique, la partie supérieure (au niveau de l'isolant de grille) de la couche active participe à la conduction. Les SGNWFET (Surround-Gated Nanowire Field Effect Transistor) sont des nouvelles architectures de transistors en plein développement en utilisant tout le volume du nanofils comme canal de conduction (figure 32). Les nanofils dans ce cas sont englobés de façon homogène par la grille.

Les avantages de ces structures sont:

- une conduction essentiellement dans le volume,
- l'absence de capacité parasite de recouvrement au niveau du drain et de la source.

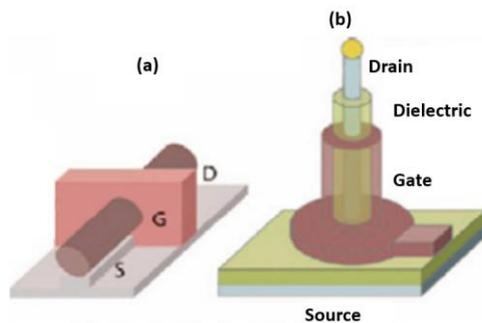


Figure 32: structure de transistors à effet de champ à base de nanofil (SGNWFET) : (a) transistor à nanofil horizontal, (b) transistor à nanofil vertical[97]

### III.1.1 Les transistors verticaux

Pour réaliser des transistors verticaux, les nanofils sont généralement synthétisés par l'approche « bottom-up », puis entourés par une couche d'un isolant et du matériau de grille.

Une démonstration en 2006 d'un transistor vertical à nanofils de silicium a été effectuée par deux équipes. Les dispositifs de Goldberger et al[98] et Schmidt et al[99] sont présentés respectivement sur les figures 33 et 34. Les deux travaux montrent des dispositifs similaires

avec une nette supériorité du point de vue des performances de l'équipe de Goldberger (figure 35).

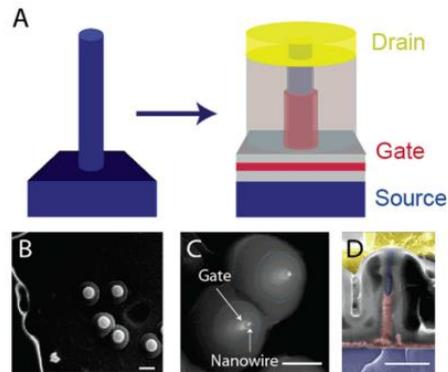


Figure 33 : De gauche à droite : nanofil de silicium vertical et représentation schématique du transistor à nanofil vertical (A). Vue de dessus de plusieurs transistors à nanofil vertical (B). Coupe horizontale (C) et verticale (D) d'un transistor mettant en évidence un nanofil (canal) complètement recouvert par la grille[98].

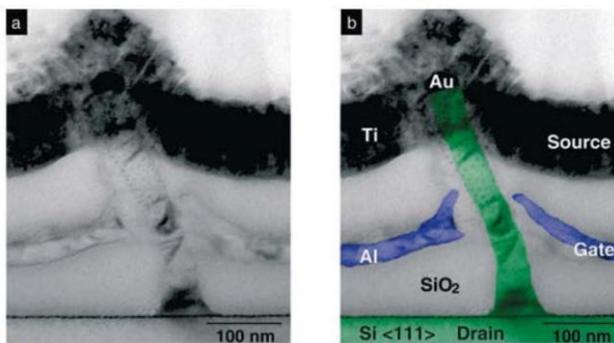


Figure 34: images MEB originale et colorisée d'une coupe d'un transistor vertical à nanofil de silicium [100]

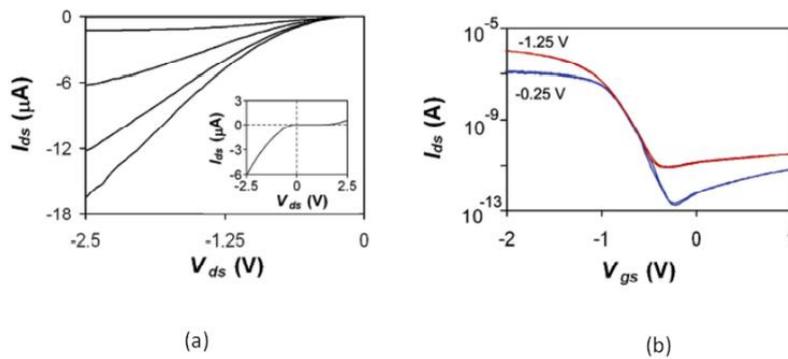


Figure 35 : caractéristiques électriques du transistor à nanofil vertical présenté sur la figure 35 : (a) caractéristique de sortie pour 131 nanofils en parallèle avec  $-2,5V < V_{ds} < -1V$  et un pas de  $0,5V$ , (b) caractéristique de transfert pour 20 nanofils en parallèle avec  $V_{DS} = -0,25V$  (courbe en bleue) et  $V_{DS} = -1,25V$  (courbe en rouge)[98]

Nous constatons que les deux études rapportent l'utilisation du substrat comme contact de source (ou de drain). Le substrat de silicium utilisé dans ce cas est dégénéré (comportement plus proche de celui d'un métal). Elles indiquent également la faisabilité d'intégrer des nanofils de Si réalisés par procédé CVD. Les nanofils sont synthétisés par la méthode VLS sur un substrat de silicium fortement dopé de type P. Ils sont ensuite recouverts d'un oxyde thermique (isolant de grille) dont l'épaisseur varie entre 30 et 40nm. La grille est enfin réalisée à partir d'un dépôt de chrome[98], [99].

### III.2 Capacité à haute densité d'intégration

La réalisation des capacités à haute densité d'intégration nécessite la fabrication des nanofils de silicium par l'approche « bottom-up ». Elles sont utilisées comme des capacités traditionnelles pour la conversion de courant ou le stockage d'énergie, grâce à une surface équivalente de la capacité accrue. En effet, les électrodes du condensateur associé sont constituées de réseau de nanofils. Les étapes de fabrication de ces capacités sont présentées par la figure 36. Le substrat de silicium est recouvert de trois matériaux successivement : du nitrure de titane, du cuivre et de l'oxyde de silicium, puis une gravure de la couche d'oxyde est effectuée dans le but de réaliser des cavités dans lesquelles s'effectue la croissance des nanofils. À l'aide du dépôt d'une couche d'alumine, le diélectrique est alors réalisé, cette couche est recouverte ensuite de nitrure de titane. Un alliage aluminium-silicium est enfin déposé puis gravé pour la prise des contacts. Des telles capacités sont réalisées à basse température ( $< 425^{\circ}C$ ) [111].

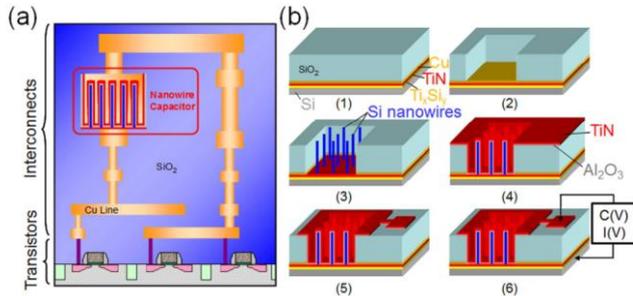


Figure 36 : (a) Illustration de capacité à haute densité, (b) différentes étapes du procédé de fabrication [111]

### III.3 Les cellules solaires

L'intérêt majeur de la mise en œuvre des cellules photovoltaïques est la production d'énergie propre et renouvelable, cela représente une alternative prometteuse aux énergies fossiles et nucléaires.

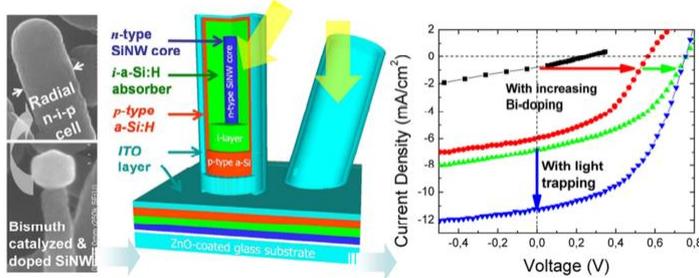


Figure 37 : De la gauche vers la droite : Image MEB de nanofils synthétisés par VLS avec du bismuth comme catalyseur, schéma d'illustration de la diode nip réalisée sur substrat de verre recouvert de ZnO, caractéristique J-V d'une diode ainsi réalisée [100].

Les nanofils de silicium prennent aussi part dans la fabrication des cellules photovoltaïques [101], Contrairement au silicium massif, les nanofils présentent une bonne absorption des photons et favorisent aussi le guidage de la lumière grâce à leur forme filaire [100]. Un exemple de cellule solaire à base de nanofils de silicium, synthétisés par la méthode VLS avec le

bismuth comme catalyseur, a été déjà montré sur la figure 38. Cette méthode permet de réaliser des cellules solaires à partir d'un procédé basse température ( $T < 240^{\circ}\text{C}$ ). [100]

### III.4 Electronique numérique : inverseur CMOS

Les nanofils de silicium participent aussi à la réalisation de dispositifs complexes tels que les portes logiques. En utilisant la gravure TMAH sur un substrat de silicium monocristallin orienté  $\langle 100 \rangle$  pour la réalisation des nanofils, un inverseur a été fabriqué par Lee et al [102] à partir de ces nanofils de Si dopés (type P et N) par implantation ionique, ensuite reporté sur un substrat plastique. Les caractéristiques électriques de cet inverseur sont illustrées par les figures 39 à 41.

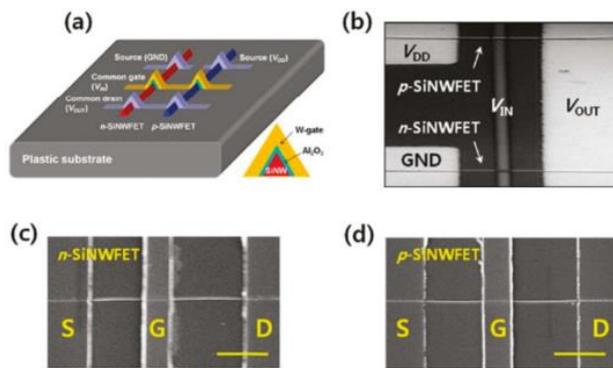


Figure 38 : Inverseur CMOS à base de nanofils de silicium dopé n et p réalisés sur un substrat en plastique. (a) Illustration 3-D- and (b) vue de dessus de l'inverseur à l'aide d'un microscope optique. Images MEB des transistors type N (c) et type P (d). Images réalisées avec une échelle=5  $\mu\text{m}$  [102].

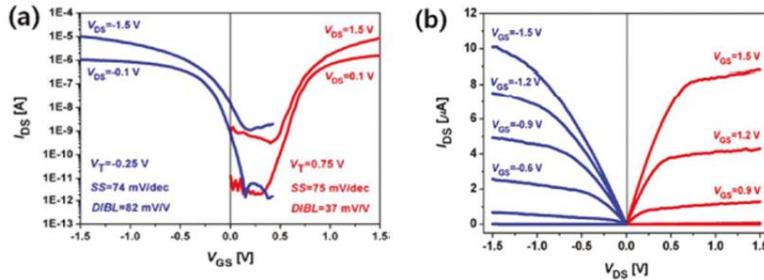


Figure 39: caractéristiques électriques des transistors type N (courbe rouge) et type P (courbe bleue). (a) caractéristiques de transfert (b) caractéristiques de sortie[114].

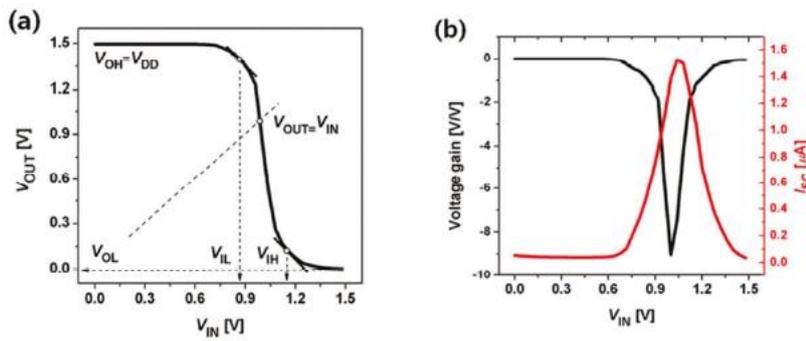


Figure 40 : (a) Caractéristiques en statique d'un inverseur à nanofils de silicium, (b) caractéristique de transfert en statique, gain de tension et courant d'alimentation en fonction de la tension d'entrée avec  $V_{DD} = 1.5$  V [102]

Le gain en tension pour ce type d'inverseurs est de 9V/V, avec une tension de seuil à 0,32 V pour une tension de polarisation de 1,5 V et un basculement de la tension sortie entre 0V et la tension d'alimentation VDD (1,5V)[102].

### III.5 les capteurs chimiques et biologiques à base de nanofils de silicium

Les capteurs de détection de substances chimiques ou biologiques, basés sur des nanofils de silicium, sont très attractifs grâce à leur rapport surface/volume élevé. Ces capteurs à base de nanofils présentent potentiellement un intérêt en termes de sensibilité.

Le fonctionnement de tels capteurs est basé principalement sur le changement de la conductance du dispositif (transistor ou résistance) lors de l'absorption des espèces à détecter sur le nanofil. En général, les nanofils doivent être fonctionnalisés pour avoir une interaction efficace avec les substances à analyser (sélectivité)[103].

Les nanofils permettent la détection de différentes espèces chargées telles que par exemple des ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  / $\text{OH}^-$  [24] [25], des gaz ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ) [94], [106], ainsi que des brins d'ADN [107].

Dans cette partie, différentes applications des capteurs chimiques et biologiques à base de nanofils sont présentées.

### III.5.1 Les capteurs de pH

La mesure de pH à partir de résistance électrique constituée par un nanofil de silicium a été démontrée pour la première fois par Lieber et al[108] Le nanofil de silicium utilisé est recouvert d'oxyde de silicium, fonctionnalisé par silanisation à l'aide de l'APTES (3-Aminopropyl triéthoxysilane), puis le tout est protégé par une couche de PDMS (Polydiméthylsiloxane). Cette dernière permet la présence de groupements amines ( $\text{NH}_2$ ) en plus des groupements  $\text{SiOH}$  sur la surface des nanofils (figure 41-a).

Pendant la détection, une protonation des ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  produite transforme le groupement  $\text{NH}_2$  en ion  $\text{NH}_3^+$ . Ceci résulte à la création d'une grille positive pour les faibles valeurs de pH et à la contribution de l'augmentation de la conductance à travers le nanofil de silicium utilisé comme zone de canal de conduction électrique. Pour les valeurs élevées de pH, le groupement  $\text{SiOH}$  subit une déprotonation et devient un ion  $\text{SiO}^-$  ceci a pour effet la création d'une grille négative et la diminution de la conductance du à travers la résistance[108]. La figure 41-b montre la variation de celle-ci en fonction des différentes valeurs de pH. Ce capteur présente de très bonnes performances avec une sensibilité égale à 100 nS/pH.

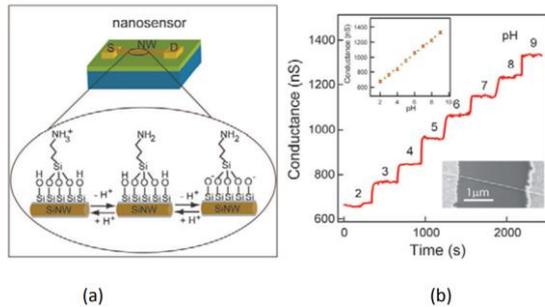


Figure 41 : Mesure du pH à l'aide de résistances à base de nanofil de silicium. (a) Nanofil fonctionnalisé par l'APTES. (b) Variation de la conductance en fonction de la valeur du pH[108]

### III.5.2 Capteur de gaz

La détection de l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) a été effectuée par l'équipe de X.T. Zhou[107] et al, à l'aide d'un capteur avec des nanofils de silicium. En parallèle J.R Heath et al[109] ont utilisé le même type de capteur pour la détection du dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ).

Les capteurs de gaz à base de nanofils de silicium ont une similarité au niveau du mécanisme de conduction avec les capteurs de gaz à base de transistor à effet de champ, dû à l'adsorption d'espèces chargées ou le transfert de charges à la surface des nanofils, ce qui conduit à la modification des caractéristiques électriques du dispositif.

La réponse électrique de résistances à base de nanofils de silicium pour la détection de l'ammoniac et le dioxyde d'azote sont présentés par les graphes de la figure 42-a et 42-b.[87]

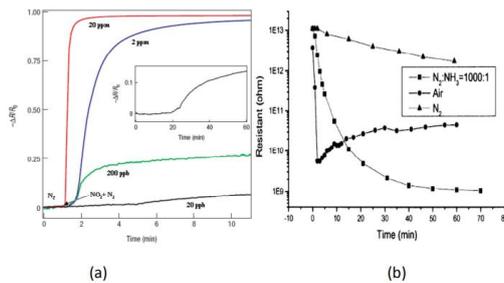


Figure 42 : détection de gaz à l'aide de résistance à base de nanofils de silicium dopés de type P : (a) détection de  $\text{NO}_2$  d'après et (b) détection de  $\text{NH}_3$ [107].

En 2009 l'équipe de Wan et al [110] a montré, pour la détection du  $\text{NH}_3$  et  $\text{NO}_2$ , des réponses relatives respectivement de -19,7 % et +61,8% à une concentration de 250 ppm. Cette détection est réalisée avec des nanofils dopés P de largeur 75 nm et de longueur 20 $\mu\text{m}$ .

### III.5.3 Biocapteur à base de nanofils de silicium

Les dispositifs à base de nanofils n'échappent pas à cette règle qui tend à adapter les capteurs chimiques à la détection biologique. La possibilité de fonctionnaliser les nanofils favorise la mise en œuvre de capteurs pour la détection d'espèces spécifiques. Il est nécessaire d'y effectuer divers traitements de la surface, afin de permettre l'immobilisation du site récepteur. La fonctionnalisation de surface est donc une étape importante. Plusieurs techniques de fonctionnalisation existent : la fonctionnalisation de la surface des nanofils à base de sels de diazonium [111] ou par photochimie[112], [113]. La technique d'immobilisation la plus courante est le greffage covalent avec l'utilisation d'APTES et de Glutaraldéhyde pour la création des groupements carboxyle[114], [115], cette technique sera celle utilisée durant nos travaux.

En 2001 à l'Université de Harvard, l'équipe de Lieber et al.[116] a détecté l'hybridation de l'ADN à l'aide des nanofils de silicium. La présence de brins d'ADN tend à modifier la conduction dans les nanofils, ce qui occasionne un changement des caractéristiques électriques du dispositif.

Un exemple de capteur à base de nanofils de silicium, dont la fonctionnalisation permet de détecter l'hybridation de brins d'ADN, est présenté sur la figure 43[117].

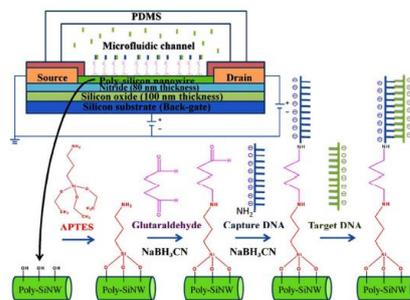


Figure 43 : Illustration d'un capteur à base de nanofils de silicium ayant subi diverses étapes de fonctionnalisation en vue de la détection de l'hybridation de l'ADN[117].

Jeong et al [118]. ont utilisé une plateforme de réseaux de nanofils de silicium bien définis et l'imagerie de cellules uniques, et ont montré que les emplacements d'attachement des bactéries sont fortement influencés par la présence de nanofils sur une surface, avec un attachement préférentiel aux nanofils [118](figure 44).

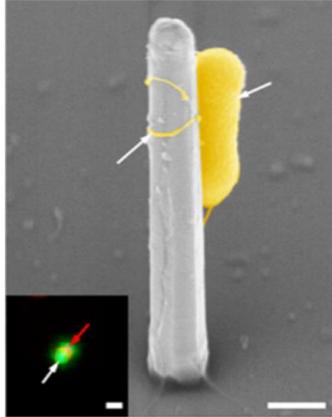


Figure 44: Images MEB montrant une bactérie fixée sur un nanofil en Si et l'image fusionnée correspondante des micrographies de fluorescence des nanofils en Si. D'après Jeong et al [118]

Ces résultats ont démontré que la topographie à l'échelle nanométrique pouvait affecter le mouvement et l'attachement des bactéries. Selon Kim et al. [119], le couplage entre les espèces microcellulaires et les nanomatériaux semi-conducteurs dans un nanotransistor cellulaire permet de confiner les porteurs de charge à une ou deux dimensions et à l'interface bio/nano, ce qui conduit à une modification très sensible de la densité des porteurs. Dans d'autres travaux, Susarrey-Arce et al [120] ont étudié l'interaction et la viabilité des bactéries sur des surfaces de SiNWs, améliorées avec différentes fonctionnalités chimiques, en utilisant des micro-organismes modèles *E. coli* et *S. aureus*. Récemment, Li et al [121] ont montré une identification bactérienne rapide dans des échantillons d'urine en capturant des bactéries sur une puce microfluidique de nanofils de silicium à microcanaux, suivie d'une détection par spectroscopie de masse à désorption assistée par laser en temps de vol (MALDI-TOF MS). Des bactéries d'une concentration de  $10^6$  UFC/mL dans les échantillons d'urine ont été détectées.

## IV. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons dressé un état de l'art des techniques de synthèse des nanofils. Les différents procédés de fabrication de nanofils de silicium, permettent aujourd'hui de fabriquer et d'intégrer ces derniers au sein de nombreux types de dispositifs tels que les transistors, diodes, résistances pour une utilisation comme capteurs chimiques et biologiques, les cellules photovoltaïques...

Le Département Microélectronique et Microcapteurs de l'IETR a déjà une certaine expertise dans le développement de capteurs. Il a ainsi été démontré la faisabilité de capteurs à base de nanofils pour la détection de l'ammoniac, de l'hybridation de deux brins d'ADN, et la mesure du pH d'une solution [82], [93], [122].

Pour le développement du biocapteur à base de nano-objets qui sera utilisé pour la détection de bactéries, nous avons opté pour une résistance à base de nanofils de silicium synthétisés par la méthode VLS pour plusieurs raisons : la synthèse des nanofils par cette méthode permet d'avoir un nombre important de nanofils et donc une plus forte interaction avec les bactéries, il est possible de fonctionnaliser les nanofils, le développement du capteur nécessite un procédé de fabrication en salle blanche à partir de 2 masques. Les étapes technologiques de fabrication de ces capteurs sont présentées dans le chapitre suivant. Nous détaillerons également le protocole de mesure.

**ANNÉE 2022**

## **Chapitre 3 :**

# **Fabrication des biocapteurs à base de nanofils de silicium.**

## I. Introduction

L'objet de ce chapitre est d'expliciter les méthodes, protocoles et mesures pour la mise en œuvre des capteurs de bactéries. De la fabrication des capteurs en salle blanche jusqu'au dépôt des bactéries, toutes les étapes effectuées jusqu'aux mesures électriques seront détaillées.

Dans la première partie, nous détaillons le procédé expérimental utilisé pour la réalisation des capteurs de silicium et des nanofils fabriqués sur des peignes interdigités. Nous détaillerons la méthode de synthèse des nanofils ainsi que le développement de nouveaux masques réalisés dans l'objectif d'optimiser la détection. La fonctionnalisation chimique des nanofils, la caractérisation par spectrométrie, le protocole de fixation des anticorps ainsi que le dépôt des bactéries seront présentés par la suite. Nous expliciterons également le protocole de détection par fluorescence, par Microscopie électronique à balayage (MEB) et pas mesures électriques.

## II. Méthodes expérimentales

Plusieurs étapes sont nécessaires pour la réalisation des nanocapteurs avec 2 étapes de photomasquage. Tout d'abord, un premier masque est utilisé pour la définition des peignes interdigités à partir de silicium polycristallin. Ensuite, un second masque permet de créer des ouvertures sur les peignes interdigités pour le dépôt d'or, utilisé comme précurseur pour la croissance des nanofils par la méthode VLS (vapeur liquide solide). Comme nous l'avons précisé dans la partie précédente, nous avons fait le choix d'utiliser cette méthode de croissance des nanofils de silicium sur les nanocapteurs.

### II.1 Développement des nouveaux masques

Un jeu de masques avait été développé préalablement à ces travaux. Les masques utilisés par l'équipe, lors de travaux antérieurs (figure 45), présentaient plusieurs inconvénients : un nombre de peignes interdigités variable, une zone sensible du capteur très petite, et une géométrie variable (écartements différents entre les dents des peignes interdigités) limitant la redondance des mesures. Plusieurs difficultés avaient ainsi été constatées au moment de

dépôt de la goutte contenant les bactéries, notamment un débordement de la solution en dehors de la zone sensible impliquant un étalement des bactéries hors de la zone de la détection et donc non détectées électriquement. Les images MEB présentées figure 46 montrent des bactéries à l'extérieur de la zone sensible de détection. Par ailleurs, le jeu de masques permettait d'avoir uniquement 4 cellules de test contenant des capteurs avec des peignes interdigités.

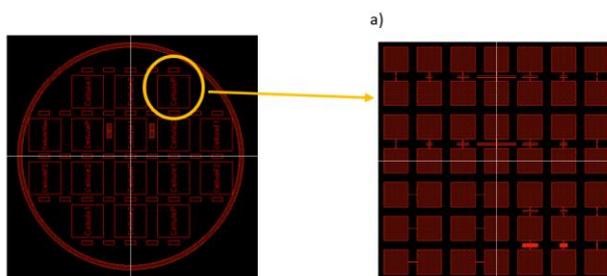


Figure 45: représentation de l'ancien masque avec quatre cellules de peignes interdigités, a) la cellule P indiquant les électrodes avec un nombre de dents variables : 2, 20, 40, 100.

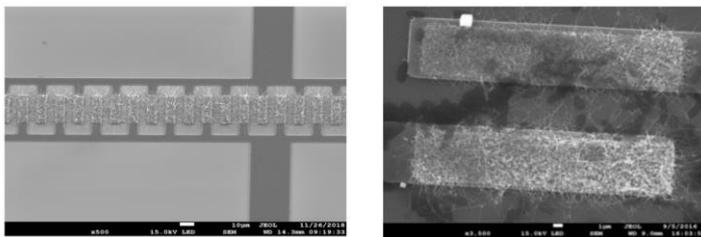


Figure 46: images MEB indiquant la surface de l'ancien capteur avant et après le dépôt des bactéries.

Afin de résoudre ces problématiques dues à l'ancien jeu de masques, un nouveau jeu de masques (figure 47-b) a été développé afin que la microgoutte (figure 48) contenant le matériel biologique ne recouvre toute la surface active. Le nombre de capteurs identiques sur le nouveau masque est plus important (14 capteurs), le nombre de dents est fixe sur tous les capteurs, la zone sensible des capteurs est plus grande avec un faible espacement entre les

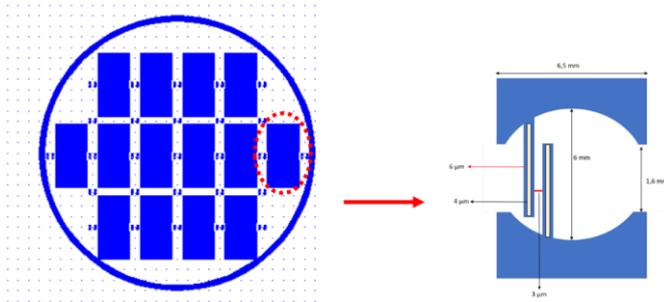
dents et avec une longueur de peignes interdigités permettant un passage de courant plus important.

Le nouveau design de la puce, réalisé sur le logiciel CléWin3, permet une surface sensible optimisée pour la goutte bactérienne : 375 dents sur chaque électrode, donc un total de 750 dents interdigitées, un espacement de  $3\ \mu\text{m}$  entre chaque peigne et une longueur de dent entre  $5,5$  et  $5,9\ \text{mm}$ . Le schéma représentatif avec tous les paramètres est présenté sur la figure 47-a.

**Commenté [lp1]:** Pourquoi les dents ne sont-elles pas de la même longueur ?

**Commenté [CM2R1]:** On est dans une surface circulaire donc les dents au milieu sont plus longues que sur les coté !

a)



b)

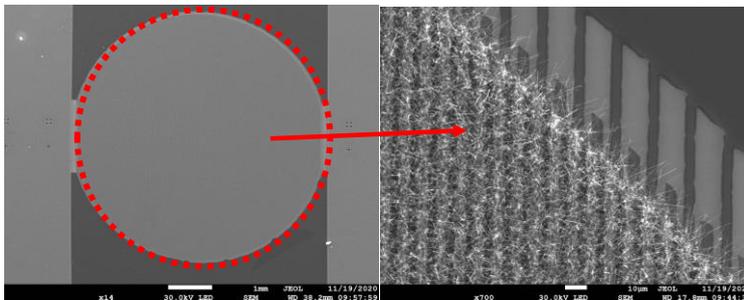


Figure 47 : a) schéma représentatif du nouveau désigne du capteur utilisé durant nos tests, b) Images MEB indiquant le nouveau désigne-du capteur et la croissance des nanofils de silicium sur les peignes interdigités.

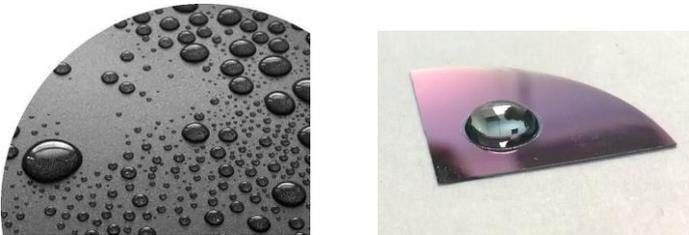


Figure 48: image indiquant l'hydrophobicité du substrat du silicium, Test de microgoutte sur la nouvelle structure de capteur.

Cette nouvelle structure permet une facilité de mesures électriques. Elle permet également de garantir une reproductibilité au niveau du volume de la microgoutte déposée : la goutte bactérienne déposée à l'aide d'une micro-pipette adopte une forme sphérique, dû à l'hydrophobicité du silicium (figure 48).

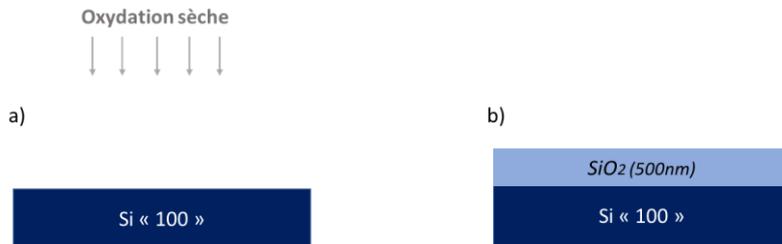
## II.2 Fabrication des nanocapteurs en salle blanche

L'intérêt de la géométrie des structures interdigitées en forme de peigne en silicium polycristallin (également utilisées comme électrodes) est qu'elle augmente la possibilité d'interconnexions des nanofils de silicium. L'enchevêtrement des nanofils de silicium VLS à catalyseur d'or augmente la surface d'échange entre la couche active (surface des nanofils de silicium) et le milieu ambiant, ce qui joue un rôle déterminant pour améliorer la sensibilité. Dans la section suivante, nous examinerons en détail les étapes de fabrication des dispositifs en forme de peignes interdigités.

### II.2.1 Préparation des substrats

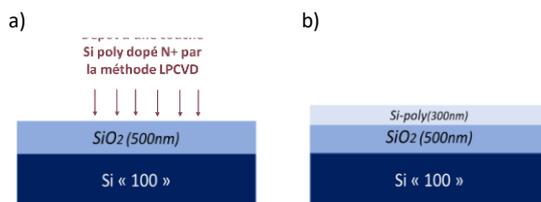
#### a) Dépôt de la couche d'oxyde de Silicium par « oxydation sèche »

Les substrats de silicium utilisés pour la conception des nanocapteurs sont orientés « 100 », et de type N (dopés au phosphore). La taille du substrat est de 2 pouces, la résistivité de ce type de substrat est garantie par le fournisseur de 1 à 10 Ohm.cm. Une couche isolante de SiO<sub>2</sub> de 500 nm est réalisée par oxydation thermique.

Figure 49 : substrat après croissance d'une couche d'isolation SiO<sub>2</sub>.

a) *Dépôt de la couche de silicium polycristallin fortement dopé par la méthode LPCVD*

Suite à des études réalisées antérieurement, les conditions de dépôt du film mince de silicium polycristallin utilisé dans notre laboratoire sont fixées à 550 °C et 90 Pa, durant 1h30. Le silicium est déposé à l'état amorphe par la méthode LPCVD (« Low Pressure Chemical Vapor Deposition »), puis cristallisé par un recuit thermique sous vide à 600 °C pendant 12 heures. La couche est dopée par l'injection de phosphine *in-situ* durant le dépôt. Dans ce cas, le processus de cristallisation fournit suffisamment d'énergie aux atomes de la couche déposée pour qu'ils puissent être disposés selon le réseau cristallin du silicium, ce qui transforme la couche de silicium déposée de l'état amorphe métastable à l'état cristallin stable. Ce dernier conduit à la formation d'un film de silicium polycristallin fortement dopé d'une épaisseur de 300 nm (figure 50). Le dopage équivalent obtenu après recuit est de l'ordre de  $10^{20}\text{cm}^{-3}$ .

Figure 50: présentation des étapes de préparation de la surface avant la création des peignes interdigités, a) oxydation thermique sèche, b) dépôt de Si-Poly dopée N<sup>+</sup> par LPCVD.

### II.2.2 Création des peignes interdigités

L'étape suivante consiste à former les peignes interdigités par photolithographie. Après le dépôt de la résine UV210, une gravure RIE (Reactive-ion Etching) est réalisée pour former les électrodes. L'échantillon est placé dans une chambre à basse pression (30 mTorr). L'hexafluorure de soufre à 5 sccm (SF<sub>6</sub>) est injecté dans la chambre sous la phase de plasma. La puissance du plasma est réglée à 30 watts. Cette étape permet la définition des motifs des peignes interdigités sur la surface (figure 51).

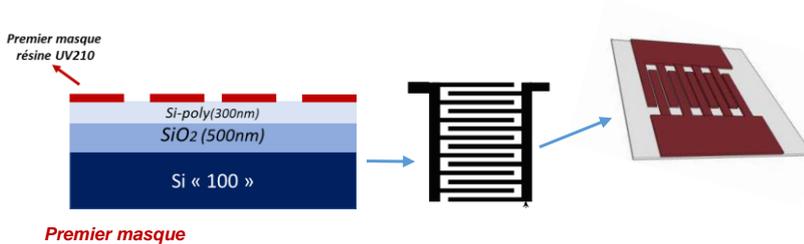


Figure 51 : photolithographie du premier masque (définition des électrodes en formes de peignes interdigités)

a)

b)

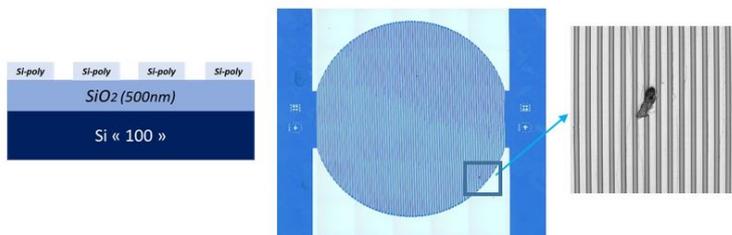


Figure 52: a) état de la surface après une gravure ionique réactive, b) image au microscope optique indiquant des résidus sur les peignes interdigités après la gravure (risque de court-circuit).

Dans ces conditions, l'effet physique est prédominant de sorte que la gravure latérale est relativement faible et le profil est proche de la verticale. Cette étape est cruciale : si la surface n'est pas correctement gravée, cela augmentera le risque de court-circuit entre les deux électrodes. Plusieurs problèmes dus à des interconnexions créées entre les dents, à cause des résidus présents sur la surface de ces derniers (ex : poussier, résine)(figure 52-b) ont été

rencontrés durant la gravure, nous avons dû optimiser le temps et la puissance de gravure jusqu'à obtenir une surface bien gravée.

#### a) Dépôt d'or pour la croissance des nanofils

La deuxième étape de photomasquage utilise la technique du « lift-off », afin de permettre la création de zones délimitées pour le dépôt d'or sur les peignes interdigités (figure 53), l'or servant de précurseur pour la croissance des nanofils de silicium par la suite. La technique du « lift-off » est une technique permettant de retirer la résine, et de ne garder l'or que sur les ouvertures dans la résine, c'est-à-dire sur les dents des peignes.

Une fine couche d'or (5 nm) est déposée, en utilisant un canon à électron « Electron Beam deposition (EBD) ». Il s'agit de chauffer l'or pour l'évaporer sous vide secondaire ( $10^{-7}$  mbar) et avoir une couche uniforme d'or sur la surface du substrat. Après cette étape, la croissance des nanofils de silicium peut être réalisée.

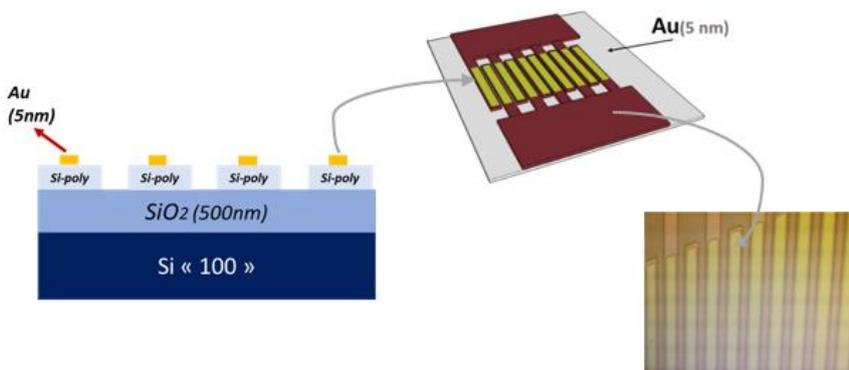


Figure 53: représentation de la surface après la dernière étape (« lift-off ») de fabrication du nanocapteur, indiquant la zone de présence de l'or au milieu des peignes interdigités.

#### II.2.3 Croissance des nanofils de silicium par la méthode « Vapeur liquide solide »

Les nanofils de silicium sont synthétisés dans un réacteur LPCVD par la méthode VLS à paroi chaude utilisant du silane ( $\text{SiH}_4$ ) comme gaz précurseur et l'or comme catalyseur. La température et la pression de dépôt sont respectivement de  $460^\circ\text{C}$  et 40 Pa. La première

phase de l'étape permet la formation de nano-gouttelettes d'or avant l'injection du silane. Cette synthèse aboutit à une croissance de nanofils de silicium enchevêtrés assurant un contact électrique entre les deux électrodes dopées (figure 54). Pour cela, la durée moyenne de la croissance est de deux heures, permettant la croissance de nanofils suffisamment longs. Cette méthode permet d'obtenir un nombre élevé de nanofils sur la surface des capteurs, d'une longueur allant jusqu'à  $1\mu\text{m}$  et avec un diamètre de  $100\text{ nm}$ .

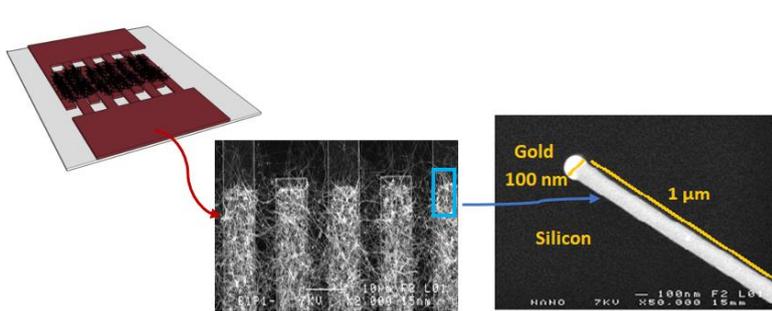


Figure 54: Représentation schématique des résistances à base des nanofils de Si synthétisés par le mécanisme VLS et Images MEB des peignes interdigités après la croissance des nanofils.

#### II.2.4 Caractérisation électrique des structures interdigitées

Une fois la croissance réalisée, des tests électriques sont effectués, afin d'analyser la réponse électrique du capteur due aux interconnexions des nanofils entre les peignes. En appliquant une tension au niveau des électrodes du capteur, le courant traversant le réseau de nanofils est mesuré à température ambiante, dans le but d'obtenir une courbe courant-tension (ou courbe  $I(V)$ ). Les mesures sont réalisées à l'aide d'un analyseur de paramètres de semiconducteur (Agilent B1500A). La courbe  $I(V)$  traduit la réponse électrique du capteur, et est directement associée à la résistance électrique globale de celui-ci.

### III. Modèle électrique

#### III.1 Avant dépôt de bactéries

Le schéma du modèle électrique équivalent est représenté sur la figure 55.

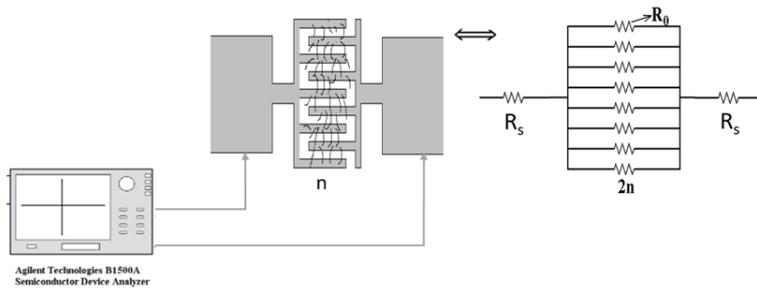


Figure 55: principe des mesures électriques et modèle électrique équivalent.

La résistance électrique globale ( $R$ ) est fonction de la résistance électrique élémentaire des nanofils ( $R_0$ ) entre 2 dents adjacentes et des résistances de contacts ( $R_s$ ). Dans ce cas :

$$R = 2R_s + \frac{R_0}{2n} \quad (1)$$

Où  $n$  est le nombre de dents des peignes interdigués.

Aux faibles tensions de polarisation, la résistance électrique associée aux nanofils interconnectés domine en raison de la résistivité électrique élevée des nanofils de silicium non dopé. Dans ce cas, des barrières énergétiques sont induites à l'interface entre deux nanofils interconnectés, conduisant à une quasi-désertion en porteurs des nanofils due au piégeage de ceux-ci lié aux défauts d'interface et :

$$R \cong \frac{R_0}{2n} \quad (2)$$

. Le courant  $I$  à travers le capteur est donné alors par :

$$I \cong \frac{2nU}{R_0} \quad (3)$$

où  $U$  représente la différence de potentiel appliquée entre les électrodes du capteur.

Dans ces conditions le domaine d'intérêt pour la détection des bactéries a été choisi pour des mesures à basse tension (-1V à 1V) de la courbe  $I(V)$  du capteur, où la résistance électrique des nanofils domine.

### III.2 Après dépôt de bactéries

Sur le modèle électrique, la résistance électrique globale du capteur est modifiée par l'interaction entre les bactéries et les nanofils (figure 56), cette dernière est notée

$$R_{tot1} \cong \frac{R_0}{2n} - \frac{\Delta R}{2n} \quad (4)$$

Avec  $R_{tot1}$  la résistance globale du capteur après la fixation des bactéries où  $\Delta R$  représente la variation de la résistance élémentaire  $R_0$  due à la présence des bactéries.

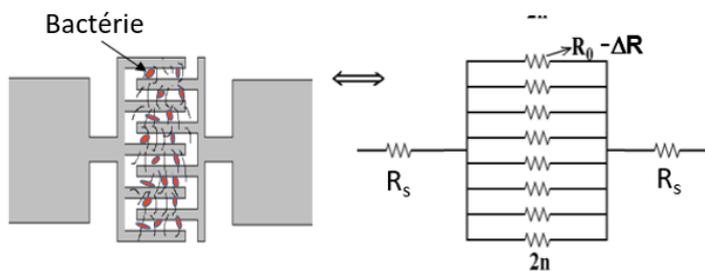


Figure 56: modèle électrique après la fonctionnalisation des nanofils de silicium et le dépôt des bactéries sur la surface des capteurs.

## IV. Fonctionnalisation par APTES/Glutaraldéhyde

### IV.1 Fonctionnalisation des surfaces de $\text{SiO}_2$

La fonctionnalisation de la surface des nanofils de  $\text{SiO}_2$  s'effectue par une réaction de silanisation à l'aide du (3-aminopropyl) triéthoxysilane (APTES) ( $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$ ). La molécule d'APTES réagit avec les atomes d'oxygène des groupements silanols présents sur la couche active de  $\text{SiO}_2$ . Avant le dépôt d'APTES, les plaques sont chauffées à  $100^\circ\text{C}$  sous vide dans un réacteur à l'aide d'un bain d'huile présenté sur la figure 57, pour éliminer les molécules d'eau présentes en surface et favoriser l'accès aux sites  $\text{SiOH}$  par l'APTES.

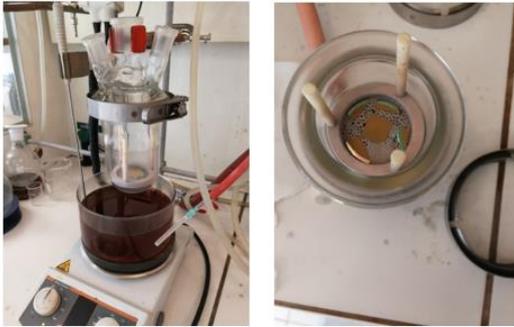


Figure 57: réacteur chimique pour le dépôt de l'APTES et du Glutaraldéhyde

Après cette étape de séchage, 2 mL d'APTES sont déposés sous argon dans le fond du réacteur contenant les substrats de  $\text{SiO}_2$ . On réalise ensuite trois « vide-argon » puis le réacteur est laissé fermé pendant 5 min à température ambiante pour laisser l'APTES gazeux réagir avec la surface de  $\text{SiO}_2$ . Ensuite, les échantillons sont remis à chauffer une deuxième fois sous vide à  $100^\circ\text{C}$  pendant 1h dans un nouveau réacteur sous argon avant le dépôt de glutaraldéhyde. La réaction entre la couche de  $\text{SiO}_2$  et l'APTES permet d'avoir des groupements amine en surface. Ce protocole conduit à une fine couche d'APTES en surface. En effet, il a été montré précédemment que la silanisation en phase gazeuse permet un bon contrôle du processus de silanisation de  $\text{SiO}_2$  avec le dépôt de seulement 1 ou 2 couches organiques sur la surface (figure 58) [123].

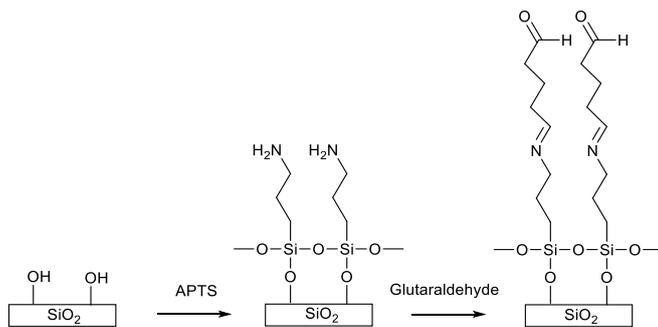


Figure 58: étapes de la fonctionnalisation de la surface des nanofils de silicium avec deux couches organiques (APTES et Glutaraldéhyde)

Après le dépôt d'APTES, les échantillons sont mis à réagir avec des vapeurs de glutaraldéhyde ( $\text{COH}(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$ ). Le glutaraldéhyde est un dialdéhyde qui interagit rapidement avec les protéines. Il stabilise les structures en créant des ponts artificiels entre les protéines et des groupements amines libres. Avec deux groupes aldéhydes séparés par une chaîne flexible,  $\text{HCO}-(\text{CH}_2)_3\text{-CHO}$ , il possède un grand potentiel de création de ponts, qui peuvent apparaître grâce aux deux groupes et à des distances variables (figure 58). Ainsi, le glutaraldéhyde a été utilisé comme agent de greffage, le groupe aldéhyde ( $\text{HC=O}$ ) créant une liaison chimique de type imine avec le groupe amine ( $\text{NH}_2$ ) de l'APTES. 1 mL de glutaraldéhyde est ajouté à l'intérieur du réacteur à température ambiante sous argon. Après trois « vide-argon », le réacteur est fermé et le glutaraldéhyde sous forme gazeuse va réagir avec le substrat.

### IV.2 Caractérisation des surfaces de $\text{SiO}_2$ après fonctionnalisation par l'APTES et le glutaraldéhyde.

#### IV.2.1 Caractérisation XPS

La caractérisation des surfaces de  $\text{SiO}_2$  fonctionnalisées par XPS a été réalisée avec une source monochromatique de rayons X Al  $K\alpha$  (SPECS XR 50 M et FOCUS 500) à 1486.6 eV avec un analyseur hémisphérique (SPECS Phoibos 150 HR) au sein de l'IMN (Institut des Matériaux Jean Rouxel) de l'Université de Nantes. La chambre d'analyse est reliée à la chambre de gravure par une chambre à ultravide pour limiter la contamination de surface. La pression de fonctionnement dans la chambre d'analyse était de  $10^{-9}$  mbar. Les spectres ont été enregistrés avec une énergie de passage de 14 eV et un pas d'énergie de 0,1 eV. Les échantillons ont été neutralisés avec un canon à électrons pour compenser le décalage dû à l'effet de charge. La simulation des pics expérimentaux a été réalisée à l'aide d'une fonction mixte Gaussienne-Lorenzienne après soustraction du bruit de fond.

##### a) Résultats XPS

Le procédé d'immobilisation a d'abord été optimisé sur des surfaces planes de  $\text{SiO}_2$ , avant d'être appliqué sur des nanofils de silicium. Plusieurs temps de réaction ont été testés pour l'étape d'introduction du glutaraldéhyde (10 min, 30 min, 1h, et une nuit) afin de vérifier l'épaisseur déposée en fonction du temps car le glutaraldéhyde est connu pour polymériser.

Les spectres XPS des surfaces modifiées après traitement au glutaraldéhyde gazeux sont donnés dans la Figure 59.

La fonctionnalisation de la surface a été clairement mise en évidence par l'analyse des pics C1s et N1s. Un petit pic C1s a été observé dans les spectres de référence correspondant aux surfaces de SiO<sub>2</sub>, probablement dû à la pollution par les vapeurs d'huile du système de vide pendant le dépôt de SiO<sub>2</sub> par LPCVD. Ce pic a augmenté avec le temps de réaction en raison de la présence de carbone dans la couche organique et s'est stabilisé après 10 à 30 min de réaction (Figure 59-c). L'analyse de déconvolution (Figure 59-a) a souligné la présence de quatre pics à 282.8, 284.6, 286.7 et 288.9 eV, qui peuvent être attribués respectivement aux liaisons C-Si, C-C, C-N et C=O. Le dernier pic à 288,9 eV montre la présence de glutaraldéhyde à la surface. La teneur en N1s a également augmenté par rapport à la référence en raison de l'immobilisation de l'APTES (Figure 59-c). Le pic N1s a pu être déconvolué en deux pics à 399,6 et 401,9 eV (Figure 59-b), qui correspondent respectivement à l'azote de l'amine et à l'amine protonnée[124]. Le rapport C1s/N1s calculé, après soustraction de la valeur du blanc, due à la pollution carbonée, est d'environ 8 après 10 et 30 min de dépôt de glutaraldéhyde. Cette valeur est cohérente avec une monocouche de glutaraldéhyde.

Pour estimer l'épaisseur des différentes couches greffées sur la surface modifiée de l'oxyde de silicium, nous avons considéré l'intensité atténuée des pics Si2p selon la relation :

$$I = I_0 \exp(-d/\lambda \cos \theta)$$

où I<sub>0</sub> est le signal mesuré pour les électrons de SiO<sub>2</sub> émis par la surface non couverte, I le signal mesuré pour la surface de SiO<sub>2</sub> couverte par une couche organique d'épaisseur d, et λ est la longueur d'atténuation des électrons de SiO<sub>2</sub> dans la couche organique [125]. Pour les électrons s'échappant à travers les couches organiques, la valeur de λ se situe dans la plage de 20-30 Å [126]. L'épaisseur de la couche a été estimée à environ 12-14 Å pour APTS/glutaraldéhyde, à partir de l'atténuation du signal du pic Si2p. La valeur obtenue est donc cohérente avec une couche d'APTS/glutaraldéhyde puisque la longueur de la chaîne de l'espaceur lieur a été estimée à environ 15 Å (Energie minimum au niveau MM2 Avec le logiciel 3D ultra).

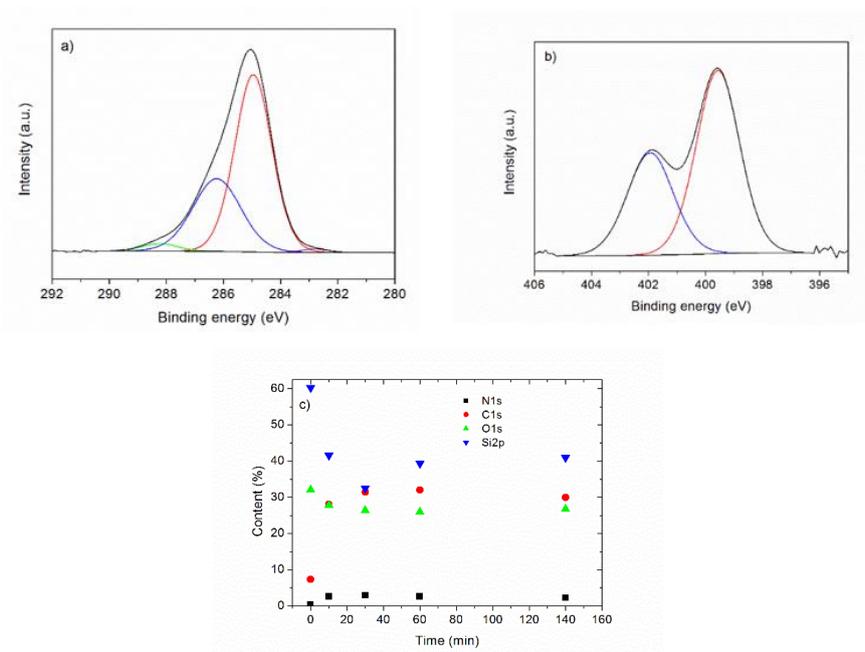


Figure 59 : a) Spectres de photoémission C1s et b) N1s des surfaces de SiO<sub>2</sub> modifiées par APTS/glutaraldéhyde c) Teneur en O1s, Si2p, C1s et N1s en fonction du temps de réaction pour l'immobilisation du glutaraldéhyde.

#### b) Résultats MEB

Les nanofils de dioxyde de silicium SiO<sub>2</sub> n'ayant pas pu être observés en XPS, après la validation du protocole de fonctionnalisation sur des surfaces modèles de SiO<sub>2</sub>, ce processus de fonctionnalisation optimisé a ensuite été appliqué pour modifier les nanofils de silicium et permettre l'immobilisation covalente d'anticorps. Un temps de 15 min a été choisi pour l'étape de fonctionnalisation par le glutaraldéhyde. Un nanofil de silicium fonctionnalisé est montré sur l'image MEB (figure 60). L'état de la surface des nanofils après fonctionnalisation apparaît homogène, ce qui est cohérent avec l'immobilisation de couches fines d'APTES et de glutaraldéhyde. Après cette étape, la surface des nanofils est prête pour le greffage des anticorps.

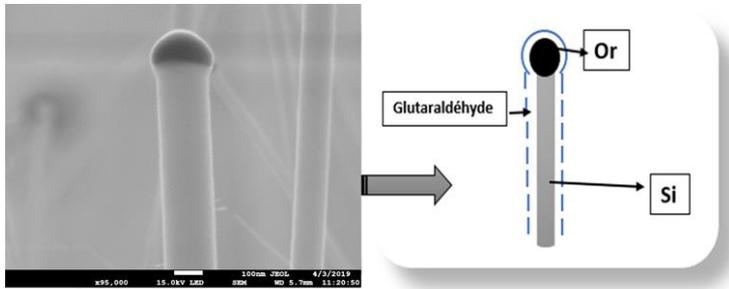


Figure 60: image MEB indiquant l'état de la surface des nanofils après le dépôt d'APTES et de glutaraldéhyde en phase vapeur, représentation schématique du nanofil.

#### IV.4 Fonctionnalisation GOBS de la surface des nanofils

En parallèle de la fonctionnalisation avec l'APTES et le glutaraldéhyde, un autre protocole a été développé en utilisant du (3-Glycidyloxypropyl) triméthoxysilane (GOPS) pour 2 raisons : i) éviter l'utilisation du glutaraldéhyde, qui est très toxique et ii) limiter le processus à une seule étape au lieu de deux.

Pour simplifier le processus de fonctionnalisation des nanofils de silicium, et le limiter à une seule étape réactionnelle, le GOPS a été utilisé pour la réaction de silanisation afin de permettre une immobilisation covalente des anticorps par addition nucléophile des groupes amines de la lysine sur le cycle époxyde (schéma 61).

La réaction a d'abord été réalisée selon un protocole similaire à celui décrit ci-dessus pour l'APTES en ajoutant un chauffage à 50°C pour permettre au GOPS de former des vapeurs dans le réacteur, son point d'ébullition étant supérieur à celui de l'APTES. Différents temps réactionnels ont été testés. Les analyses XPS ont révélé une augmentation de la teneur en carbone avec le temps de réaction (Figure 62). Le pic C1s a pu être déconvolué en trois composantes à 284,4, 286,1 et 288,1 eV. Le premier correspond aux liaisons C-C, et le second aux liaisons C-O et C-O-C. Le petit pic à 288,1 eV n'a pas pu être identifié.

Ces résultats ont mis en évidence la présence de GOPS sur la surface de SiO<sub>2</sub>. L'épaisseur

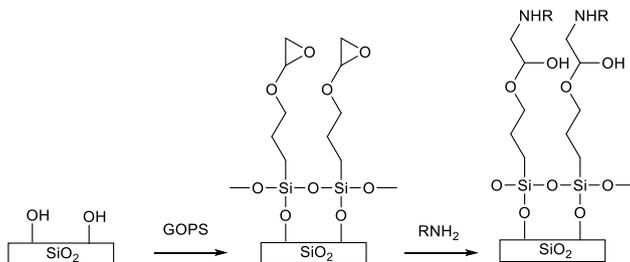


Figure 61: fonctionnalisation de la surface des nanofils avec le GOPS.

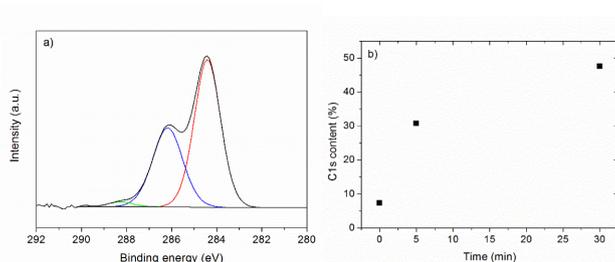


Figure 62: a) Spectres de photoémission N1s de surfaces de SiO<sub>2</sub> modifiées par GOPS b) Teneur en C1s en fonction du temps de réaction pour l'immobilisation de GOPS.

de la couche a été estimée à partir de la diminution des pics Si2p à 15 Å et 36 Å pour respectivement 5 et 30 min de réaction. La longueur du lieu étant d'environ 11 Å (énergie minimisée au niveau MM2 avec le logiciel Chem 3D Ultra), 1 ou 2 couches sont déposées pendant les 5 premières minutes de réaction. Ces conditions expérimentales ont donc été utilisées pour les expériences suivantes. Il a été signalé qu'une liaison covalente entre les protéines et les GOPS peut être formée par une réaction d'ouverture de cycle époxyde à température ambiante (RSC Adv., 2019, 9, 29182-29189). Pour vérifier l'efficacité de la réaction, la 4-nitrobenzylamine utilisée comme sonde XPS a été déposée dans un tampon phosphate de pH 7 sur la surface de SiO<sub>2</sub> préalablement modifiée par le GOPS. La réaction a été réalisée sous une atmosphère saturée en eau pendant 4h et 12h. Cependant, même après 12h de réaction, aucun pic n'a été observé autour de 405 eV, montrant qu'aucune espèce nitro n'était immobilisée sur la surface de SiO<sub>2</sub>. Les conditions réactionnelles, permettant le greffage covalent des anticorps, restent donc encore à optimiser. Pour cette raison, nous n'avons pas utilisé la méthode APTES/glutaraldéhyde pour la fonctionnalisation des nanofils de silicium dans la suite de ce travail.

## V. Matériels et méthodes biologiques pour la détection d'*E. coli*

Une fois la fonctionnalisation des surfaces de nanofils réalisée, l'anticorps est ensuite greffé, ce qui permet une fixation spécifique de l'espèce bactérienne choisie. Cette partie du chapitre permet de présenter les détails du matériel biologique (anticorps et bactéries) utilisé, et le protocole de greffage, comme décrit sur la figure 63 ci-dessous.

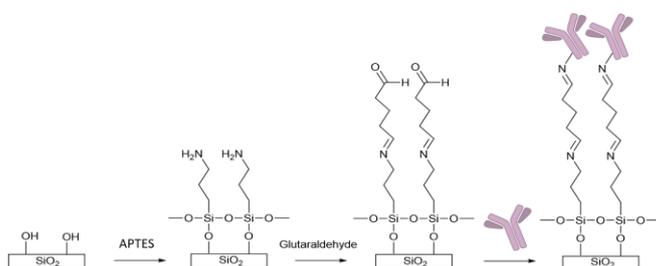


Figure 63: greffage des anticorps sur la surface des nanofils après la fonctionnalisation APTES/Glutaraldéhyde

Cette partie présentera dans un premier temps les souches bactériennes et anticorps utilisés, ainsi que les milieux de cultures, et réactifs employés.

### V.1 Souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes utilisées pour la détection électrique et durant les tests de fluorescence sont :

*Escherichia coli* ATCC 35218,

*Escherichia coli* GFP (ATCC® 25922GFP™),

*Staphylococcus aureus* GFP MG 003 contenant plasmide pCN52C (souche gracieusement fournie par le laboratoire BMR, Université de Rennes 1)

### V.2 Anticorps utilisés

Les anticorps qui ont été utilisés pour ces travaux sont :

## ANNÉE 2022

- Anticorps anti-*E. coli* : anti-LPS, (OBT1844 -1 mL) : solution mère à 4mg/mL (Conservation à -20°C)
- Anticorps anti *S. aureus* : anti-protéine A, (ABIN1842580 - 0,2 mL) : solution mère = 0,5mg/mL (Conservation à -20°C).

### V.3 Milieux de cultures, et réactifs utilisés

Les milieux de culture sont des milieux liquides et gélosés de Luria Broth (LB) (Merck Sigma Aldrich ; référence : L3522-1KG) et des géloses trypticase soja (TS) (D.Dutscher ; référence : 777410).

Plusieurs tampons ont été utilisés :

- Tampon PBS : 0,05 % Tween 20 pour les lavages des substrats. Ce dernier est un mélange entre 50 mL de PBS 1X et 25µL de Tween 20 (Ref : P1379, Sigma)
- Tampon lait 5% : avec 2,5 mL de PBS et 125 mg de lait en poudre soit 50g/L. Ce tampon de blocage est idéal pour saturer les sites de fixation des protéines en excès sur les membranes et les microplaques pour les applications de Western blotting et ELISA, respectivement. Généralement, 1-3% d'agent bloquant est suffisant pour la plupart des applications.
- Tampon anticorps avec 10 g de polyéthylène glycol 3350 (CAS : 25322-68-3, ref : P4338, Sigma-Aldrich), 1,25 g de BSA (albumine sérique bovine, ref : A3803, Sigma), 250 µL de Tween 20, en complétant qsp 250 mL d'eau.
- Tampon Cacodylate 0,2 M : Cacodylate de sodium 8,56g dans 200 ml d'eau distillée (Ref : C0250, Sigma) (PM= 214,05), pH ajusté à 7,2.
- Tampon Cacodylate 0,1M : dilution 1:1 du tampon cacodylate 0,2M dans de l'eau distillée
- Tampon Glutaraldéhyde à 2,5 % : 1 volume de glutaraldéhyde à 25%, 4 volumes d'eau distillée, et 5 volumes de cacodylate à 0,2 M à pH 7,2.
- La préparation de la suspension bactérienne se fait à partir de colonies prélevées sur une gélose de Luria Bertani (LB), incubée 18h à 37°C, afin d'obtenir une suspension à 0,5 McF (soit environ 10<sup>8</sup> UFC/mL) en LB. A partir de cette suspension, des dilutions sérielles sont alors réalisées en eau distillée stérile (figure 64).

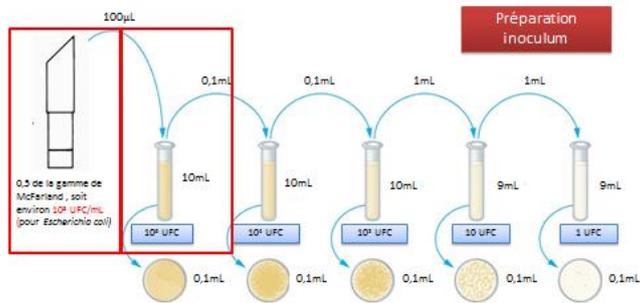


Figure 64: dilutions sérielles de la suspension bactérienne mère, et méthode de dénombrement des bactéries sur milieu gélosé.

Pour dénombrer les bactéries de l'inoculum, 100 µL de chaque dilution ont été étalés au râteau sur des géloses TS puis incubées entre 24 et 48h à 37°C. Le nombre des bactéries étalées sur une boîte de Pétri (pour chaque dilution) correspondent au nombre de colonies dénombrées après 24-48h d'incubation.

## VI. Méthodes de détections des bactéries

### VI.1 Méthode de détection par microscopie électronique à balayage MEB

Afin de permettre une visualisation au microscope électronique à balayage, les bactéries subissent un protocole spécifique. Ce dernier nécessite la préparation de deux réactifs, un tampon Cacodylate 0,1 M et un tampon Glutaraldéhyde 2,5%.

## ANNÉE 2022

Tout d'abord, la plaque (substrat) est mise quelques minutes à 37°C le temps que les bactéries se fixent et que le milieu s'évapore, puis on procède à une fixation, en émergeant ces derniers dans la solution glutaraldéhyde à 2,5% pH=7,2 pendant 24 heures. Les substrats sont ensuite rincés à l'aide du tampon cacodylate à 0,1M, puis mis dans le tampon cacodylate (solution d'attente). Pour finir une déshydratation est réalisée. Finalement une métallisation est effectuée sur le substrat avec le dépôt d'une fine couche d'or. Le MEB permet d'observer la surface d'échantillon biologique, validant ainsi la présence des bactéries sur la surface, et l'identification (figure 65) de la forme et de la structure de la bactérie. Les observations ont été

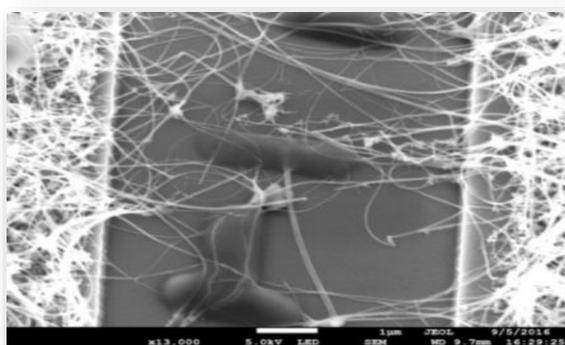


Figure 65 : image obtenue à l'aide du MEB de la plateforme NanoRennes indiquant la présence des bactéries sur des nanofils de Silicium.

réalisées à l'aide du microscope électronique à balayage FEG JEOL 7600 de la plateforme NanoRennes de l'Université de Rennes 1.

### VI.2 Méthode de détection des bactéries par fluorescence

Les observations par fluorescence ont été effectuées pour valider le protocole d'accrochage, avec le Microscope droit Leica DM 5500 (objectif 10x NA 0.3) de la plateforme Biosit de l'Université de Rennes 1.

La fluorescence est réalisée sur des lames en verre de (5 cm X 5 cm) recouvertes de deux couches, respectivement d'oxyde de silicium SiO<sub>2</sub> 500 nm et de silicium polycristallin 300 nm. Une croissance des nanofils de silicium pleine plaque est effectuée sur la surface des lames, suivie des étapes de fonctionnalisation. Le greffage des anticorps et le dépôt de différentes

## ANNÉE 2022

concentrations de bactéries fluorescente GFP sont réalisés suivant un protocole précis présenté dans le paragraphe suivant.

Plusieurs tests de fluorescence ont été réalisés, afin de valider les différentes étapes du protocole, et les résultats seront présentés dans le chapitre 4. Les objectifs seront de :

- Valider le protocole de fonctionnalisation du capteur,
- Valider le greffage spécifique des anticorps sur la surface des nanofils,
- Tester l'effet du rinçage à l'eau distillée et avec la solution de PBS (Phosphate-buffered saline).
- Etudier le taux d'accrochage des bactéries en fonction de la concentration déposée.
- Valider la spécificité, en testant des dépôts croisés (anticorps anti-*E. coli* LPS + *S. aureus* GFP). Pour réaliser les tests de fluorescence, 10µL de Tampon anticorps et 30µL de chaque dilution bactérienne sont déposés sur la surface des nanofils.

Plusieurs mesures par fluorescence ont été effectuées :

Dans un premier temps, quatre tests ont été réalisés sur plusieurs (endroits de la plaque en verre )

(A) anticorps anti- *E. coli* LPS ;

(B) solutions bactériennes *E. coli* GFP (ATCC® 25922GFP™) à une concentration de 10<sup>8</sup>UFC/mL avec son anticorps anti-*E. coli* LPS (une goutte de 10 µL de la solution à 200 µg/ml est déposée) ;

(C) Bactérie *E. coli* GFP ;

(D) et sur un Témoin avec de l'eau distillée (figure 66)

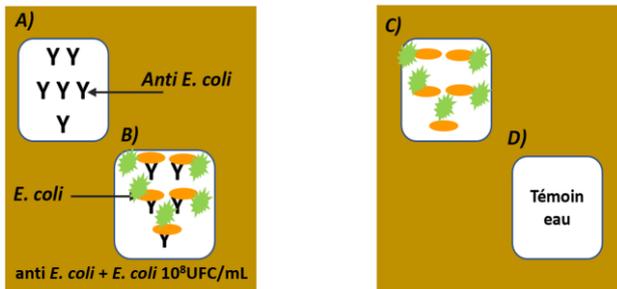


Figure 66 : : deux plaques en verre, avec des nanofils de silicium sur la surface, utilisées pour les tests de fluorescence, A) anticorps anti-*E. coli* LPS, B) anticorps anti-*E. coli* LPS+ *E. coli*  $10^8$ UFC/mL, C) *E. coli*, D) témoin eau distillée.

La solution PBS est un tampon qui sert surtout à rincer les bactéries lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu de culture. Ce type de solution, appelée électrolyte, contient des sels et est donc une substance conductrice qui, en raison de la présence d'ions mobiles, pourrait influencer la caractérisation électrique. Pour éviter une modification du courant lors du rinçage, une modification du protocole a été apportée, en remplaçant le PBS par l'eau distillée. Trois rinçages (figure 67) au PBS, à l'eau distillée stérile, et PBS puis eau distillée stérile ont été effectués sur des surfaces avec des nanofils, après le greffage des anticorps anti-*E. coli* LPS et le dépôt des bactéries *E. coli* GFP ( $10^8$  UFC/mL).

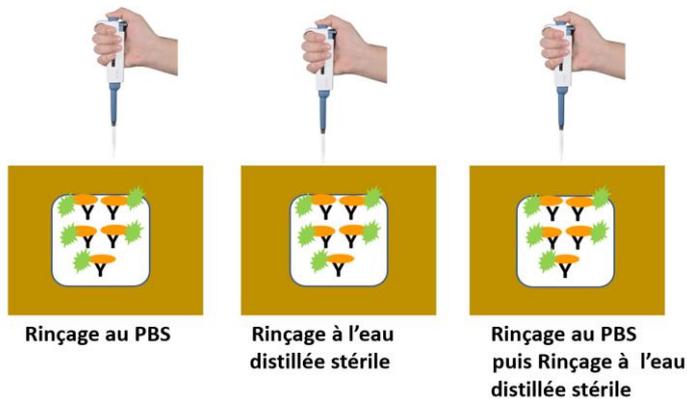


Figure 67 : les trois rinçages effectués sur des plaques en verre avec des nanofils de silicium, anticorps anti-*E. coli* LPS et *E. coli* GFP  $10^8$  UFC/mL.

Pour étudier le taux d'accrochage en fonction de la concentration bactérienne déposée, trois concentrations d' *E. coli* GFP ( $10^3$ ,  $10^6$ ,  $10^8$  UFC/mL), et un témoin anticorps anti- *E. coli* LPS ont été testées. Et un test croisé anticorps anti-*S. aureus* protéine A + *E. coli* GFP a été effectué pour la validation de la spécificité, offerte par le protocole de fonctionnalisation et du greffage des anticorps (figure 68). Les résultats obtenus seront présentés dans le chapitre 4.

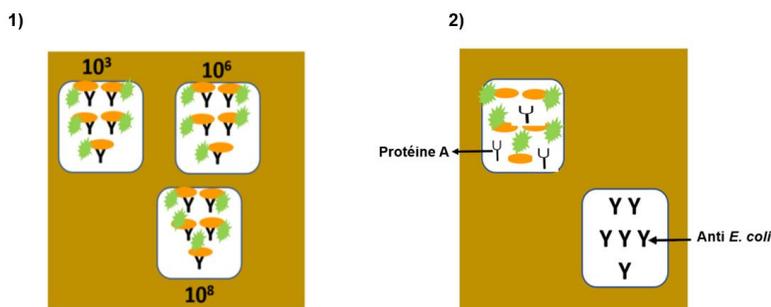


Figure 68: tests de fluorescence 1) trois concentration testées  $10^3$ ,  $10^6$ , et  $10^8$  UFC/mL, 2) tests croisés : anticorps anti-*E. coli* LPS+ *S. aureus* GFP / Témoin anticorps anti-*E. coli* LPS.

### VI.3 Protocoles de détection par la méthode « Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay » (ELISA)

Le test ELISA (« Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay ») est un test de biochimie analytique qui utilise un immunodosage enzymatique en phase solide pour détecter la présence d'une substance, généralement un antigène (ou un anticorps). Cette technique permet de détecter de très faibles quantités de substances. Les étapes du protocole ELISA ont été réalisées sur nos capteurs avant les mesures électriques.

- La première étape est la fixation de l'anticorps sur le capteur (le « coating »). Cela consiste à incuber  $10\mu\text{L}$  d'anticorps pendant toute une nuit à  $4^\circ\text{C}$  en atmosphère humide sur tous les capteurs sauf sur le capteur témoin (blanc) sans anticorps (qui est remplacé par le tampon anticorps seul). Les anticorps en excès sont éliminés le lendemain matin en lavant 4 fois avec du PBS/0,05% de Tween 20 ou eau distillée en le faisant couler le long de la lame/capteur à l'aide d'une pastette stérile.

- L'étape suivante est la saturation des sites non occupés par les anticorps, dans le but de les bloquer et empêcher l'accrochage non spécifique des bactéries à la surface. Les plaques ont été saturées avec 10  $\mu$ L de lait 5%, après 30 min à 37°C en atmosphère humide ; l'excès du lait est éliminé en rinçant à l'eau distillée.

- Finalement la dernière étape est la fixation des suspensions bactériennes sur les puits du capteur. Pour cela, 30  $\mu$ L de chaque dilution bactérienne ont été déposés en triplicat (chaque dépôt est réalisé 3 fois) en respectant la configuration souhaitée.

- Les plaques sont incubées 30 min à température ambiante en atmosphère humide, et elles sont lavées 4 fois avec du PBS/ 0,05% de Tween 20 en le faisant couler le long de la lame/capteur à l'aide d'une pastette stérile.

#### VI.4 Mesures électriques

Après validation du protocole de fonctionnalisation des nanofils, du greffage des anticorps et de la fixation des bactéries, l'intérêt majeur de ces travaux est la caractérisation électrique des capteurs.

Quatorze capteurs ont été réalisés sur chaque substrat (figure 69) afin d'étudier leur réponse électrique et la comparer avec les résultats de la fluorescence. Sur le modèle électrique, la résistance du capteur est modifiée par l'interaction électrique entre les bactéries et les nanofils, du fait de la charge électrique des bactéries. Les tests électriques sont réalisés afin d'étudier l'influence de la présence des anticorps dans un premier temps, pour ensuite étudier la variation du courant en fonction de chaque concentration bactérienne déposée, et finalement pour étudier la sensibilité et la spécificité des biocapteurs.

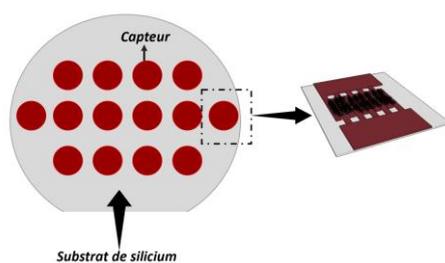
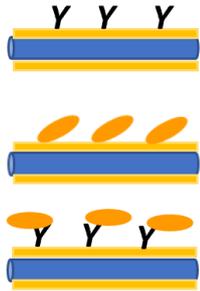


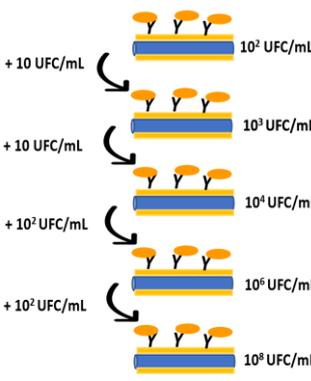
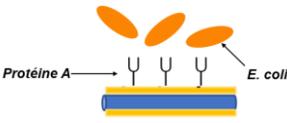
Figure 69: surface du substrat de silicium avec les 14 capteurs.

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un appareil de mesures (B1500A), le courant est mesuré pour chaque concentration bactérienne en étudiant les courbes I(V).

Les tests électriques sont réalisés sur les capteurs, en reproduisant les mêmes expériences. Pour démontrer la reproductibilité de la détection par les capteurs, les expériences ont été réalisées en triplicat. La variation du courant a été mesurée pour étudier l'effet de charges apportées par ces deux types de bactéries. Les tests réalisés sont indiqués sur le tableau 2 avec un schéma descriptif, et les résultats seront présentés dans le chapitre suivant.

Tableau 2: plan des expériences réalisées pour la préparation de la surface des nanofils de silicium pour la caractérisation électrique

Objectifs des expériences	Dépôt sur le capteur	Schéma illustratif
Etude de la réponse électrique du capteur avec ou sans anticorps sur les nanofils de Silicium.	Anticorps Anti- <i>E. coli</i> LPS 10 $\mu$ L  <i>E.coli</i> ( $1.10^8$ UFC/mL)  Anticorps Anti- <i>E. coli</i> LPS 10 $\mu$ L) + <i>E. coli</i> ( $1.10^8$ UFC/mL)	
Etude de la réponse électrique des capteurs en fonction de différentes concentrations bactériennes, déposées	Anticorps Anti- <i>E. coli</i> LPS(10 $\mu$ L) + <i>E.coli</i> ( $1.10^8$ UFC/mL)  Anticorps Anti- <i>E. coli</i> LPS 10 $\mu$ L) + <i>E.coli</i> ( $1.10^6$ UFC/mL)	<p><b><math>10^8</math> UFC/mL</b></p> 

<p>sur plusieurs capteurs en parallèle. (Sensibilité)</p>	<p>Anticorps Anti-<i>E. coli</i> LPS 10 <math>\mu</math>L) + <i>E. coli</i> (<math>1.10^3</math>UFC/mL)</p>	<p><b><math>10^6</math> UFC/mL</b></p>  <p><b><math>10^3</math> UFC/mL</b></p> 
<p>Validation des résultats électriques, en utilisant le même capteur.</p>	<p>Anticorps Anti-<i>E. coli</i> LPS 10<math>\mu</math>L) + <i>E. coli</i> (<math>1.10^2</math>à<math>1.10^8</math> UFC/mL)</p> <p><b>Méthode :</b></p> <p>Pour réaliser ces tests, la plus faible concentration <math>10^2</math>UFC/mL a tout d'abord été déposée, suivi d'un test électrique. Ensuite, une concentration plus importante est ajoutée sur le même capteur pour compléter jusqu'à arriver à la concentration maximale <math>10^8</math> UFL/mL.</p>	
<p>Etude de la spécificité : utilisation des anticorps <i>anti E. coli</i> LPS + <i>S. aureus</i>.</p>	<p>Anticoprs anti-<i>S.aureus</i> Protéine A 10 <math>\mu</math>L + <i>S. aureus</i> <math>1.10^8</math> UFC/mL</p>	

## VII. Conclusion

L'objet de ce chapitre était d'expliciter la fabrication du capteur, le matériel biologique et les méthodes de détection des bactéries.

Dans un premier temps, un nouveau jeu de masques a été conçu avec un nouveau design du capteur afin d'optimiser la détection des bactéries dans la zone sensible des capteurs, dans l'objectif d'obtenir des résultats reproductibles.

La première partie de ce chapitre a permis de décrire les étapes de la fabrication technologique des capteurs à base de nanofils de silicium par un procédé de fabrication à deux niveaux de masquage utilisant les technologies classiques de la microélectronique silicium.

L'étape de fonctionnalisation chimique a ensuite été explicitée, afin de préparer la surface des nanofils permettant la fixation des anticorps, utilisant pour cela deux agents chimiques (APTES et glutaraldéhyde). La caractérisation physique de cette étape a été validée par une caractérisation XPS permettant d'étudier l'épaisseur des couches. Les protocoles et méthodes de détection des bactéries par fluorescence, microscopie à balayage et par mesures électriques ont ensuite été détaillés.

Enfin, un plan d'expérience a été présenté. Le chapitre suivant va permettre de présenter les résultats expérimentaux, à la fois les résultats de la fluorescence, les observations au MEB et la détection électrique.

## **Chapitre 4**

# **Résultats et études de la détection électrique des bactéries**

## I. Introduction :

Après avoir décrit les étapes de fabrication des biocapteurs à base de nanofils de silicium, la fonctionnalisation, et le protocole de fixation des bactéries, nous allons présenter dans ce chapitre les résultats obtenus pour la détection de bactéries par mesures électriques.

Le capteur est constitué d'un réseau de nanofils entrelacés entre les électrodes interdigitées, la présence de nombreuses jonctions permet des connexions électriques entre les nanofils, permettant au courant de circuler entre les électrodes interdigitées quand le composant est polarisé. La présence des charges positives ou négatives portées par le matériel biologique va ainsi avoir une influence sur la conductance électrique. La détection des bactéries est effectuée grâce à des mesures électriques, en étudiant les variations des courbes courant-tension  $I(V)$  des résistances utilisées comme capteurs. Le décalage du courant avant et après l'immobilisation des bactéries peut ainsi être mesuré.

Les caractéristiques électriques statiques des capteurs sont recueillies à l'air ambiant et à température ambiante, après séchage des gouttes liquides contenant le matériel biologique. Quatorze biocapteurs étant fabriqués sur chaque substrat de silicium dans les mêmes conditions, une étude de reproductibilité de la réponse a pu être menée et les courbes proposées dans ce chapitre reflètent la réponse moyenne de ces capteurs. En parallèle, des analyses de fluorescence vont permettre d'observer l'immobilisation des bactéries (portant des protéines fluorescentes) et ces analyses seront comparées aux mesures électriques.

Nous commencerons tout d'abord par présenter les résultats exploratoires établis au laboratoire et préliminaires à ces travaux. Nous étudierons ensuite la sensibilité du capteur en se basant sur la réponse des capteurs avec différentes concentrations bactériennes, en considérant deux bactéries différentes séparément : *E. coli* (Gram négative) et *Staphylococcus aureus* (Gram positive). Enfin, nous ferons une première approche de spécificité de la détection.

## II. Résultats électriques exploratoires préalables à ces travaux

Des premières études sur la détection de bactéries à partir de capteurs basés sur des nanofils de silicium ont été menées au sein du département Microélectronique et Microcapteurs de l'IETR, en préalable à cette thèse [82]

Comme indiqué dans le chapitre III, l'ancien jeu de masques présentait quatre cellules de peignes interdigités avec un nombre de dents variables. La caractérisation électrique de trois types de résistances avec  $n = 20, 40, 100$  est présentée sur la figure 70. Les graphiques montrent que le niveau de courant à travers la résistance électrique globale augmente lorsque le nombre de dents des électrodes interdigitées augmente. Ces résultats sont liés aux variations linéaires de la conductance ( $G=I/V \sim 2n/R_0$ ) avec  $n$  rapportées dans l'encart de la figure 70 (pour une valeur moyenne  $R_0 \sim 1.9 \times 10^9 \Omega$ ), et valident le modèle électrique équivalent présenté chapitre 3.

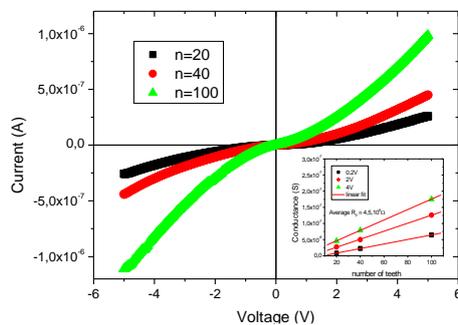


Figure 70 Caractéristique  $I(V)$  des résistances à base de nanofils de silicium avec des électrodes en peigne interdigités de 20, 40 et 100 dents. Encart : variations de la conductance électrique en fonction du nombre de dents à 0,2 V, 2 V et 4 V (Ancien jeu de masques) [82]

Cependant, la puce utilisée comme capteur n'était pas optimisée en termes de nombre de peignes interdigités et espacement entre les électrodes. Le protocole de test a consisté en un test électrique  $I(V)$  avant puis après dépôt et séchage de la goutte bactérienne, sans aucune fonctionnalisation des nanofils, et en utilisant différentes concentrations bactériennes *E. coli*. La figure 71-a montre une photo MEB de la structure. On observe majoritairement la présence des bactéries (points noirs) accrochées aux nanofils qui constituent la partie sensible entre les électrodes interdigitées dans la partie sensible du capteur, mais également sur les bords du capteur, en dehors de la zone sensible : dans ce cas, ces bactéries ne seront pas détectées électriquement. Les résultats électriques observés figure 71-b semblaient toutefois prometteurs à partir de ces premiers essais, avec une variation importante du courant sans et avec bactéries.

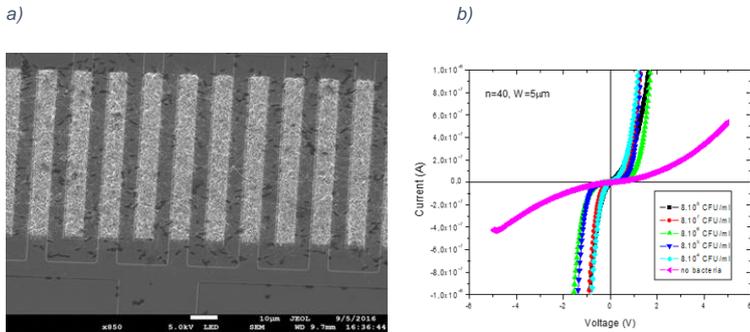


Figure 71: a) Image MEB de la surface après le dépôt des bactéries sur les peignes interdigités, b) résultats électriques de la détection d'*E. coli* sur un capteur sans fonctionnalisation avec 40 dents interdigitées. [82]

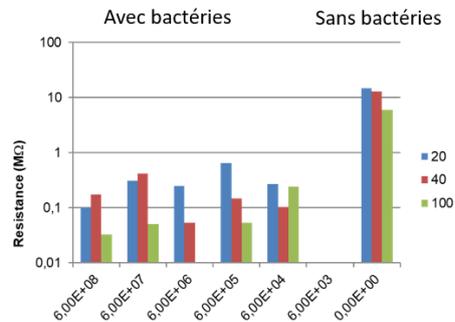


Figure 72: variation de la résistance en fonction de la concentration bactérienne déposée sur des capteurs avec un nombre de dents des peignes interdigités variable (20, 40 et 100). [82]

Cependant, comme le montre l'histogramme de la figure 72, ces résultats ont montré une variation de la résistance électrique globale du capteur non corrélée avec la concentration bactérienne.

Cette première expérimentation de faisabilité a montré deux failles majeures : i) le manque de relation significative entre la variation du courant et les concentrations bactériennes et ii) la géométrie et le nombre de peignes interdigités inadaptés pour la détection de toutes les bactéries sur la partie sensible du capteur. Ces résultats exploratoires étaient cependant intéressants car ils ont permis de montrer la possibilité de détecter la présence de bactéries (*E. coli*) à une concentration de  $6 \times 10^3$  UFC/mL.

Cet état des lieux nous a permis d'imaginer des solutions pour développer un nouveau capteur optimisé pour la détection spécifique des bactéries à partir de deux axes majeurs : i) le développement d'une nouvelle structure en développant des nouveaux masques technologiques (présentés chapitre 3-II) avec une surface sensible permettant de détecter toutes les bactéries, et ii) la mise au point d'un protocole de fonctionnalisation chimique pour un accrochage spécifique des bactéries (présentés chapitre 3-III).

### III. Validation du protocole de fonctionnalisation et de détection par MEB et par fluorescence.

La visualisation au microscope électronique à balayage (MEB) a permis de vérifier l'accrochage des bactéries et de valider le protocole de fonctionnalisation. Nous constatons sur la figure 73 que les bactéries ont tendance à s'accrocher préférentiellement sur les nanofils. La forme en bâtonnet d' *E. coli* est bien visualisée sur les images MEB, avec une longueur moyenne de 2  $\mu\text{m}$  et largeur de 1  $\mu\text{m}$ . Nous constatons sur les images que dans certains cas celles-ci s'accrochent en constituant des amas bactériens, sur les nanofils de silicium qui sont situés sur la surface du capteur.

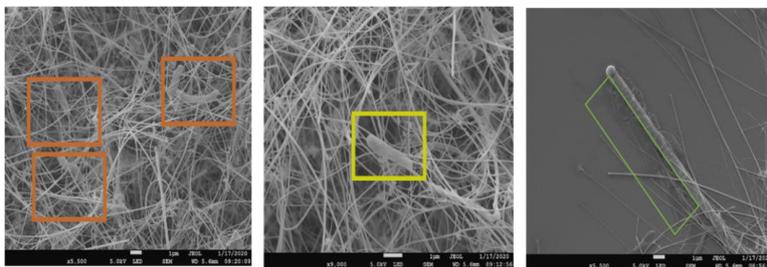


Figure 73 : image MEB indiquant l'état de la surface des nanofils et l'accrochage des *E. coli*.

#### III.1 Etude de fluorescence en fonction après la fonctionnalisation de la surface et en fonction de la présence d'anticorps.

Afin de valider le protocole d'accrochage, des observations par fluorescence ont été effectuées, avec le Microscope droit Leica DM 5500 (objectif 10x NA 0.3). Des substrats en verre ont été utilisés, ils ont subi le même protocole décrit précédemment pour la synthèse et

la fonctionnalisation des nanofils. Pour la visualisation, nous avons utilisé des *E. coli* ayant incorporés le gène codant pour la protéine fluorescente GFP (fluorescence verte). La figure 74-a montre l'image de fluorescence avec une solution qui ne contient que de l'eau et servant de référence (test blanc), afin de vérifier l'intensité lumineuse de la surface (bruit de fond). L'image sombre rapportée après l'analyse de fluorescence des nanofils de silicium, fonctionnalisés sans anticorps ni bactéries, confirme que la surface ne contient aucun élément fluorescent.

Ensuite nous avons vérifié l'influence des anticorps *anti-E. coli* LPS sur la qualité de l'accrochage des bactéries, et pour cela des tests de fluorescence de bactéries ont été réalisés avec et sans anticorps. La figure 74-c montre une fluorescence beaucoup plus importante de la suspension mère ( $10^8$  UFC/mL), déposée sur une zone avec des anticorps *anti-E. coli* LPS que sur la zone sans anticorps figure 74-b. Nous déduisons de ces résultats, obtenus par fluorescence, que les anticorps ont une influence importante sur le greffage des bactéries. Nous constatons aussi qu'un plus grand nombre de bactéries est fixé sur la surface grâce à la fonctionnalisation.

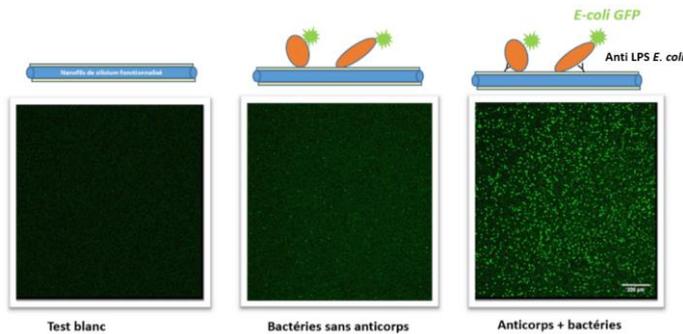


Figure 74: résultats de la détection d'*E. coli* obtenus par le microscope à fluorescence a) sans anticorps ni bactéries, b) en présence des bactéries sans anticorps, c) en présence des bactéries et des anticorps.

Les tests réalisés confirment l'intérêt d'une couche d'anticorps pour favoriser l'accrochage des bactéries sur la surface des nanofils pour augmenter la sensibilité. En utilisant le logiciel d'analyse d'image « Image J », nous avons pu estimer le nombre maximal des bactéries accrochées sur les substrats (figure 75-a). En scannant les images obtenues par la fluorescence, chaque point vert sur l'image correspond à une bactérie. Les résultats semi-quantitatifs sont présentés sur l'histogramme de la figure 75-b. Sur le substrat avec les bactéries *E. coli* et leurs anticorps, 3387 bactéries ont été fixées sur une surface de  $5.4 \mu\text{m}^2$ , contrairement à la surface sans anticorps sur laquelle 485 bactéries fixées par  $5.4 \mu\text{m}^2$  ont été comptées.

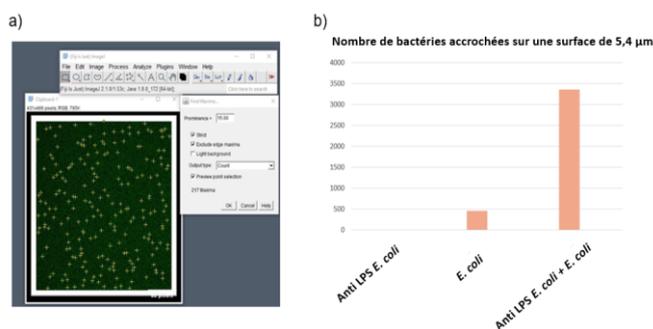


Figure 75: a) Seuillages des images par un Image J, b) nombre de bactéries accrochées sur une surface de  $5.4 \mu\text{m}^2$ .

### III.2 Etude de la fluorescence en fonction de différentes concentrations bactériennes.

En parallèle de ces dernières mesures, des observations par fluorescence ont été effectuées dans le but de vérifier la variation de la quantité des bactéries accrochées sur la surface en fonction de la concentration bactérienne déposée. La gamme de concentration a été étudiée entre  $10^8$  -  $10^3$  UFC/ml. Des rinçages successifs ont été appliqués sur la surface des nanofils après la fixation des suspensions bactériennes, pour éliminer les bactéries qui n'ont pas de liaison covalente avec les anticorps. Après fixation des anticorps anti-*E. coli* LPS sur les nanofils, une première visualisation a été réalisée afin de vérifier l'absence de bruit de fond qui pourrait influencer les résultats (témoin). Les observations ont été menées sur trois lames en verre recouvertes de nanofils de silicium, ayant subi le même protocole de fonctionnalisation que pour les capteurs. Trois concentrations bactériennes ont été déposées,

$10^3$ ,  $10^6$ , et  $10^8$  UFC / mL. (figure 76 a, b, c, d). La présence de l'anticorps influence positivement l'accrochage des bactéries, et le nombre de bactéries sur la surface augmente en fonction de la concentration bactérienne. L'analyse des images présentées sur la figure (76) a montré que le nombre de bactéries accrochées sur la surface est de 30, 600, 3387 sur une surface de  $5,4 \mu\text{m}^2$ , pour des concentrations respectivement de 0,  $10^3$ ,  $10^6$  et  $10^8$  UFC /mL (figure 77)

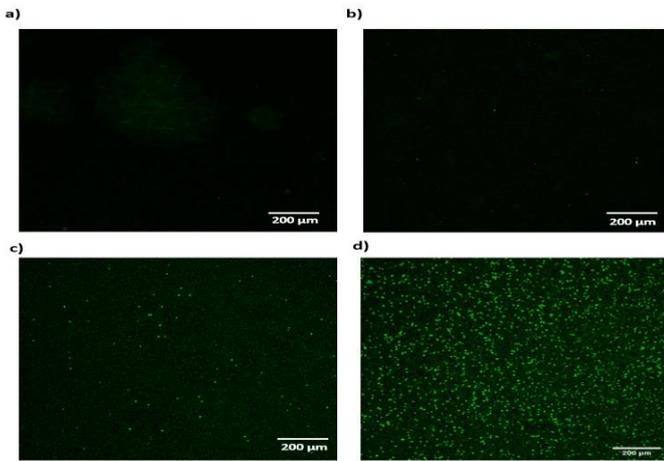


Figure 76: résultats de la fluorescence sur des substrats de verre recouverts de nanofils de silicium fonctionnalisés a) anticorps anti-*E. coli* LPS (témoin) b) anticorps anti-*E. coli* LPS + *E. coli*  $10^3$  UFC/mL, c) anticorps anti-*E. coli* LPS + *E. coli*  $10^6$  UFC/ml, d) anticorps anti *E. coli* LPS + *E. coli*  $10^8$  UFC/ml. Grossissement x 20

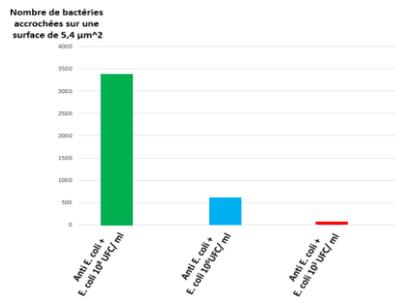


Figure 77: nombre d'*E. coli* GFP accrochés sur les nanofils de silicium sur une surface scannée de  $5,4 \mu\text{m}^2$

## IV. Caractérisations électriques

### IV.1 Caractérisation électrique après la croissance des nanofils

Après la fabrication de ces nouveaux capteurs, nous avons étudié la variation du courant directement après la croissance des nanofils (schéma figure 78-a) c'est-à-dire que les mesures électriques (figure 78-b) sont réalisées sur des structures avec des nanofils de silicium avant l'étape de fonctionnalisation. Nous constatons que le comportement de la courbe I(V) est symétrique avec un comportement non ohmique à basse tension dans l'intervalle [- 1V ; 1V], et le niveau de courant à 1 V est de  $4,3 \times 10^{-8}$  A. Ce comportement est lié au modèle électrique de la résistance électrique globale décrit précédemment chapitre 3.

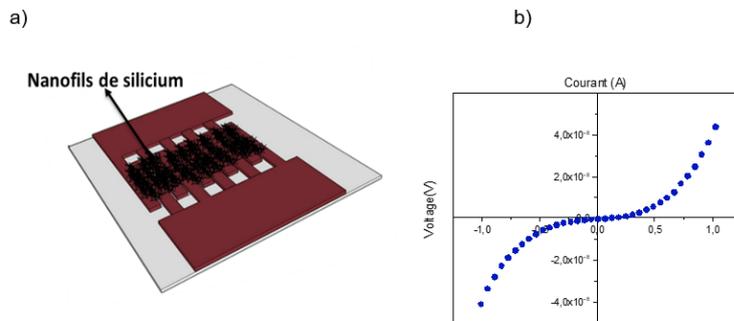


Figure 78 : a) schéma du capteur après la croissance des nanofils et b) réponse électrique de capteur après la croissance des nanofils de silicium I(V).

Aux faibles tensions de polarisation, la résistance électrique associée aux nanofils ( $R_{NW}$ ) domine en raison de la résistivité électrique élevée des nanofils de silicium non dopés. Dans ce cas, des barrières énergétiques sont induites à l'interface entre deux nanofils interconnectés, conduisant à une quasi-désertion en porteurs des nanofils due au piégeage de ceux-ci lié aux défauts d'interface [82],[127] Pour des tensions élevées, ces barrières énergétiques sont abaissées, ce qui entraîne une diminution de la  $R_{NW}$ , et dans ce cas, la résistance électrique globale est à la fois contrôlée par les contributions de  $R_{NW}$  et de  $R_S$ . Le domaine d'intérêt pour la détection des bactéries a été choisi pour des mesures à basse tension (-1V à 1V) où la résistance électrique des nanofils domine.

#### IV.2 Caractérisation électrique après le greffage des anticorps *anti-E. coli* LPS sur les nanofils

L'étape suivante est la caractérisation électrique des capteurs après les étapes de i) fonctionnalisation chimique des nanofils, ii) le greffage des anticorps et iii) la saturation des sites non spécifiques sur la zone sensible, comme décrit par le schéma sur la figure 79. Ces caractéristiques I(V) nous serviront de référence pour la détection des bactéries.

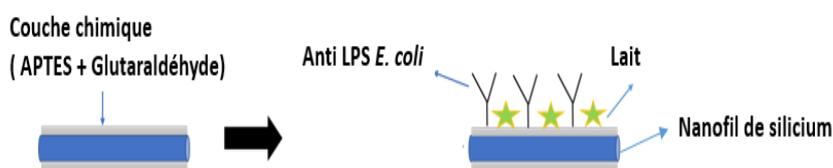


Figure 79: schéma d'un nanofil après la fonctionnalisation chimique, la fixation des anticorps et la saturation des sites non spécifiques avec un agent bloquant.

Sur la figure 80, la courbe noire présente la réponse électrique du capteur après la fonctionnalisation chimique des nanofils, et la courbe rouge indique le niveau de courant après la fixation des anticorps. On observe que l'accrochage des anticorps apporte un très faible changement dans la réponse électrique. D'autre part, une légère dispersion de la variation de courant a été observée entre les capteurs testés, que l'on peut attribuer d'une part à la variabilité du nombre de nanofils, et d'autre part à l'influence des conditions expérimentales comme la variation de concentration en sel dans la solution tampon et les conditions de rinçage. Le tracé I(V) correspondant (figure 80, courbe rouge) sert de référence pour contrôler la liaison des bactéries avec les anticorps, le niveau de courant indiqué par la caractérisation électrique du capteur après la fixation des anticorps à une tension de 1V est de  $3,5 \times 10^{-8}$  A.

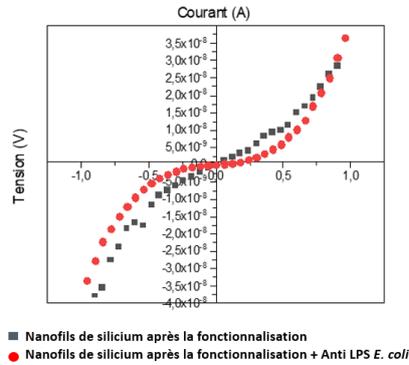


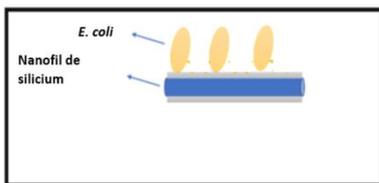
Figure 80: réponse électrique de capteur courbe I(V) après la fonctionnalisation et la fixation de l'anti LPS *E. coli*

## V. Détection électrique de la bactérie *E. coli*

### V.1 Influence de la présence des anticorps anti-*E. coli* LPS sur la détection électrique des *E. coli*

Dans le but d'étudier l'importance des anticorps sur la fixation des bactéries, nous avons effectué des tests électriques de détection de bactéries, sur des capteurs (figure 81) : a) uniquement avec des nanofils fonctionnalisés sans anticorps sur lequel une goutte bactérienne a été déposée, b) sur des nanofils fonctionnalisés avec des anticorps, du lait comme agent bloquant pour saturer les sites non spécifiques et la suspension bactérienne (10  $\mu$ L).

a)



b)

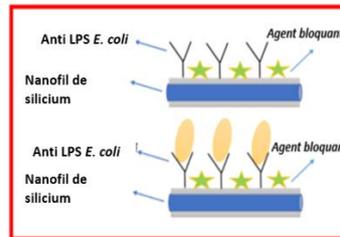


Figure 81: état de la surface de nanofils a) avec fonctionnalisation + bactéries b) avec fonctionnalisation + anticorps+ agent bloquant + bactéries.

Une goutte de 30  $\mu\text{L}$  avec une concentration bactérienne de  $10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$  d'*E. coli* est déposé sur la surface sensible de chaque capteur.

La figure 82 en échelle linéaire montre la réponse électrique du capteur après fonctionnalisation des nanofils et dépôt de bactéries, en l'absence d'anticorps (courbe rouge), et en présence d'anticorps (courbe bleue). Dans les deux cas la même concentration bactérienne de  $10^8 \text{ UFC/mL}$  a été déposée, et les mesures électriques ont été réalisées à faible tension de polarisation (-1V à 1V). La réponse électrique observée sur la figure 82 indique une variation de courant plus élevée pour les capteurs avec des anticorps qu'avec les capteurs sans anticorps. Cela confirme que ces anticorps spécifiques aux bactéries *E. coli* permettent un taux d'accrochage plus important dû aux liaisons covalentes entre les bactéries et leurs anticorps.

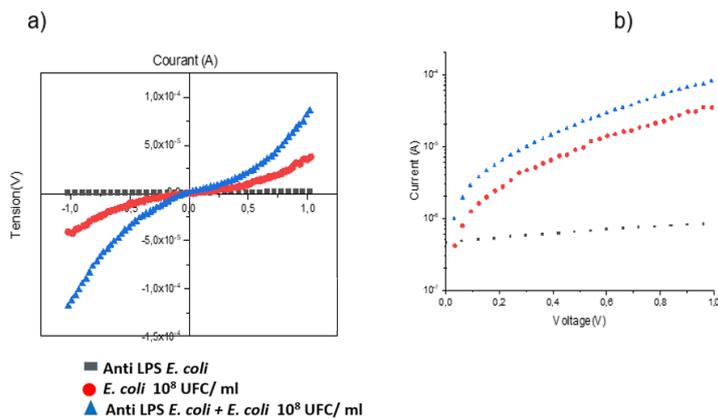


Figure 82: courbes I(V) représentent respectivement le niveau de courant du capteur avec la fonctionnalisation chimique + anticorps anti-*E. coli* LPS (courbe noire), fonctionnalisation + bactéries *E. coli* sans anticorps (courbe rouge), et fonctionnalisation + Anticorps anti-*E. coli* LPS + bactéries *E. coli* (courbe bleue). Représentation en : a) échelle linéaire, b) échelle logarithmique.

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre, la paroi extérieure d'une bactérie de type *E. coli* (Gram négatif) contient du LPS portant des charges négatives. Ainsi, lors de l'accrochage des bactéries *E. coli*, celles-ci apporteront des charges électriques négatives,

conduisant à un niveau de courant plus élevé avec les bactéries *E. coli* et leurs anticorps anti-*E. coli* LPS. Une hypothèse plausible qui peut être évoquée et qui sera détaillée dans le paragraphe VII serait que cette charge apportée par les bactéries aurait pour effet de jouer le rôle de grille biologique sur les nanofils et donc de modifier (dans notre cas diminuer) la résistivité électrique associée.

## V.2 Etude de la variation de courant en fonction de la concentration bactérienne déposée.

Nous avons ensuite étudié la sensibilité du capteur, c'est-à-dire la réponse du capteur en fonction de la concentration bactérienne. L'intérêt majeur de cette partie est d'étudier la réponse électrique en fonction de différentes concentrations bactériennes. Les dépôts des concentrations bactériennes ont été faits en triplicats (figure 83) afin de vérifier la stabilité de la réponse électrique. Les courbes I-V obtenues indiquent la tendance moyenne de la variation du courant.

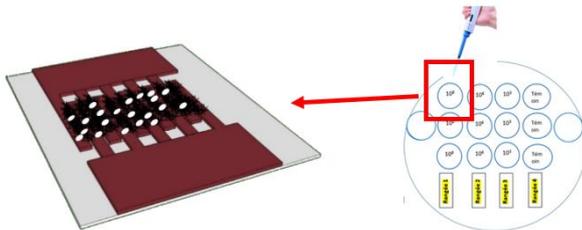


Figure 83: état de la surface du capteur après l'accrochage des bactéries *E. coli*

Les concentrations utilisées pendant cette étape de mesure sont comprises entre  $10^3$  et  $10^8$  UFC/mL. Les résultats sont présentés par les 4 courbes de la figure 84-a dont la courbe noire est le témoin qui concerne un capteur avec des anticorps seuls, les courbes verte, bleue, et rouge représentent respectivement les concentrations  $10^8$ ,  $10^6$ , et  $10^3$  UFC/mL de bactéries *E. coli*. Nous observons que le niveau de courant est plus élevé à mesure que la concentration de bactéries l'est aussi.

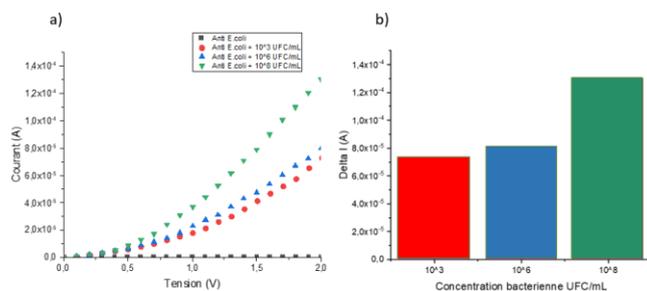


Figure 84: étude du courant en fonction de la concentration bactérienne déposée (a) avec les anticorps anti *E. coli* LPS la courbe noire qui représente le témoin (le blanc), et les courbes rouge, bleu, et verte pour des concentrations de bactéries respectivement de  $10^3$ ,  $10^6$  et  $10^8$  UFC/mL, (b) la variation du courant par rapport au témoin est donnée sur l'histogramme indiquant la variation delta I pour les 3 concentrations bactériennes déposées à la surface du capteur à une tension de 1V.

Une autre représentation nous donne les variations du courant (Delta I) par rapport au témoin et mesurées à 1V (figure 84-b). A une tension de 1V le courant pour des capteurs contenant les anticorps anti-*E. coli* LPS et les bactéries *E. coli* ( $10^8$  UFC/ mL), augmente pour atteindre  $1,29 \cdot 10^{-4}$  A.

### V.3 Etude de la sensibilité du biocapteur aux bactéries *E-coli*.

Dans un deuxième temps, nous avons décidé de tester toutes les concentrations sur le même capteur, afin de garder les mêmes conditions à chaque test. Pour réaliser ces tests, la plus faible concentration de  $10^2$ UFC/mL est tout d'abord déposée, puis, après un temps d'incubation/rinçage/séchage décrit dans le protocole (indiqué sur le chapitre 3-V.4 tableau 2), un test électrique est effectué ; ensuite, une deuxième concentration de bactéries est ajoutée sur le même capteur suivi d'un deuxième test électrique et ainsi de suite jusqu'à la concentration maximale  $10^8$  UFC/mL.

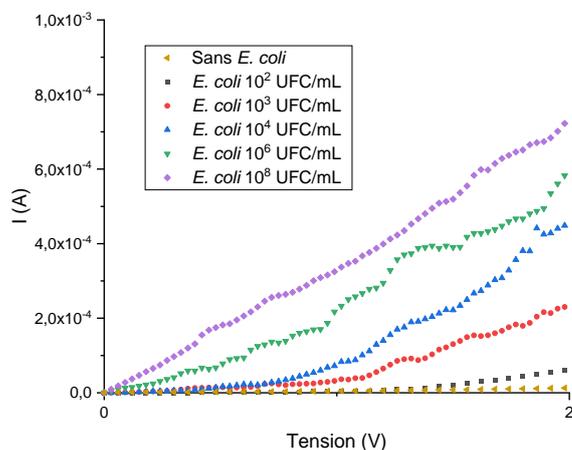


Figure 85 : Variation du courant sur le même capteur en fonction de différentes concentrations bactériennes variant de  $10^2$  UFC/mL à  $10^8$  UFC/mL

On observe que la valeur du courant augmente avec l'augmentation des concentrations bactériennes variant de  $10^2$  UFC/mL à  $10^8$  UFC/mL (Figure 85).

Une autre représentation montre la variation du courant par rapport au témoin sur l'histogramme de la figure 86. Cet histogramme indiquant la valeur moyenne de la réponse électrique, donc *le delta I* des 14 capteurs testés avec une gamme de concentration entre  $10^2$ - $10^8$  UFC/mL et indique un niveau maximal de courant de  $3,16 \cdot 10^{-4}$  A pour la concentration  $10^8$  UFC/ mL.

Les variations de courant par rapport au témoin, (c'est à dire avec anticorps mais sans bactéries), *Delta I* induit par les bactéries augmente linéairement avec la concentration de bactéries. Le tracé de la figure 87 pour la gamme de  $10^2$ - $10^8$  UFC /mL, montre une droite avec un coefficient de régression de 0,995 pour une tension fixée à 1V. La sensibilité est donnée par la pente de la caractéristique du courant en fonction de la concentration bactérienne est estimée à  $83\mu\text{A}$  par décade de UFC/mL.

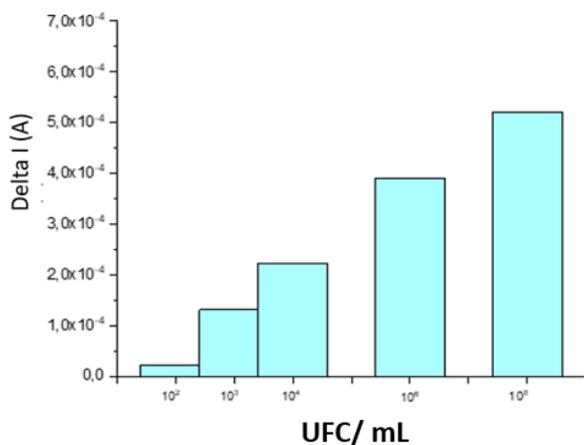


Figure 86: Histogramme indiquant le  $\Delta I$  (A) des 14 capteurs pour chaque concentration déposée à 1V.

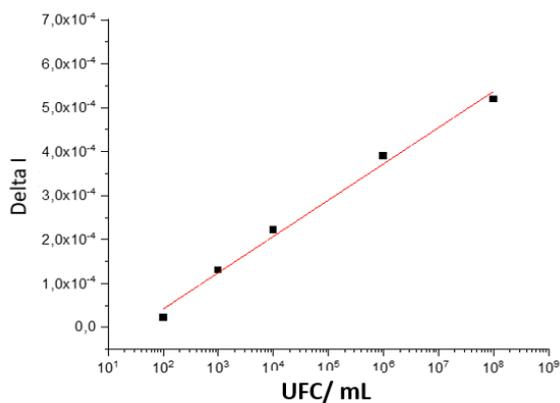


Figure 87: régression linéaire du  $\Delta I$  pour différentes concentrations bactériennes déposées sur le même capteur à une tension de polarisation de 1 V.

## VI. Détection de la bactérie *Staphylococcus aureus*

Dans cette partie, nous allons utiliser une autre espèce bactérienne *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), et étudier sa détection par mesures électriques en utilisant notre capteur à base de nanofils, en comparant là encore avec des observations par fluorescence. Dans un deuxième temps, une étude de la sensibilité et de la spécificité sera mise en œuvre en réalisant

des tests croisés (anticorps *anti-E. coli* LPS + *S. aureus*). La démarche suivie est identique à celle utilisée pour l'étude de la détection d'*E. coli*.

### VI.1 Détection électrique de *S. aureus*

Afin de valider le protocole de fonctionnalisation de la surface des nanofils, des anticorps anti-protéine A *S. aureus* spécifiques pour la détection de la bactérie *S. aureus* ont été fixés et 50  $\mu$ L d'une suspension bactérienne de  $10^8$  UFC/ml ont été déposés sur le capteur. Un rinçage a ensuite été effectué pour éliminer les résidus restant sur la surface, ainsi que les bactéries qui n'ont pas pu se fixer sur des anticorps. Trois capteurs fonctionnalisés ont été analysés : avec des anticorps seuls, avec des anticorps anti-*S. aureus* protéine A + *S. aureus*, et avec des *S. aureus* sans anticorps (les 3 cas sont schématisés figure 88), et les résultats électriques obtenus sont montrés figure 89.

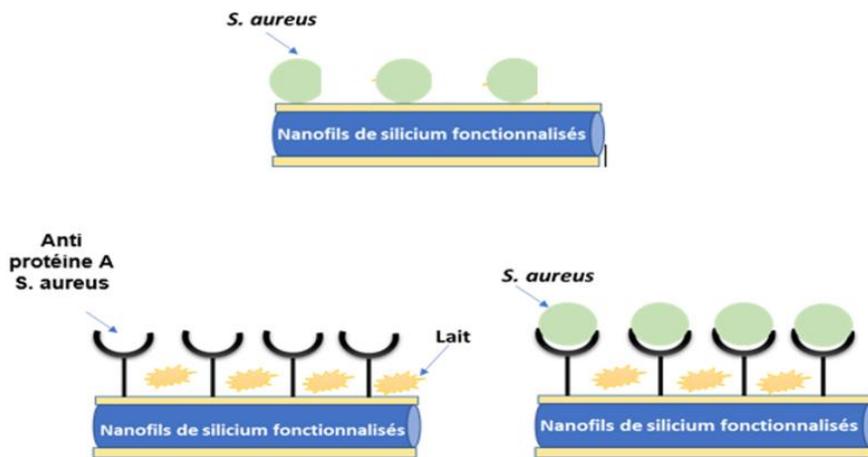


Figure 88 : état de la surface des nanofils de silicium après la fixation des anti protéines A *S. aureus* et la bactérie *S. aureus*

Les résultats indiqués par les courbes  $I(V)$  figure 89 nous montrent la réponse électrique du capteur avant et après la fixation de la bactérie *S. aureus* en fonction de la présence de l'*anti-S. aureus* protéine A. Les trois courbes, noire, bleu et rouge indiquent respectivement le niveau

du courant pour un capteur avec l'*anti- S. aureus protéine A*, l'*anti- S. aureus protéine A + S. aureus*, et *S. aureus seule*.

La courbe bleue (*S. aureus*) et la courbe noire (*anti- S. aureus Protéine A*) présentent une variation de courant identique, cela indique que le niveau de courant est resté stable sur le capteur avec et sans les bactéries *S. aureus*. On peut l'expliquer par l'absence des anticorps sur le capteur avec la bactérie *S. aureus* qui a permis au rinçage à l'eau distillée d'éliminer une majorité de bactéries. En effet, la forme de la bactérie *S. aureus* (coque) (figure 90) ne favorise pas un accrochage non spécifique entre les nanofils, contrairement à la bactérie *E. coli* avec sa forme bacille, qui peut se fixer à l'aide des flagelles sur sa paroi externe et est facilement piégée entre les nanofils de silicium. Enfin, la courbe rouge indique le niveau du courant sur un capteur avec l'*anti- S. aureus protéine A* et *S. aureus*, ces derniers créent des liaisons covalentes avec leurs anticorps, permettant ainsi un transfert de charges plus important sur la surface qui conduit à une augmentation de courant.

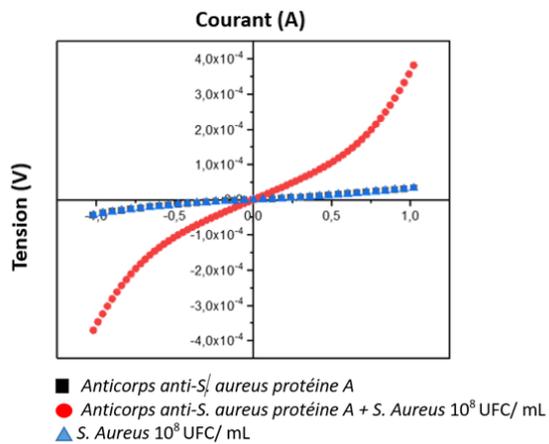


Figure 89 : a) variation du courant en fonction de la présence de l'*anti-S. aureus* protéine A, (courbe noir) *anti-S. aureus* protéine A, (courbe rouge) *anti-protéine A S. aureus + S. aureus* 10<sup>8</sup>UFC/mL, (courbe bleu) 10<sup>8</sup>UFC/mL.

Les substrats utilisés pour les mesures électriques ont été visualisés au MEB (figure 90), afin de valider la présence de *S. aureus* sur la surface des nanofils fonctionnalisés. Sur la figure 90, la présence de bactéries en forme de coques arrondies accrochées sur les nanofils de silicium, avec un diamètre d'environ 1,5  $\mu\text{m}$ , est détectée. Elles ont comme particularité de former des amas en forme de grappes (figure 90-b)

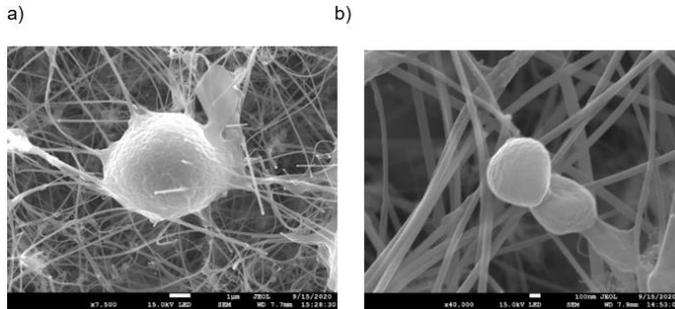


Figure 90: Image MEB de *S. aureus* accrochés sur des nanofils de silicium, fonctionnalisés a) forme de cocci des *S. aureus*, b) des amas en forme de grappe des *S. aureus*

## VI.2 Validation du protocole de fonctionnalisation et de détection par fluorescence

Les résultats obtenus par la fluorescence avec un grossissement X 20 (figure 91), sont par la suite comparés avec les résultats électriques. L'image (a) sombre indique l'état de la surface après la fixation des anticorps anti-*S. aureus* protéines A. Ce substrat servira comme un témoin (blanc) par la suite. Les images (b) et (c) présentent respectivement le taux de fixation des bactéries avec et sans la présence de l'anticorps *anti-S. aureus* protéine A. Les tests sont effectués avec une culture de *S. aureus* à la concentration de  $10^8$  UFC/mL.

Comme on pouvait s'y attendre, la densité de la fluorescence mesurée est associée au nombre de bactéries accrochées sur la plaque : elle est donc plus faible en absence d'anticorps. Le nombre de *S. aureus* présents sur la plaque (b) augmente de 170 à 998 sur  $5,4 \mu\text{m}^2$  (c). Les résultats trouvés confirment les résultats des mesures électriques (voir paragraphe suivant).

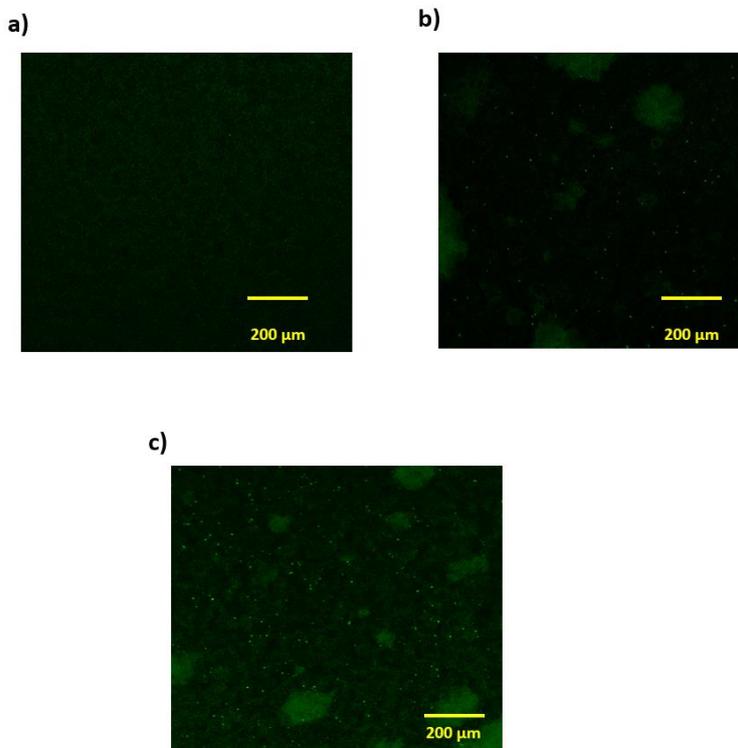


Figure 91 : résultats de la détection de *S. aureus* fluorescence a) avec les anticorps anti- *S. aureus* protéine A, b) en présence des bactéries sans anticorps anti- *S. aureus* protéine A, c) en présence de *S. aureus* et des anticorps anti- *S. aureus* protéine A. Grossissement X20.

### VI.3 Caractéristiques électriques en fonction de la concentration bactérienne de *S. aureus*

Dans ce paragraphe, la variation du courant dans les capteurs en fonction de la concentration bactérienne a été étudiée. Une étude de la fluorescence a ensuite été réalisée en parallèle et comparée à la mesure de la réponse électrique.

La gamme de concentrations utilisée se situe entre  $10^3$  et  $10^8$  UFC/mL, et les courbes  $I(V)$  reportées sur la figure 92-a indiquent un niveau du courant qui augmente avec la concentration bactérienne. La courbe noire (Anticorps anti- *S. aureus* protéine A) présente un niveau de

courant similaire à celui de la concentration bactérienne de  $10^4$  UFC/mL. Une augmentation significative de courant est constatée à partir de la concentration  $10^6$  UFC/mL. Plusieurs hypothèses sont émises : i) un rinçage trop puissant, ii) une faible concentration d'anticorps déposée sur la surface, donc un faible taux d'accrochage de bactéries sur les nanofils ou iii) le nombre de bactéries à une concentration inférieure à  $10^6$  UFC/ mL, ne conduit pas assez de courant.

Ce résultat signifie par ailleurs qu'une concentration en dessous de  $10^4$  UFC/mL ne serait pas détectable. Ce résultat serait à confirmer par une nouvelle série de tests.

Les résultats de la fluorescence, présentés sur la figure 93, indiquent le taux d'accrochage en fonction de la concentration bactérienne déposée ( $10^3$ - $10^8$ ) avec : a) Anticorps *anti-S. aureus Protéine A* (témoin) b) Anticorps *anti-S. aureus Protéine A* + *S. aureus*  $10^3$  UFC/mL, c) Anticorps *anti-S. aureus Protéine A* + *S. aureus*  $10^6$  UFC/mL, d) Anticorps *anti-S. aureus Protéine A* + *S. aureus*  $10^8$  UFC/mL. Nous constatons une augmentation importante de l'intensité lumineuse à partir de la concentration  $10^6$  UFC/mL. L'histogramme (figure 92-b) donne le nombre de bactéries accrochées sur une surface de  $5,4 \mu\text{m}^2$  des 4 capteurs utilisés. La quantité de bactéries accrochées augmentait linéairement en allant de 189 ( $10^3$  UFC/ml) à 1100 ( $10^8$  UFC/mL).

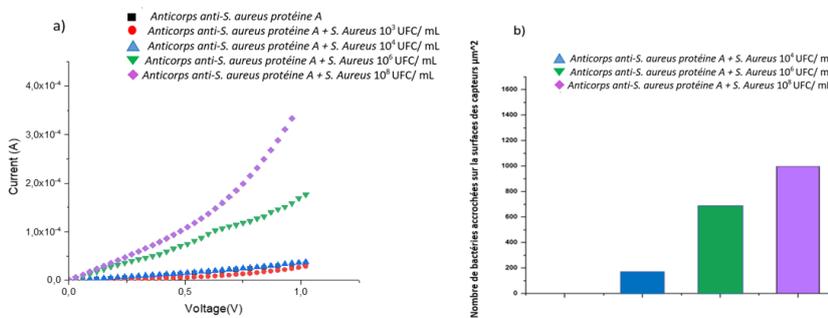


Figure-92: a) résultats de la caractérisation électrique en fonction des concentrations bactériennes de *S. aureus*, b) seuillages des images par un Fiji (Image J), nombre de *S. aureus* accrochés sur  $5,4 \mu\text{m}^2$

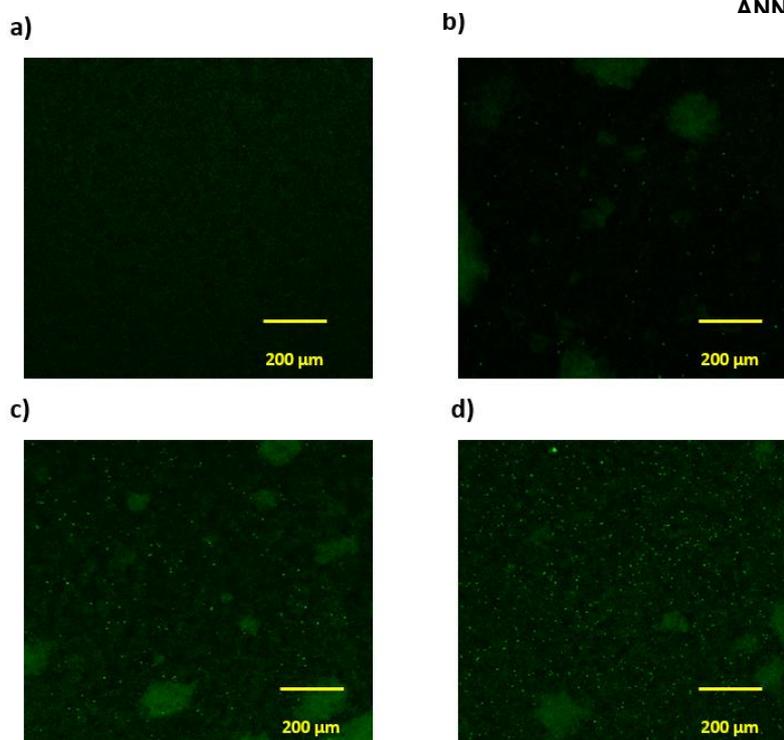


Figure 93 : résultats de la fluorescence a) Anticorps anti-*S. aureus* protéine A (témoin) b) Anticorps anti- *S. aureus* protéine A+ *S. aureus* 10<sup>3</sup> UFC/ml, c) Anticorps anti- *S. aureus* protéine A + *S. aureus* 10<sup>6</sup> UFC/ml, d) Anticorps anti- *S. aureus* Protéine A + *S. aureus* 10<sup>8</sup> UFC/ml. Grossissement X20.

En conclusion les tests électriques et les images données par la fluorescence valident le protocole de fonctionnalisation. La présence de l'anticorps anti-*S. aureus* protéine A permet une meilleure sensibilité pour la détection des *S. aureus*.

#### VI.4 Etude de la spécificité de la détection en utilisation des anticorps *anti LPS E. coli* avec des bactéries *S. aureus*

Dans le but d'étudier la spécificité de notre système de détection, des tests croisés ont été réalisés. Les capteurs ont été fonctionnalisés avec l'anticorps anti-*E. coli* LPS et utilisés avec une concentration bactérienne de *S. aureus* (10<sup>8</sup> UFC/mL). Les substrats ont été fonctionnalisés de la même manière que ceux utilisés auparavant dans nos études. Ainsi des anticorps anti *LPS* (figure 94-a) ont été fixés sur la surface, une saturation des sites avec

l'agent bloquant entre les nanofils de silicium a été réalisée suivi d'un dépôt de *S. aureus* ( $10^8$  UFC/mL) (figure 94-b). Avant la réalisation des mesures électriques, la surface des capteurs est rincée afin d'éliminer les bactéries qui ne créent pas de liaison covalente avec l'anticorps.

La mesure électrique a été reproduite plusieurs fois, afin de vérifier la stabilité électrique, et les résultats des mesures sont indiqués par les courbes I(V) figure 95. Les courbes noire et rouge représentent respectivement la réponse électrique du capteur avec seulement l'anticorps *anti-E. coli* LPS et après le dépôt de *S. aureus* sur ces anticorps,. Les deux courbes I(V) sont superposées, et le niveau de courant est stable avant et après le dépôt de la bactérie *S. aureus*. Cela confirme la qualité du rinçage effectué, l'élimination totale des bactéries résiduelles, et le non piégeage des bactéries entre les nanofils, ce qui permet de montrer la spécificité de détection de ce système.

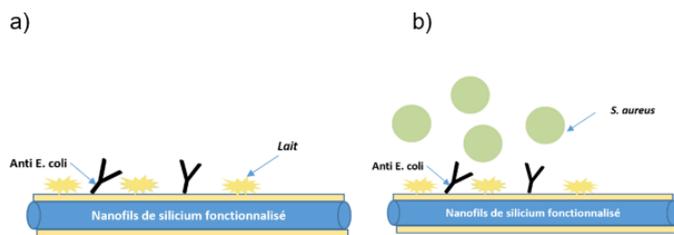


Figure 94 : état de la surface des nanofils sur les capteurs, a) Anticorps anti-*E. coli* LPS, b) Anticorps anti-*E. coli* LPS + *S. aureus*  $10^8$  UFC/mL.

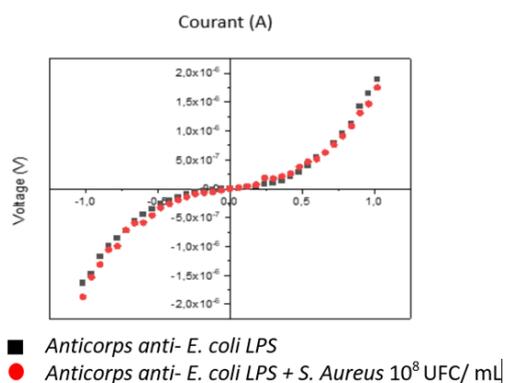


Figure 95: réponse électrique du capteur avec les anticorps anti-*E.coli* LPS avant et après le dépôt de *S. aureus*.

## VII. Discussion

Les capteurs développés dans cette étude contiennent un large nombre de nanofils, testés en présence de deux espèces bactériennes différentes (*E. coli* et *S. aureus*) et permettant une sensibilité accrue de la détection électrique de bactéries grâce aux dimensions nanométriques des nanofils.

Les réseaux de nanofils de silicium présentent deux avantages majeurs : ils ont une surface considérablement accrue par rapport aux couches minces (rapport surface/volume élevé) et leur conductance est très sensible à leurs propriétés de surface. Plusieurs mécanismes de conduction sont impliqués dans la conduction dans les nanofils de silicium et la compréhension de ces mécanismes peut être expliquée par plusieurs hypothèses: (i) par des chemins conducteurs entre les nanofils et les bactéries, (ii) en considérant que les charges négatives des bactéries ont un effet de grille biochimique permettant une modification de la conduction par effet champ, ou (iii) par transfert de charges dans le nanofil. La conduction de surface transférée par l'or au niveau des parois latérales des nanofils et la conduction à travers les nanofils de silicium a été évoquée.

D'autre part, avec la présence de bactéries immobilisées sur les nanofils, la conduction pourrait être dominée par l'interaction entre les nanofils et la membrane des *E. coli*. En effet, les membranes externes des bactéries Gram négatif sont principalement composées de

molécules de LPS. Chaque molécule de LPS possède de multiples charges négatives provenant des groupes phosphate et acide du lipide A et du noyau-polysaccharides. Sachant que chaque bactérie porte des charges négatives, la densité surfacique des charges supplémentaires immobilisées à la surface des nanofils après la fixation des bactéries est alors directement liée au courant mesuré dans le capteur. Susarrey-Arce *et al.* [120] ont étudié l'interaction d'*E. coli* avec les surfaces fonctionnalisées de nanofils de silicium. Ils expliquent que pour les *E. coli* Gram négatif, de nombreuses adhésines présentes aux niveaux des pili ou les fimbriae (qui sont des appendices en forme de cheveux sur les cellules bactériennes) permettent aux cellules bactériennes uniques de se fixer aux surfaces. Ces structures extracellulaires et la forme en bâtonnet des cellules d'*E. coli* peuvent générer de multiples points de contact avec les réseaux irréguliers de nanofils de silicium. Certains auteurs ont suggéré que le transport extracellulaire d'électrons pouvait être facilité par des filaments conducteurs extracellulaires, appelés nanofils bactériens. Reguera *et al* [128] ont indiqué que les pili pourraient servir de nanofils biologiques, transférant les électrons de la surface cellulaire à d'autres surfaces. El Nagggar *et al* [85]. ont démontré un transport électrique le long des nanofils bactériens, pour le transport extracellulaire des électrons [85]. Ces hypothèses semblent être confirmées par l'image MEB d'*E. coli* montrant des nanofils biologiques (pili) connectant les nanofils de silicium. Ainsi, la présence des bactéries sur les nanofils et l'identification des composants de transfert d'électrons nécessaires à la conductivité électrique constitueraient des avancées importantes vers la compréhension des mécanismes impliqués dans le transfert d'électrons. Concernant la détection par mesures électriques des bactéries *S. aureus* à Gram positif, la conduction pourrait être dominée par l'interaction entre les nanofils et la membrane des *S. aureus*. L'apport de ces charges issues des groupes catalases de la paroi extérieure de *S. aureus* à la surface des nanofils, joue le rôle de grille chimique comme dans le cas des bactéries *E. coli*.

## VIII. Conclusion

Au cours de la première partie de ce chapitre, nous avons étudié la détection électrique des bactéries *E. coli*, grâce à des capteurs constitués de résistances électriques à base de réseaux de nanofils de silicium, fonctionnalisées avec des anticorps. Le capteur présente un très grand nombre de nanofils de silicium entrelacés et fonctionnalisés pour faciliter la fixation de biomolécules, permettant une sensibilité accrue pour la détection de bactéries grâce aux dimensions nanométriques des nanofils et à leur rapport surface/volume élevé.

## ANNÉE 2022

Les analyses par fluorescence couplées aux observations par microscopie électronique à balayage ont permis de montrer la validation de la fonctionnalisation chimique, ainsi que l'intérêt et l'importance des anticorps dans la sensibilité et la spécificité de la détection bactérienne. Les mesures du courant à travers les résistances ont permis de mettre en évidence une détection linéaire de concentrations bactériennes dans la gamme  $10^3$ - $10^8$  UFC/mL avec une sensibilité élevée de  $83\mu\text{A}$  par décade d'UFC/mL.

D'autre part, nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie, à la détection électrique des *S. aureus*. Comme pour l'étude de la détection électrique d'*E. coli*, les résultats ont montré l'efficacité de l'anticorps anti-protéine A pour la fixation de *S. aureus* à la surface des nanofils, confirmée par les analyses par fluorescence et les observations au microscope électronique à balayage, avec une détection sur une gamme de concentrations  $10^4$  -  $10^8$  UFC/mL. La détection des bactéries Gram positif a été effectuée avec le même protocole que la détection de celles à Gram négatif, et les résultats obtenus indiquent une variation linéaire démontrée en fonction de la concentration bactérienne. Par ailleurs, la détection spécifique d'*E. coli* a été mise en évidence en démontrant l'inefficacité de la détection de *S. aureus* ne pouvant se fixer sur des anticorps anti- *E. coli* LPS.

## Conclusion générale et perspectives

**ANNÉE 2022**

L'objectif de ce travail était la détection électrique de la bactérie *E. coli* dans un milieu liquide. Un état de l'art à partir d'une littérature fournie, mais provenant d'un nombre relativement restreint d'auteurs, a permis de mettre en avant l'intérêt de nano-objets pour la détection électriques de bactéries. Nous avons émis l'idée d'évaluer les performances de la résistance électrique à base de nanofils de silicium utilisés comme capteurs. La modification de la surface des nanofils par un procédé de fonctionnalisation a permis la fixation de molécules d'anticorps spécifiques, et la reconnaissance anticorps-bactéries. L'efficacité de la modification de surface ainsi que cette reconnaissance a permis d'élaborer des biocapteurs pour détecter et quantifier les *E. coli*.

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous étions fixés deux objectifs : d'une part la réalisation de ces dispositifs à base de nanofils de silicium obtenus par la méthode VLS et d'autre part, la démonstration de leur utilisation en tant que capteurs biologiques.

L'enjeu de la fabrication des biocapteurs utilisés durant ces travaux a été dans un premier temps de proposer un nouveau design de la structure de dispositif avec pour objectif d'optimiser la détection en augmentant le nombre de peignes interdigités et en diminuant l'espacement entre ces derniers.

Afin de valider la fixation des *E. coli* sur les capteurs, des expériences par microscopie à fluorescence ont été réalisées en utilisant des bactéries GFP permettant de quantifier les bactéries sur la surface des capteurs. En parallèle, des mesures électriques ont permis de mesurer la variation du courant en fonction de la concentration bactérienne.

Les analyses par fluorescence ont permis de mettre en évidence la fixation des bactéries *E. coli* à la surface des nanofils fonctionnalisés, la validation du protocole de fonctionnalisation et de greffage des anticorps sur la surface des nanofils, ainsi que l'étude de la variation du taux d'accrochage des bactéries en fonction de la concentration déposée. Les mesures électriques ont permis d'étudier la variation du courant en fonction de plusieurs paramètres, comme l'influence de la présence des anticorps sur les nanofils ou la concentration bactérienne déposée.

Nous avons montré la possibilité de détecter des bactéries avec une spécificité pour l'*E. coli* sur une gamme de détection linéaire notable ( $10^2 - 10^8$  UFC/mL) avec une sensibilité estimée à  $83\mu\text{A/UFC}$ .

## ANNÉE 2022

Les résultats obtenus ont démontré la faisabilité, à partir des techniques conventionnelles de la microélectronique, des capteurs à base de nanofils de silicium à forts potentiels pour la détection d'*E. coli*. Ces résultats permettent d'envisager la réalisation de capteurs électroniques intégrés pour une détection en temps réel *in-situ* d'*E. coli*

En conclusion, l'objet de ce travail était de démontrer la faisabilité de la détection bactérienne par mesures électriques, avec une bonne sensibilité et spécificité. Cette méthode de détection électrique a un grand potentiel pour des applications futures pour la détection bactérienne en temps réel avec un capteur miniaturisable et à faible coût, compatible avec l'intégration dans une plateforme électronique CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor). En termes de limites, on peut toutefois noter la complexité de fabrication du capteur avec ses nombreuses étapes technologiques. Il faut également tenir compte du coût non négligeable des anticorps. De plus, le coût d'utilisation du capteur au regard d'autres systèmes de détection existants reste à évaluer, notamment en ce qui concerne l'utilisation des anticorps et la possibilité de réemploi des capteurs.

Ce travail de thèse, avec lequel l'activité "détection biologique" a démarré au laboratoire, constitue une première étape vers un système de détection biologique ultra-sensible et ouvre des perspectives nombreuses. Il est important de noter que le développement d'un tel capteur, comme celui d'un biocapteur en général, demande la maîtrise d'un nombre important de paramètres faisant appel à différents domaines scientifiques, exigeant une collaboration soutenue entre électroniciens, électrochimistes et biologistes.

Le fonctionnement des résistances en mode capteur ayant été validé par une mesure de courant, la suite naturelle de ce travail de thèse couvre différents aspects :

- étudier la détection avec une concentration d'anticorps optimisée (compte-tenu des coûts des anticorps) en fonction de la concentration bactérienne déposée,
- étudier la possibilité de détecter des *E. coli* dans des solutions contenant un mélange de différentes espèces bactériennes,
- étudier la réutilisation et le recyclage des capteurs.

Par ailleurs, des efforts sur la reproductibilité restent à fournir notamment pour une intégration de ces capteurs à un système sur puce, afin d'assurer leur portabilité.

**ANNÉE 2022**

## Références

- [1] S. E. Majowicz *et al.*, « Global incidence of human Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis », *Foodborne Pathog. Dis.*, vol. 11, n° 6, p. 447-455, 2014.
- [2] J. H. Choi, H. S. Seo, S. Y. Lim, et K. Park, « Cutaneous immune defenses against *Staphylococcus aureus* infections », *J. Lifestyle Med.*, vol. 4, n° 1, p. 39, 2014.
- [3] D. Oliveira, A. Borges, et M. Simões, « *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases », *Toxins*, vol. 10, n° 6, p. 252, 2018.
- [4] J. S. Skyler, « Continuous glucose monitoring: an overview of its development », *Diabetes Technol. Ther.*, vol. 11, n° S1, p. S-5, 2009.
- [5] L. C. Clark Jr et C. Lyons, « Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 102, n° 1, p. 29-45, 1962.
- [6] G. G. Guilbault et J. G. Montalvo Jr, « Urea-specific enzyme electrode », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 91, n° 8, p. 2164-2165, 1969.
- [7] A. KERMAD, « Étude et réalisation d'un biocapteur à base de silicium structuré (Électro) chimiquement », PhD Thesis, Université de Tlemcen-Abou Bekr Belkaid, 2014.
- [8] A. Turner, I. Karube, et G. S. Wilson, *Biosensors: fundamentals and applications*. Oxford university press, 1987.
- [9] B. Principles, « Applications (Blum, LJ, Coulet, PR, Eds.) ». Marcel Dekker: New York, 1991.
- [10] C. Tran-Minh, « Les biocapteurs », *Principes Constr. Appl. Ed. Masson Paris*, p. 1-158, 1991.
- [11] Y.-G. Li, Y.-X. Zhou, J.-L. Feng, Z.-H. Jiang, et L.-R. Ma, « Immobilization of enzyme on screen-printed electrode by exposure to glutaraldehyde vapour for the construction of amperometric acetylcholinesterase electrodes », *Anal. Chim. Acta*, vol. 382, n° 3, p. 277-282, 1999.
- [12] H. H. Weetall, « Immobilized enzymes. Analytical applications », *Anal. Chem.*, vol. 46, n° 7, p. 602A - 615a, 1974.
- [13] B. Biswas, P. Basu, et M. Pal, « Gram staining and its molecular mechanism », in *International review of cytology*, vol. 29, Elsevier, 1970, p. 1-27.
- [14] J. Humbert, M. Jouve, C. Le Bouguéneq, et P. Gounon, « Electron microscopic improvement in the study of diarrheagenic *Escherichia coli* », *Microsc. Res. Tech.*, vol. 49, n° 4, p. 383-393, 2000.
- [15] H. Sträuber et S. Müller, « Viability states of bacteria—specific mechanisms of selected probes », *Cytometry A*, vol. 77, n° 7, p. 623-634, 2010.
- [16] C. L. Marolda, P. Lahiry, E. Vinés, S. Saldías, et M. A. Valvano, « Micromethods for the characterization of lipid A-core and O-antigen lipopolysaccharide », in *Glycobiology Protocols*, Springer, 2006, p. 237-252.
- [17] A. C. Paletta, V. S. Castro, et C. A. Conte-Junior, « Shiga Toxin-Producing and Enteroaggregative *Escherichia coli* in Animal, Foods, and Humans: Pathogenicity Mechanisms, Detection Methods, and Epidemiology », *Curr. Microbiol.*, p. 1-9, 2019.
- [18] M. Jouve, M.-I. Garcia, P. Courcoux, A. Labigne, P. Gounon, et C. Le Bouguéneq, « Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the *afa-3* gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. », *Infect. Immun.*, vol. 65, n° 10, p. 4082-4089, 1997.
- [19] G. Zhou *et al.*, « ASCA, ANCA, ALCA and many more: are they useful in the diagnosis of inflammatory bowel disease? », *Dig. Dis.*, vol. 34, n° 1-2, p. 90-97, 2016.

- [20] E. De Boer et A. Heuvelink, « Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 88, n° S1, p. 133S-143S, 2000.
- [21] H. Chart et C. Jenkins, « The serodiagnosis of infections caused by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* », *J. Appl. Microbiol.*, vol. 86, n° 5, p. 731-740, 1999.
- [22] W. M. Dunne Jr, H. Pouseele, S. Monecke, R. Ehricht, et A. van Belkum, « Epidemiology of transmissible diseases: array hybridization and next generation sequencing as universal nucleic acid-mediated typing tools », *Infect. Genet. Evol.*, vol. 63, p. 332-345, 2018.
- [23] N. Jahandeh, R. Ranjbar, P. Behzadi, et E. Behzadi, « Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes », *Cent. Eur. J. Urol.*, vol. 68, n° 4, p. 452, 2015.
- [24] I. M. Mackay, K. E. Arden, et A. Nitsche, « Real-time PCR in virology », *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, n° 6, p. 1292-1305, 2002, doi: 10.1093/nar/30.6.1292.
- [25] A. Salman, H. Carney, S. Bateson, et Z. Ali, « Shunting microfluidic PCR device for rapid bacterial detection », *Talanta*, vol. 207, p. 120303, 2020.
- [26] A. Ahmed, J. V. Rushworth, N. A. Hirst, et P. A. Millner, « Biosensors for whole-cell bacterial detection », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 27, n° 3, p. 631-646, 2014.
- [27] N. Gadsby *et al.*, « Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections », *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 21, n° 8, p. 788-e1, 2015.
- [28] G. S. Tansarli et K. C. Chapin, « Diagnostic test accuracy of the BioFire® FilmArray® meningitis/encephalitis panel: a systematic review and meta-analysis », *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 26, n° 3, p. 281-290, 2020.
- [29] Y. Song *et al.*, « Recent progress in microfluidics-based biosensing », *Anal. Chem.*, vol. 91, n° 1, p. 388-404, 2018.
- [30] S. M. Yoo et S. Y. Lee, « Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms », *Trends Biotechnol.*, vol. 34, n° 1, p. 7-25, 2016.
- [31] H. Chen, Q. Qiu, S. Sharif, S. Ying, Y. Wang, et Y. Ying, « Solution-phase synthesis of platinum nanoparticle-decorated metal-organic framework hybrid nanomaterials as biomimetic nanoenzymes for biosensing applications », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, n° 28, p. 24108-24115, 2018.
- [32] J. Ji, J. A. Schanzle, et M. B. Tabacco, « Real-time detection of bacterial contamination in dynamic aqueous environments using optical sensors », *Anal. Chem.*, vol. 76, n° 5, p. 1411-1418, 2004.
- [33] C.-C. You *et al.*, « Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer 'chemical nose' sensors », *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, n° 5, p. 318, 2007.
- [34] R. L. Phillips, O. R. Miranda, C.-C. You, V. M. Rotello, et U. H. Bunz, « Rapid and efficient identification of bacteria using gold-nanoparticle-poly (para-phenyleneethynylene) constructs », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 47, n° 14, p. 2590-2594, 2008.
- [35] J. G. Bruno, K. Francis, M. Ikanovic, P. Rao, S. Dwarakanath, et W. E. Rudzinski, « Reovirus detection using immunomagnetic-fluorescent nanoparticle sandwich assays », *J. Bionanoscience*, vol. 1, n° 2, p. 84-89, 2007.
- [36] A. Bajaj *et al.*, « Detection and differentiation of normal, cancerous, and metastatic cells using nanoparticle-polymer sensor arrays », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, n° 27, p. 10912-10916, 2009.
- [37] J. Gao, Y. Lai, C. Wu, et Y. Zhao, « Exploring and exploiting the synergy of non-covalent interactions on the surface of gold nanoparticles for fluorescent turn-on sensing of bacterial lipopolysaccharide », *Nanoscale*, vol. 5, n° 17, p. 8242-8248, 2013.

- [38] K. Zagorovsky et W. C. Chan, « A plasmonic DNAzyme strategy for point-of-care genetic detection of infectious pathogens », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, n° 11, p. 3168-3171, 2013.
- [39] Y.-C. Chang, C.-Y. Yang, R.-L. Sun, Y.-F. Cheng, W.-C. Kao, et P.-C. Yang, « Rapid single cell detection of Staphylococcus aureus by aptamer-conjugated gold nanoparticles », *Sci. Rep.*, vol. 3, n° 1, p. 1-7, 2013.
- [40] A. D. Taylor, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, et S. Jiang, « Comparison of E. coli O157: H7 preparation methods used for detection with surface plasmon resonance sensor », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 107, n° 1, p. 202-208, 2005.
- [41] S. Díaz-Amaya, L.-K. Lin, A. J. Deering, et L. A. Stanciu, « Aptamer-based SERS biosensor for whole cell analytical detection of E. coli O157: H7 », *Anal. Chim. Acta*, vol. 1081, p. 146-156, 2019.
- [42] J. Riu et B. Giussani, « Electrochemical biosensors for the detection of pathogenic bacteria in food », *TrAC Trends Anal. Chem.*, p. 115863, 2020.
- [43] M. Xu, R. Wang, et Y. Li, « Electrochemical biosensors for rapid detection of Escherichia coli O157: H7 », *Talanta*, vol. 162, p. 511-522, 2017.
- [44] N. Dhull *et al.*, « Label-free amperometric biosensor for Escherichia coli O157: H7 detection », *Appl. Surf. Sci.*, vol. 495, p. 143548, 2019.
- [45] S. Noh, Y. Choe, V. Tamilavan, M. H. Hyun, H. Y. Kang, et H. Yang, « Facile electrochemical detection of Escherichia coli using redox cycling of the product generated by the intracellular  $\beta$ -d-galactosidase », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 209, p. 951-956, 2015.
- [46] Y. Li *et al.*, « Amperometric immunosensor for the detection of Escherichia coli O157: H7 in food specimens », *Anal. Biochem.*, vol. 421, n° 1, p. 227-233, 2012.
- [47] G. A. Zelada-Guillén, S. V. Bhosale, J. Riu, et F. X. Rius, « Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples », *Anal. Chem.*, vol. 82, n° 22, p. 9254-9260, 2010.
- [48] Y. Tian *et al.*, « Label-Free Detection of E. coli O157: H7 DNA Using Light-Addressable Potentiometric Sensors with Highly Oriented ZnO Nanorod Arrays », *Sensors*, vol. 19, n° 24, p. 5473, 2019.
- [49] P. M. Shaibani *et al.*, « Portable nanofiber-light addressable potentiometric sensor for rapid Escherichia coli detection in orange juice », *ACS Sens.*, vol. 3, n° 4, p. 815-822, 2018.
- [50] B.-Y. Chang et S.-M. Park, « Electrochemical impedance spectroscopy », *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 3, p. 207-229, 2010.
- [51] K. Krupinska, P. Geladi, I. Vikholm-Lundin, et B. Lindholm-Sethson, « Detection of low levels of Escherichia coli by electrochemical impedance spectroscopy and singular value decomposition », *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 163, p. 49-54, 2017.
- [52] P. Geng *et al.*, « Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of Escherichia coli using electrochemical impedance spectroscopy », *Electrochimica Acta*, vol. 53, n° 14, p. 4663-4668, 2008.
- [53] J. L. de Miranda, M. D. Oliveira, I. S. Oliveira, I. A. Frias, O. L. Franco, et C. A. Andrade, « A simple nanostructured biosensor based on clavanin A antimicrobial peptide for gram-negative bacteria detection », *Biochem. Eng. J.*, vol. 124, p. 108-114, 2017.
- [54] M. Auffan, J. Rose, J.-Y. Bottero, G. V. Lowry, J.-P. Jolivet, et M. R. Wiesner, « Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective », *Nat. Nanotechnol.*, vol. 4, n° 10, p. 634-641, 2009.
- [55] Y. Zou, J. Liang, Z. She, et H.-B. Kraatz, « Gold nanoparticles-based multifunctional nanoconjugates for highly sensitive and enzyme-free detection of E. coli K12 », *Talanta*, vol. 193, p. 15-22, 2019.
- [56] J. Wang, « Nanomaterial-based amplified transduction of biomolecular interactions », *small*, vol. 1, n° 11, p. 1036-1043, 2005.

- [57] X. Dong *et al.*, « CdS quantum dots/Au nanoparticles/ZnO nanowire array for self-powered photoelectrochemical detection of Escherichia coli O157: H7 », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 149, p. 111843, 2020.
- [58] Y.-C. Chen, K.-H. Yang, C.-Y. Huang, Z.-J. Wu, et Y.-K. Hsu, « Overall photoelectrochemical water splitting at low applied potential over ZnO quantum dots/nanorods homojunction », *Chem. Eng. J.*, vol. 368, p. 746-753, 2019.
- [59] H.-A. Joung *et al.*, « High sensitivity detection of 16s rRNA using peptide nucleic acid probes and a surface plasmon resonance biosensor », *Anal. Chim. Acta*, vol. 630, n° 2, p. 168-173, 2008.
- [60] E. Özgür, A. A. Topçu, E. Yılmaz, et A. Denizli, « Surface plasmon resonance based biomimetic sensor for urinary tract infections », *Talanta*, vol. 212, p. 120778, 2020.
- [61] X. Michalel *et al.*, « Quantum Dots for Live Cells », *Vivo Imaging Diagn.*, p. 538-544.
- [62] S. Ahmadian-Fard-Fini, M. Salavati-Niasari, et D. Ghanbari, « Hydrothermal green synthesis of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-carbon dots by lemon and grape fruit extracts and as a photoluminescence sensor for detecting of E. coli bacteria », *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 203, p. 481-493, 2018.
- [63] R. Edgar *et al.*, « High-sensitivity bacterial detection using biotin-tagged phage and quantum-dot nanocomplexes », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, n° 13, p. 4841-4845, 2006.
- [64] S. J. Mechery, X. J. Zhao, L. Wang, L. R. Hilliard, A. Munteanu, et W. Tan, « Using bioconjugated nanoparticles to monitor E. coli in a flow channel », *Chem. Asian J.*, vol. 1, n° 3, p. 384-390, 2006.
- [65] R. Maalouf, W. M. Hassen, C. Fournier-Wirth, J. Coste, et N. Jaffrezic-Renault, « Comparison of two innovatives approaches for bacterial detection: paramagnetic nanoparticles and self-assembled multilayer processes », *Microchim. Acta*, vol. 163, n° 3, p. 157-161, 2008.
- [66] L. Wang, W. Zhao, M. B. O'Donoghue, et W. Tan, « Fluorescent nanoparticles for multiplexed bacteria monitoring », *Bioconjug. Chem.*, vol. 18, n° 2, p. 297-301, 2007.
- [67] S. Li *et al.*, « Electrogenenerated chemiluminescence on smartphone with graphene quantum dots nanocomposites for Escherichia Coli detection », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 297, p. 126811, 2019.
- [68] S. Wang *et al.*, « A homogeneous magnetic bead-based impedance immunosensor for highly sensitive detection of Escherichia coli O157: H7 », *Biochem. Eng. J.*, vol. 156, p. 107513, 2020.
- [69] S.-M. You *et al.*, « Gold nanoparticle-coated starch magnetic beads for the separation, concentration, and SERS-based detection of E. coli O157: H7 », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, n° 16, p. 18292-18300, 2020.
- [70] X. Hu *et al.*, « Green one-step synthesis of carbon quantum dots from orange peel for fluorescent detection of Escherichia coli in milk », *Food Chem.*, vol. 339, p. 127775, 2021.
- [71] H. Li *et al.*, « Designing an aptamer based magnetic and upconversion nanoparticles conjugated fluorescence sensor for screening Escherichia coli in food », *Food Control*, vol. 107, p. 106761, 2020.
- [72] X. Mao, L. Yang, X.-L. Su, et Y. Li, « A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157: H7 », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, n° 7, p. 1178-1185, 2006.
- [73] J.-Z. Tsai, C.-J. Chen, D.-T. Shie, et J.-T. Liu, « Resonant efficiency improvement design of piezoelectric biosensor for bacteria gravimetric sensing », *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, n° 6, p. 3597-3604, 2014.
- [74] C. A. S. Andrade *et al.*, « Nanostructured sensor based on carbon nanotubes and clavamin A for bacterial detection », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 135, p. 833-839, nov. 2015, doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.037.

- [75] H.-M. So *et al.*, « Detection and titer estimation of Escherichia coli using aptamer-functionalized single-walled carbon-nanotube field-effect transistors », *Small*, vol. 4, n° 2, p. 197-201, 2008.
- [76] X. Zhang, D. Wang, D. Yang, S. Li, et Z. Shen, « Electronic Detection of Escherichia coli O157\`HH7 Using Single-Walled Carbon Nanotubes Field-Effect Transistor Biosensor », *Rapid Determ. Sex. Transm. Infect. Real-Time Polym. Chain React. Using Microchip Anal.*, p. 94, 2012.
- [77] Y. Huang, X. Dong, Y. Liu, L.-J. Li, et P. Chen, « Graphene-based biosensors for detection of bacteria and their metabolic activities », p. 5, 2011.
- [78] B. Thakur *et al.*, « Rapid detection of single E. coli bacteria using a graphene-based field-effect transistor device », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 110, p. 16-22, 2018.
- [79] Y. Chen, Z. P. Michael, G. P. Kotchey, Y. Zhao, et A. Star, « Electronic Detection of Bacteria Using Holey Reduced Graphene Oxide », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, n° 6, p. 3805-3810, mars 2014, doi: 10.1021/am500364f.
- [80] Z. Fan, R. Kanchanapally, et P. C. Ray, « Hybrid graphene oxide based ultrasensitive SERS probe for label-free biosensing », *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 4, n° 21, p. 3813-3818, 2013.
- [81] H. Kaur, M. Shorie, M. Sharma, A. K. Ganguli, et P. Sabherwal, « Bridged Rebar Graphene functionalized aptasensor for pathogenic E. coli O78: K80: H11 detection », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 98, p. 486-493, 2017.
- [82] B. Le Borgne *et al.*, « Bacteria electrical detection using 3D silicon nanowires based resistor », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 273, p. 1794-1799, 2018.
- [83] H. Wang, L. Wang, P. Zhang, L. Yuan, Q. Yu, et H. Chen, « High antibacterial efficiency of pDMAEMA modified silicon nanowire arrays », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 83, n° 2, p. 355-359, 2011.
- [84] L. Wang, Q. Wei, C. Wu, Z. Hu, J. Ji, et P. Wang, « The Escherichia coli O157: H7 DNA detection on a gold nanoparticle-enhanced piezoelectric biosensor », *Chin. Sci. Bull.*, vol. 53, n° 8, p. 1175-1184, 2008.
- [85] M. Y. El-Naggar *et al.*, « Electrical transport along bacterial nanowires from Shewanella oneidensis MR-1 », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, n° 42, p. 18127-18131, 2010.
- [86] E. Givargizov et others, « Morphology of silicon whiskers grown by the VLS-technique », *J. Cryst. Growth*, vol. 9, p. 326-329, 1971.
- [87] G. Wenga, « Mise en oeuvre d'un capteur chimique et biologique à base de nanofils de silicium », PhD Thesis, Université de Rennes 1, 2013.
- [88] L. Yu, M. Oudwan, O. Moustapha, F. Fortuna, et P. Roca i Cabarrocas, « Guided growth of in-plane silicon nanowires », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 95, n° 11, p. 113106, 2009.
- [89] L. Yu et P. R. i Cabarrocas, « Growth mechanism and dynamics of in-plane solid-liquid-solid silicon nanowires », *Phys. Rev. B*, vol. 81, n° 8, p. 085323, 2010.
- [90] T. Shimizu, T. Xie, J. Nishikawa, S. Shingubara, S. Senz, et U. Gösele, « Synthesis of vertical high-density epitaxial Si (100) nanowire arrays on a Si (100) substrate using an anodic aluminum oxide template », *Adv. Mater.*, vol. 19, n° 7, p. 917-920, 2007.
- [91] H.-C. Lin, M.-H. Lee, C.-J. Su, et S.-W. Shen, « Fabrication and characterization of nanowire transistors with solid-phase crystallized poly-Si channels », *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 53, n° 10, p. 2471-2477, 2006.
- [92] A. Tilke, R. Blick, H. Lorenz, J. Kotthaus, et D. Wharam, « Coulomb blockade in quasimetallic silicon-on-insulator nanowires », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 75, n° 23, p. 3704-3706, 1999.
- [93] F. Demami, L. Ni, R. Rogel, A. Salaun, et L. Pichon, « Silicon nanowires synthesis for chemical sensor applications », *Procedia Eng.*, vol. 5, p. 351-354, 2010.
- [94] F. Demami, « Synthèse de nanofils de silicium par la méthode des espaceurs », PhD Thesis, Université de Rennes 1, 2011.

- [95] S. Y. Chou, P. R. Krauss, et P. J. Renstrom, « Imprint lithography with 25-nanometer resolution », *Science*, vol. 272, n° 5258, p. 85-87, 1996.
- [96] A. A. Talin, L. L. Hunter, F. Léonard, et B. Rokad, « Large area, dense silicon nanowire array chemical sensors », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 89, n° 15, p. 153102, 2006.
- [97] S. Fanget *et al.*, « Gas sensors based on gravimetric detection—A review », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 160, n° 1, p. 804-821, 2011.
- [98] J. Goldberger, A. I. Hochbaum, R. Fan, et P. Yang, « Silicon vertically integrated nanowire field effect transistors », *Nano Lett.*, vol. 6, n° 5, p. 973-977, 2006.
- [99] V. Schmidt, H. Riel, S. Senz, S. Karg, W. Riess, et U. Gösele, « Realization of a silicon nanowire vertical surround-gate field-effect transistor », *small*, vol. 2, n° 1, p. 85-88, 2006.
- [100] L. Yu *et al.*, « Bismuth-catalyzed and doped silicon nanowires for one-pump-down fabrication of radial junction solar cells », *Nano Lett.*, vol. 12, n° 8, p. 4153-4158, 2012.
- [101] Y. Zhang, L.-W. Wang, et A. Mascarenhas, « “Quantum coaxial cables” for solar energy harvesting », *Nano Lett.*, vol. 7, n° 5, p. 1264-1269, 2007.
- [102] M. Lee, Y. Jeon, T. Moon, et S. Kim, « Top-down fabrication of fully CMOS-compatible silicon nanowire arrays and their integration into CMOS inverters on plastic », *ACS Nano*, vol. 5, n° 4, p. 2629-2636, 2011.
- [103] L. A. Bauer, N. S. Birenbaum, et G. J. Meyer, « Biological applications of high aspect ratio nanoparticles », *J. Mater. Chem.*, vol. 14, n° 4, p. 517-526, 2004.
- [104] G. Lehoucq, « Transistors à nanofils de silicium top-down. Application à la détection biologique. », PhD Thesis, Ecole Polytechnique X, 2010.
- [105] D. A. Routenberg, *Fabrication and characterization of silicon nanowire field-effect sensors*. Yale University, 2009.
- [106] A. Agarwal, K. Buddharaju, I. Lao, N. Singh, N. Balasubramanian, et D. Kwong, « Silicon nanowire sensor array using top-down CMOS technology », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 145, p. 207-213, 2008.
- [107] X. Zhou, J. Hu, C. Li, D. Ma, C. Lee, et S. Lee, « Silicon nanowires as chemical sensors », *Chem. Phys. Lett.*, vol. 369, n° 1-2, p. 220-224, 2003.
- [108] Y. Cui, Q. Wei, H. Park, et C. M. Lieber, « Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species », *science*, vol. 293, n° 5533, p. 1289-1292, 2001.
- [109] M. C. McAlpine, H. Ahmad, D. Wang, et J. R. Heath, « Highly ordered nanowire arrays on plastic substrates for ultrasensitive flexible chemical sensors », *Nat. Mater.*, vol. 6, n° 5, p. 379-384, 2007.
- [110] J. Wan *et al.*, « Silicon nanowire sensor for gas detection fabricated by nanoimprint on SU8/SiO<sub>2</sub>/PMMA trilayer », *Microelectron. Eng.*, vol. 86, n° 4-6, p. 1238-1242, 2009.
- [111] Y. L. Bunimovich, Y. S. Shin, W.-S. Yeo, M. Amori, G. Kwong, et J. R. Heath, « Quantitative real-time measurements of DNA hybridization with alkylated nonoxidized silicon nanowires in electrolyte solution », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, n° 50, p. 16323-16331, 2006.
- [112] S. Roy et Z. Gao, « Nanostructure-based electrical biosensors », *Nano Today*, vol. 4, n° 4, p. 318-334, 2009.
- [113] A. Girard, F. Geneste, N. Coulon, C. Cardinaud, et T. Mohammed-Brahim, « SiGe derivatization by spontaneous reduction of aryl diazonium salts », *Appl. Surf. Sci.*, vol. 282, p. 146-155, 2013.
- [114] G.-J. Zhang *et al.*, « Highly sensitive measurements of PNA-DNA hybridization using oxide-etched silicon nanowire biosensors », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, n° 11, p. 1701-1707, 2008.
- [115] G.-J. Zhang, J. H. Chua, R.-E. Chee, A. Agarwal, et S. M. Wong, « Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, n° 8, p. 2504-2508, 2009.

- [116] J. Hahm et C. M. Lieber, « Direct ultrasensitive electrical detection of DNA and DNA sequence variations using nanowire nanosensors », *Nano Lett.*, vol. 4, n° 1, p. 51-54, 2004.
- [117] C.-H. Lin, C.-H. Hung, C.-Y. Hsiao, H.-C. Lin, F.-H. Ko, et Y.-S. Yang, « Poly-silicon nanowire field-effect transistor for ultrasensitive and label-free detection of pathogenic avian influenza DNA », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, n° 10, p. 3019-3024, 2009.
- [118] H. E. Jeong, I. Kim, P. Karam, H.-J. Choi, et P. Yang, « Bacterial recognition of silicon nanowire arrays », *Nano Lett.*, vol. 13, n° 6, p. 2864-2869, 2013.
- [119] S. Kim, B. Keisham, et V. Berry, « Cellular nano-transistor: An electronic-interface between nanoscale semiconductors and biological cells », *Mater. Today Nano*, vol. 9, p. 100063, 2020.
- [120] A. Susarrey-Arce *et al.*, « Bacterial viability on chemically modified silicon nanowire arrays », *J. Mater. Chem. B*, vol. 4, n° 18, p. 3104-3112, 2016.
- [121] Y. Li, T. Wang, et J. Wu, « Capture and detection of urine bacteria using a microchannel silicon nanowire microfluidic chip coupled with MALDI-TOF MS », *Analyst*, vol. 146, n° 4, p. 1151-1156, 2021.
- [122] A.-C. Salaün, L. Pichon, et G. Wenga, « Polysilicon nanowires FET as highly-sensitive pH-sensor: modeling and measurements », *Procedia Eng.*, vol. 87, p. 911-914, 2014.
- [123] S. Dauphas *et al.*, « Stepwise functionalization of SiNx surfaces for covalent immobilization of antibodies », *Thin Solid Films*, vol. 517, n° 21, p. 6016-6022, 2009.
- [124] F. Carvalho, P. Paradiso, B. Saramago, A. M. Ferraria, A. M. B. do Rego, et P. Fernandes, « An integrated approach for the detailed characterization of an immobilized enzyme », *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 125, p. 64-74, 2016.
- [125] D. Briggs, « JC Rivière in: D. Briggs, MP Seah (Eds.): Practical Surface Analysis, Vol. 1 ». John Wiley and Sons, Chichester, 1990.
- [126] C. J. Powell, A. Jablonski, et others, « NIST Electron Inelastic-Mean-Free-Path Database 71, Version 1.0 », 1999.
- [127] L. Pichon, R. Rogel, et E. Jacques, « Electrical properties of phosphorus in situ doped Au-catalyst vapor liquid solid silicon nanowires », *J. Appl. Phys.*, vol. 118, n° 18, p. 185701, 2015.
- [128] G. Reguera, K. D. McCarthy, T. Mehta, J. S. Nicoll, M. T. Tuominen, et D. R. Lovley, « Extracellular electron transfer via microbial nanowires », *Nature*, vol. 435, n° 7045, p. 1098-1101, 2005.

**ANNÉE 2022**

## Liste des travaux

### Revue Internationale à Comité de Lecture

- **Y. Benserhir**, A-C. Salaün, F. Geneste, L. Pichon, A. Jolivet-Gougeon "Recent Developments for the Detection of *Escherichia coli* biosensors based on nano-objects – A review", IEEE Sensors, (2022). <https://ieeexplore.ieee.org/document/9738634>
- **Y. Benserhir**, A-C. Salaün, F. Geneste, Nolwenn Oliviero, L. Pichon and A. Jolivet-Gougeon, "Silicon Nanowires-based biosensors for the electrical detection of *Escherichia coli*", Biosensors and Bioelectronics (2022), *soumise*.

### Communications Internationales à Comité de Lecture

- **Y. Benserhir**, A-C. Salaün, F. Geneste, R. Rogel, L. Pichon and A. Jolivet-Gougeon « Silicon Nanowires based bio-sensors for the detection of bacteria », 4th annual workshop of the IEEE SENSORS France Chapter, 18-19 novembre 2021.
- **Y. Benserhir**, A-C. Salaün, S. Dutertre, O. Loreal, F. Geneste, L. Pichon and A. Jolivet-Gougeon « Development of electronic nano-sensors for the specific in situ detection of *Escherichia coli* », 30th ECCMID (European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases), Paris, 18-21 avril 2020.
- A.C. Salaün, **Y. Benserhir**, L. Pichon, F. Geneste, R. Rogel and A. Jolivet-Gougeon, "Silicon Nanowires based bio-sensors for the detection of bacteria", 3rd IEEE Sensors France workshop in Centrale Lille, November 26-27, 2020.
- **Y. Benserhir**, A-C. Salaün, S. Dutertre, O. Loreal, F. Geneste, L. Pichon and A. Jolivet-Gougeon « Development of electronic nano-sensors for the detection of *Escherichia coli* », 39ème RICAI (Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Paris, 16-17 décembre 2019.

### Communications Nationales

- **Y. Benserhir**, A.C. Salaün, N. Oliviero, F. Geneste, L. Pichon and A. Jolivet-Gougeon « Nanocapteurs à base de nanofils de silicium pour la détection de bactéries pathogènes », Journées Nationales des Nanofils Semiconducteurs, Lyon, 13-15 Novembre 2019
- **Y. Benserhir**, A-C Salaün, A. Jolivet-Gougeon, L. Pichon, F. Geneste, « Fabrication de nanocapteurs électroniques pour la détection de bactéries pathogènes », JNRDM, Montpellier, 3-5 Juin 2019. *Prix du meilleur poster*.