



HAL
open science

Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site

Corinne Dejours

► **To cite this version:**

Corinne Dejours. Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2005. tel-00401898

HAL Id: tel-00401898

<https://theses.hal.science/tel-00401898>

Submitted on 6 Jul 2009

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.

MEMOIRE

Préparé

**Au Laboratoire d'Etude de l'Intégration des Composants et Systèmes Electroniques
IXL - ENSEIRB - Université Bordeaux 1 - UMR CNRS 5818**

En vue de l'obtention du

Diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches de l'Université Bordeaux 1

SPECIALITE : Electronique

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGENIEUR

par **Corinne DEJOUS**

Maître de Conférences à l'Université Bordeaux 1

Contribution à l'Etude de Microcapteurs à Ondes Acoustiques visant la Biodétection Rapide sur Site

Soutenue le 8 décembre 2005 devant la commission d'examen :

Après avis des rapporteurs :

Monsieur Olivier BONNAUD
Monsieur Jean-Paul PARNEIX
Madame Claudine QUENTIN-NOURY

Professeur, Université Rennes I
Professeur, Université Bordeaux 1
Professeur, Université Victor Segalen Bordeaux 2

Devant la commission d'examen formée de :

Monsieur Bernard BENNETAU
Monsieur Olivier BONNAUD
Monsieur Javier GUTIERREZ MONREAL
Monsieur Mathieu JOANICOT
Monsieur Jean-Paul PARNEIX
Monsieur Jacques PISTRE
Madame Claudine QUENTIN-NOURY
Monsieur Dominique REBIERE
Monsieur André TOUBOUL, invité

Directeur de Recherche CNRS, Université Bordeaux 1
Professeur, Université Rennes I
Investigador Científico, CSIC IFA Madrid
Directeur Laboratoire du Futur - Rhodia
Professeur, Université Bordeaux 1
Professeur, ENSEIRB Bordeaux
Professeur, Université Victor Segalen Bordeaux 2
Professeur, Université Bordeaux 1
Professeur, Université Bordeaux 1

*À Christian
Merci pour ta compréhension, ta confiance...*

*À Loïc et Marie
Merci pour votre patience*

À mes parents, ma famille

À nos amis

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Jean-Louis AUCOUTURIER, pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant au sein de son Laboratoire en 1991, et qu'il m'a renouvelée au moment de mon recrutement comme Maître de Conférences en 1996.

Je souhaite associer à cette marque de reconnaissance, Monsieur le Professeur Jean-Paul DOM, dont l'image reste toujours pour moi vivante et attachée au Laboratoire.

Je remercie Monsieur le Professeur André TOUBOUL, Directeur du Laboratoire IXL, pour la confiance et le soutien qu'il accorde à nos travaux. Je le remercie également pour avoir accepté de participer à ce jury en tant que membre invité.

Je remercie particulièrement et très amicalement Monsieur le Professeur Jacques PISTRE, Professeur à l'ENSEIRB, pour son accueil au sein de l'équipe « Capteurs et Microsystèmes ». Je tiens à l'assurer de l'immense plaisir que j'ai de travailler dans ce cadre.

Que Madame Claudine QUENTIN-NOURY, Professeur à l'Université Bordeaux 2, soit assurée de ma profonde reconnaissance, pour s'intéresser à nos travaux et pour avoir accepté la charge de rapporteur, malgré ses nombreuses occupations. Sa participation, également en tant que membre du jury, et son implication dans le domaine des Sciences du Vivant, permettent d'assurer un examen plus complet de ces travaux très pluridisciplinaires.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur Olivier BONNAUD, Professeur à l'Université Rennes I, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner avec beaucoup d'intérêt ces travaux en qualité de rapporteur, puis en tant que membre du jury, malgré un emploi du temps très chargé. Son dynamisme, ses connaissances et son implication dans le domaine des microsystèmes en général, et des microcapteurs en particulier, constituent pour moi un encouragement à poursuivre dans cette voie.

Je tiens à remercier vivement Monsieur Jean-Paul PARNEIX, Professeur à l'Université Bordeaux 1, pour avoir pris le temps d'examiner ces travaux en tant que rapporteur parmi ses multiples activités. Je le remercie aussi pour avoir accepté de participer au jury.

Je remercie très chaleureusement Monsieur Javier GUTIERREZ MONREAL, Directeur de l'Instituto de Fisica Aplicada – Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC) de Madrid, pour le grand intérêt dont il fait preuve à l'égard de nos travaux, et pour l'immense gentillesse qu'il me témoigne en ayant accepté de participer au jury ce 8 décembre.

Mes plus vifs remerciements vont également à Monsieur Mathieu JOANICOT, Directeur du Laboratoire du Futur de Rhodia, pour sa présence comme membre du jury, et bien au-delà pour son engagement dans le cadre d'une collaboration passionnante et fructueuse sur le thème des microsystèmes résonants appliqués à la détection et la caractérisation pour une chimie à haut débit.

Je suis très sincèrement reconnaissante envers Monsieur Bernard BENNETAU, Directeur de Recherche au Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique (CNRS UMR 5802, Université Bordeaux 1), pour sa participation au jury. Je tiens à exprimer ici tout le plaisir et toute la satisfaction que j'éprouve à travailler en collaboration avec lui et son équipe depuis un peu plus d'un an sur les microdispositifs de biodétection.

J'ai aussi l'immense plaisir de remercier très chaleureusement et très amicalement Dominique REBIERE, Professeur à l'Université Bordeaux 1 – IUT Génie Electrique et Informatique Industrielle. Son enthousiasme et sa disponibilité communiquent une dynamique stimulante pour l'ensemble de l'équipe et constituent un élément important de sa réussite.

Ces travaux de recherche sont le fruit d'un véritable travail d'équipe, et je tiens à remercier ici très sincèrement tous les collègues, permanents et non permanents, chercheurs, ingénieurs, techniciens, ou personnel administratif, qui y ont contribué ou qui y contribuent quotidiennement, au sein du Laboratoire IXL, et également à l'extérieur. Je les remercie pour leur participation scientifique et technique, mais aussi pour la bonne entente et l'esprit d'entraide qui règnent au sein de l'équipe. C'est grâce à eux si nous pouvons être fiers aujourd'hui des résultats obtenus sur les microdispositifs à ondes acoustiques, en particulier ceux appliqués à la détection en milieu liquide et notamment la biodétection, qui me tiennent plus particulièrement à cœur.

De nombreuses autres personnes m'ont également aidée dans cette voie, qui, par des discussions fructueuses, qui, par leur bonne humeur et leur gentillesse, qui, par leur patience et leurs encouragements. Je leur adresse également un grand merci.

Bien évidemment, ces recherches n'auraient pu être menées sans des soutiens financiers importants. Aussi, je suis très reconnaissante à toutes celles et tous ceux qui ont cru et croiront dans le futur à l'intérêt de ces travaux, en impliquant dans nos projets leurs organismes respectifs, publics et privés.

Sommaire

Remerciements	5
Sommaire	7
Introduction	11
1. Problématique du biocapteur	13
1 Les enjeux	13
2 Structure du biocapteur et classification.....	14
3 Le biorécepteur.....	15
3.1 Catalyse.....	15
3.2 Affinité.....	16
3.3 Hybridation.....	17
3.4 Empreinte moléculaire.....	17
4 Immobilisation du biorécepteur.....	18
4.1 Adsorption.....	18
4.2 Piégeage.....	19
4.3 Réticulation.....	19
4.4 Liaison covalente.....	20
4.5 Assemblage moléculaire.....	20
4.6 Techniques de dépôts.....	21
5 Les techniques de transduction	22
5.1 Electrochimique	22
5.2 Optique ou opto-chimique	25
5.3 Electro-mécanique.....	31
6 Bilan et orientation de nos travaux	34
7 Références bibliographiques.....	34
2. De l'étude de la propagation de l'onde acoustique...	39
1 Les bases du dispositif de détection et de son étude.....	39
1.1 Le principe du détecteur	39
1.2 La sensibilité du dispositif à ondes acoustiques.....	40
1.3 Caractéristiques fréquentielles et effet d'une détection	41
1.4 Caractéristiques temporelles	43
1.5 Influence de la géométrie des électrodes	44
2 Les ondes étudiées.....	48
2.1 Les ondes de Rayleigh (SAW)	48

2.2	Les ondes SH-APM.....	49
2.3	Les ondes de Love (SH-SAW).....	52
3	Etude des dispositifs à ondes de Love.....	52
3.1	Modélisation.....	52
3.2	Résultats	54
4	Conclusion.....	57
5	Références bibliographiques.....	58
3.	...à la plate-forme de détection en milieu liquide	61
1	La plate-forme de test.....	61
1.1	La ligne à retard.....	61
1.2	La cellule de mesure	62
1.3	L'oscillateur.....	63
1.4	De l'acquisition du signal au système multicapteur portable	65
2	Caractérisations en milieu liquide.....	67
2.1	Corrélation des variations de vitesse et de fréquence.....	67
2.2	Influence du volume de liquide.....	68
2.3	Influence de la viscosité.....	68
2.4	Influence de la permittivité électrique.....	69
2.5	Influence de la conductivité électrique	70
3	Conclusion.....	70
4	Références bibliographiques.....	71
4.	Application à la biodétection	73
1	Le principe du biocapteur	73
2	Les espèces cibles : bactéries, virus, petites molécules.....	74
2.1	Bactéries.....	74
2.2	Virus et bactériophages	76
2.3	Autres espèces cibles et données récapitulatives.....	77
3	Le modèle biologique couche sensible - espèce cible.....	78
3.1	Interactions antigènes - anticorps.....	78
3.2	Choix de modèle biologique.....	79
4	La membrane biologique sensible.....	81
4.1	Greffage des anticorps sur la ligne à retard	81
4.2	Réponse temps réel du capteur au greffage des anticorps	83
4.3	Amélioration du greffage des anticorps	85
5	Détection du bactériophage.....	87
5.1	Immobilisation sur le capteur.....	87
5.2	Réponse temps réel du capteur.....	89
5.3	Analyse de la sensibilité du capteur	91
6	Détection de bactéries.....	93
6.1	Investigations préliminaires	94
6.2	Bilan et nouvelle approche immunologique.....	96
7	Conclusion et perspectives	98
8	Références bibliographiques.....	99

Conclusions et perspectives	105
Annexe : Eléments de biochimie.....	109
1 Principales catégories de liaisons entre biomolécules	109
2 Des acides aminés aux protéines	110
3 Références bibliographiques.....	112
Annexe : Techniques immunologiques	113
1 Le test immuno-enzymatique ELISA.....	113
1.1 Principe de la technique ELISA	113
1.2 Variantes de la technique ELISA	114
1.3 Modes et techniques de détection	115
1.4 Bilan	116
2 Titrage d'espèces vivantes	117
3 Production d'anticorps.....	118
3.1 Anticorps polyclonaux (Pab).....	118
3.2 Anticorps monoclonaux (Mab).....	118
4 Références bibliographiques.....	119
Annexe : Glossaire	121

Introduction

De nombreux domaines liés aux activités humaines et à l'Environnement nécessitent de développer de nouvelles technologies de détection ultra-sensible rapide dédiée. Un système miniaturisé répondant à ce besoin pourrait constituer une alternative efficace et économique par rapport à des équipements d'analyse classiques (ELISA PCR, QPCR, Western Blot, ...). En effet, ces techniques fournissent une information très fine et complète, mais elles présentent des contraintes importantes en termes de logistique, de coût et surtout de temps, typiquement plusieurs jours, entre le moment du prélèvement chez un patient ou sur un site et le moment du rendu du résultat par rapport à une éventuelle contamination. Des kits immunologiques existant pour certains agents infectieux permettent de réduire ce temps d'analyse, mais, à de rares exceptions près, plusieurs heures sont nécessaires.

Les dispositifs à ondes acoustiques pourraient être dans certains cas à la base d'un système efficace de détection précoce, avec des avantages notamment en termes de sensibilité, de rapidité, de possibilité d'intégration (du capteur mais également de l'ensemble de la chaîne de détection, de l'échantillonnage à la délivrance d'une information explicite sous forme électronique) et d'adaptabilité à un grand nombre d'applications, liée au caractère générique d'une transduction fondée notamment sur un effet de masse. Un système multicapteur associant des détecteurs sensibles et présentant une bonne sélectivité permettrait de réaliser des dosages en présence d'une matrice complexe, donc d'un échantillon ayant subi une préparation moins longue.

Mes actions de recherche concernent principalement l'étude de ces microcapteurs à ondes acoustiques et des systèmes les mettant en oeuvre. Elles ont lieu depuis le 1er novembre 1991 au sein du Laboratoire IXL, placé sous la direction de Messieurs les Professeurs J.-L. AUCOUTURIER, puis J. P. DOM, et A. TOUBOUL depuis mai 1998, dans le groupe « Capteurs, Microsystèmes » du thème « Microtechnologies », sous la responsabilité de Monsieur le Professeur J. PISTRE. Ainsi, avec notamment D. REBIERE, Professeur, et C. ZIMMERMANN, Maître de Conférences, nous nous attachons à développer des structures et des plate-formes destinées à la détection en milieux gazeux et liquides, avec des applications également à la caractérisation de matériaux, utile par exemple dans le domaine en pleine évolution de la chimie à haut débit. Ces recherches me conduisent à étudier la propagation des ondes élastiques, et les phénomènes d'interaction avec un milieu adjacent liquide ou gazeux, avec une attention particulière aux phénomènes d'interface à l'échelle nanométrique, en vue de la réalisation de microcapteurs chimiques ou biochimiques sensibles et fiables, intégrés autour d'une électronique de conditionnement et de traitement. Ces activités sont décrites dans le document de synthèse de mon activité scientifique.

Ce mémoire décrit plus spécifiquement les actions que j'ai entreprises depuis mon arrivée au laboratoire en vue de l'application de cette technologie à la détection en milieu liquide, et plus précisément à la biodétection rapide sur site, nouveau volet de recherche dont j'assume l'animation scientifique depuis 2000. Après quelques études très préliminaires sur ce sujet dans le cadre de mes travaux de thèse sur les dispositifs à ondes acoustiques de plaque

transverses horizontales, une première thèse visant à montrer la faisabilité d'un immunocapteur à ondes élastiques de Love a été soutenue fin 2002, et actuellement deux autres thèses sont directement reliées à ce volet de recherche. Ce sujet fortement pluridisciplinaire me conduit à collaborer étroitement avec des équipes de chimistes et de biologistes notamment, dans le cadre d'applications cibles en partenariat avec des industriels et des soutiens financiers locaux, régionaux, nationaux et européens. Une ouverture et un apprentissage permanents dans le cadre d'un réseau de compétences, des contacts et des échanges avec nos collègues universitaires en France et dans le monde, ainsi que des conditions matérielles favorables à chaque instant au niveau de chacun des partenaires, à la fois sur les plans humain et financier, constituent des ingrédients, difficiles à réunir, mais indispensables pour un bon déroulement des projets. Une telle synergie est déterminante, afin de progresser dans cette aventure passionnante que représente l'objectif de contribuer au progrès dans le domaine des biocapteurs et des microsystèmes de biodétection de manière générale.

Le chapitre 1 présente une problématique du biocapteur, couvrant les principaux choix technologiques proposés commercialement ou dans la littérature pour la réalisation d'un tel élément : le biorécepteur, son immobilisation, et la technique de transduction. Il se terminera par un bilan et une présentation de l'orientation de nos travaux par rapport à ces différents éléments.

Dans les chapitres 2 à 4 sont synthétisés nos travaux théoriques et expérimentaux contribuant à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site. Le chapitre 2 expose notre cheminement sur l'étude des transducteurs, d'un dispositif classique à ondes de Rayleigh aux dispositifs à ondes de Love. Le chapitre 3 concerne la plate-forme de test et l'application en milieu liquide. Enfin le chapitre 4 décrit nos travaux relatifs à l'application de ces dispositifs pour réaliser un biodétecteur, à partir d'une réaction immunologique de type antigène-anticorps.

Une dernière partie nous permet de conclure et de présenter notre programme de recherche dans ce domaine, programme intimement lié aux autres travaux de recherche sur les microcapteurs à ondes élastiques, mais aussi à microstructures mobiles, menés au sein de l'équipe et visant d'autres applications, comme la détection en milieu gazeux, ou la caractérisation de matériaux.

Ces travaux sur les biocapteurs mêlant intimement physique fondamentale et technologique, chimie et sciences du vivant, je terminerai cette introduction en citant C. Martelet* : nous devons rester humble dans notre quête scientifique, et reconnaître que nous essayons « simplement » de mimer la nature qui nous fournit « un grand nombre de biomolécules douées de fonctions de reconnaissance, souvent très spécifiques, qui notamment permettent la survie d'une espèce en assurant les fonctions vitales d'un organisme telles que métaboliser (grâce aux enzymes par exemple), se reproduire (grâce aux informations génétiques contenues dans l'ADN), traiter l'information et communiquer (grâce aux neurotransmetteurs, hormones et récepteurs), se protéger (grâce aux mécanismes de défense immunitaires) ».

* N. Jaffrezic, E. Souteyrand, C. Martelet, S. Cosnier, P. Labbe, C. Pijolat, *Les capteurs chimiques*, chapitre *Reconnaissance chimique et biochimique*, C. Martelet, p.2-15, édité par le Club MicroCapteurs Chimiques (CMC2), ISBN 2-907922-51-3.

1. Problématique du biocapteur

1 Les enjeux

Un biocapteur est un dispositif mettant en jeu des interactions biologiques couplées à un transducteur qui délivre, à partir de l'évènement de reconnaissance, un signal physique mesurable.

L'objectif du développement d'un biocapteur est d'aboutir à un dispositif de taille réduite (portatif) permettant de détecter, pour réaliser un dispositif d'alerte, voire de doser, directement l'analyte d'intérêt, de façon rapide, de préférence sans nécessiter l'ajout d'autres réactifs ou de pré-traitement de l'échantillon. Les enjeux sont d'importance, qui peut être vitale dans un cas comme la détection précoce de contaminations bactériologiques dans un réseau d'eau potable. Des contraintes économiques lourdes pourraient également être réduites grâce à un système d'alerte rapide fiable, par exemple pour les conchyliculteurs dans le cas du contrôle de l'absence d'algues toxiques, ou les activités liées au tourisme dans le cas du contrôle de la qualité des eaux de baignade des régions côtières ou dans les lacs.

De façon générale, les domaines d'applications, présentés de façon non exhaustive dans le tableau suivant, sont particulièrement nombreux.

Tableau 1. 1 : Domaines d'application des biocapteurs.

Médical/Clinique/Cosmétique	Test niveau de glucose (diabétiques), d'hormones Dispositifs implantables Télémétrie temps réel de fonctions du corps Diagnostic maladies infectieuses ou parasitaires
Vétérinaire/Agriculture/Alimentaire	Détection de contaminants (Salmonelles, listeria, <i>Escherichia coli</i> , pesticides, hormones de croissance...) Vérification d'ingrédients Vérification fraîcheur poisson, viande, fruits (nez / langues électroniques)
Environnement	Contrôle d'effluents Pesticides, métaux lourds, composés volatils organiques (COVs ou VOCs) affectent la pureté des eaux souterraines, des rivières et des lacs
Contrôle de process	Contrôle processus de fermentation
Défense/Sécurité	Détection précoce d'agents de guerre Détection de drogues illicites et d'explosifs

Les conditions et les caractéristiques nécessaires en termes de sensibilité, seuil de détection, éventuellement rapidité, liées aux éventuelles conséquences sur la santé humaine ou l'environnement, constituent souvent un objectif difficile à atteindre. Ainsi, concevoir et réaliser un détecteur capable de détecter des bactéries comme des salmonelles à une concentration de 1 ng.mL^{-1} , ou 2 000 bactéries *Escherichia coli* dans 100 mL d'eau (soit 0,6 ng de matière sèche dans 100 mL), seuil normalisé actuel indiquant un risque de contamination fécale des effluents, constitue déjà un défi en soi. Sur le terrain, le dispositif devra aussi, dans certains cas, distinguer entre bactéries mortes et vivantes, pourra avoir à le

faire sur de la matière (échantillon de viande par exemple) plutôt qu'en solution aqueuse. Le contexte de l'application est ainsi un critère important à prendre en compte, et la solution proposée pourra être très différente selon le cas.

Nous nous proposons dans ce chapitre de présenter les principales technologies de détection étudiées en vue de répondre à cet enjeu. Cela nous permettra, d'une part, de mieux situer et justifier nos propres travaux sur l'une de ces technologies, les dispositifs à ondes acoustiques, et d'autre part, de présenter des éléments, liés au biorécepteur de reconnaissance spécifique et à son immobilisation sur le transducteur, susceptibles d'être mis en jeu sur plusieurs technologies de transduction, dont celle que nous avons choisie.

Une revue sur les biocapteurs [COL97], bien que datant de 1997, est riche d'informations et bien documentée, quoique limitée aux dispositifs piézoélectriques et optiques. Elle a en partie servi de base à la rédaction de ce chapitre, et il sera utile de s'y référer pour tout complément d'information concernant les travaux de recherche réalisés dans ce domaine. Certains éléments sont aussi présentés sous des formes synthétiques et intéressantes dans les documents [SCH95] et [JAF00]. Enfin, un ouvrage très complet sur les méthodes d'analyse chimique, des fondements théoriques aux instruments commerciaux, sera utile pour une connaissance plus approfondie de ces méthodes d'analyse, dont certaines techniques de transduction sont applicables dans la réalisation de biocapteurs [ROU97]. D'autres références plus spécifiques seront ponctuellement citées au fur et à mesure.

2 Structure du biocapteur et classification

Le capteur est composé de trois éléments principaux :

- le récepteur, qui assure la reconnaissance de l'élément cible (signal d'entrée),
- le transducteur, qui assure la conversion de ce signal d'entrée (événement de reconnaissance moléculaire) en un signal utilisable, souvent électronique,
- le conditionneur, qui peut assurer des rôles d'amplification, acquisition et traitement du signal, pour le transformer en une information dans un format approprié pour l'utilisateur.

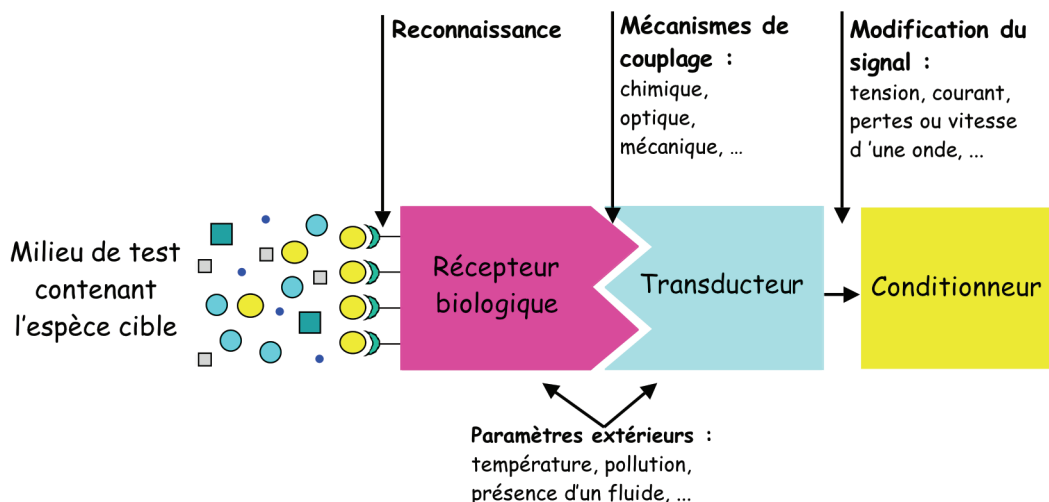


Figure 1. 1 : Structure d'un biocapteur.

Les capteurs en général, et les biocapteurs en particulier, sont souvent classés en fonction du phénomène physique qui gouverne la transduction.

Tableau 1. 2 : Les principes de transduction.

Electrochimique	Potentiométrie Ampérométrie Voltamétrie ISE/ISFET/CHEMFET
Electrique	Conductivité de surface ou de volume Capacité
Thermique	Calorimétrie « Enzyme thermistor » (chaleur de réaction ou absorption)
Magnétique	Paramagnétique
Optique	Fluorescence Luminescence Réflexion Absorption Ellipsométrie Ondes évanescentes
Electro-mécanique	Ondes élastiques (Dispositif piézoélectrique : QCM, SAW, SH-APM, Onde de Lamb, Onde de Love) Microstructure mobile

Les paragraphes suivants vont être consacrés à la présentation des principaux types de biorécepteurs et de techniques de transduction. Un paragraphe intermédiaire traitera des techniques d'immobilisation utilisées pour « relier » biorécepteur et transducteur. C'est cette étape importante qui va permettre, ou non, d'exploiter pleinement les potentialités de ces deux éléments. Nous concluons enfin sur l'orientation de nos travaux par rapport à ces différents éléments.

3 Le biorécepteur

Le récepteur est ainsi l'élément du biocapteur qui doit assurer la reconnaissance moléculaire du bio-analyte d'intérêt. Il doit présenter, par rapport à cette espèce cible, une bonne affinité, déterminant le premier niveau de sensibilité du capteur, et une bonne sélectivité (terme classique dans le domaine des capteurs), ou spécificité (terme plus fréquemment rencontré en biologie), ainsi qu'une réponse rapide. Le caractère réversible, recherchée pour la réalisation de microcapteurs chimiques, n'est généralement pas accessible dans le cas des biocapteurs, du fait des réactions mises en jeu. Il sera cependant possible et intéressant dans certains cas d'envisager la régénération du biorécepteur et ainsi du capteur.

Les biorécepteurs peuvent être classés selon trois types principaux, suivant le principe de base utilisé : la catalyse présentant un caractère irréversible (récepteurs enzymatiques), ou une affinité avec une espèce (réactions anticorps – antigènes, chémorécepteurs), ou encore un mécanisme d'hybridation (par exemple entre deux brins d'une molécule d'ADN). Récemment est apparue la technologie de l'empreinte moléculaire, pour mimer un biorécepteur à l'aide d'un matériau organique. Ces quatre catégories sont présentées maintenant.

3.1 Catalyse

Le principe de la catalyse correspond à l'accélération d'une réaction chimique sous l'effet d'une substance (catalyseur) qui intervient dans la réaction et qui est régénérée à la fin de celle-ci. Un biorécepteur peut ainsi être constitué d'un catalyseur [SCH87] ; les éléments les plus utilisés à cet effet sont les enzymes, qui représentent un bon compromis entre un fort niveau d'amplification du processus de bio-reconnaissance et une bonne spécificité. Ainsi, par rapport à des substances non biologiques, des enzymes sont 10^8 à 10^{13} fois plus actives et peuvent permettre de produire des centaines de milliers de molécules par seconde [MAD93].

Parmi les enzymes les plus utilisées, citons les oxydoréductases et les hydrolases, qui catalysent respectivement des réactions d'oxydoréduction et d'hydrolyse spécifiques.

A la place d'enzymes isolées et purifiées, qui nécessitent des étapes de purification et d'extraction coûteuses, ce sont parfois des co-enzymes ou même des cellules entières de plantes ou tissus animaux contenant des co-enzymes qui sont utilisés. Alors que les enzymes peuvent perdre leur activité durant l'étape d'immobilisation, les co-enzymes sont dans un environnement naturel, et ainsi plus stables. Ils induisent une perte de spécificité, mais permettent la détection d'espèces plus que d'un analyte précis.

3.2 Affinité

Par rapport aux récepteurs catalytiques, les récepteurs fonctionnant sur un principe d'affinité, comme les réactions antigènes - anticorps, sont encore plus spécifiques, mais la liaison est normalement irréversible. Il est toutefois possible de la détruire par un choc de pH (lavage acide), au prix d'une perte progressive de sensibilité et de spécificité du récepteur. De plus, alors que, dans le cas d'une activité catalytique, les sites récepteurs sont régénérés au cours de la réaction, ici un nombre élevé d'espèces cibles sature progressivement le capteur.

Aussi, ce type de récepteur est plutôt utilisé pour des détections « one-shot » de préférence à des applications de suivi, ou pour la détection de très faibles concentrations (10^{-6} à 10^{-9} M) par rapport à une gamme 10^{-3} à 10^{-6} M avec des récepteurs catalytiques [LOW90].

Dans cette classe de récepteurs, nous retrouvons principalement les immunorécepteurs (anticorps – antigènes). Un anticorps est une substance glycoprotéique (protéines associées à des complexes hydrocarbonés ou sucres), synthétisée par les cellules du système immunitaire en réaction à l'introduction d'un antigène (corps étranger), sur lequel elle se fixe spécifiquement pour en neutraliser l'effet toxique. Un antigène est une substance isolée ou portée par un micro-organisme (molécule, hormone, virus, bactérie), qui déclenche la production d'anticorps avec lesquels elle réagit spécifiquement (cf. figure suivante à droite). Ainsi, l'un peut jouer le rôle de biorécepteur spécifique de l'autre. La liaison mise en jeu n'est pas covalente, mais elle est forte du fait d'interactions moléculaires faibles mais nombreuses.

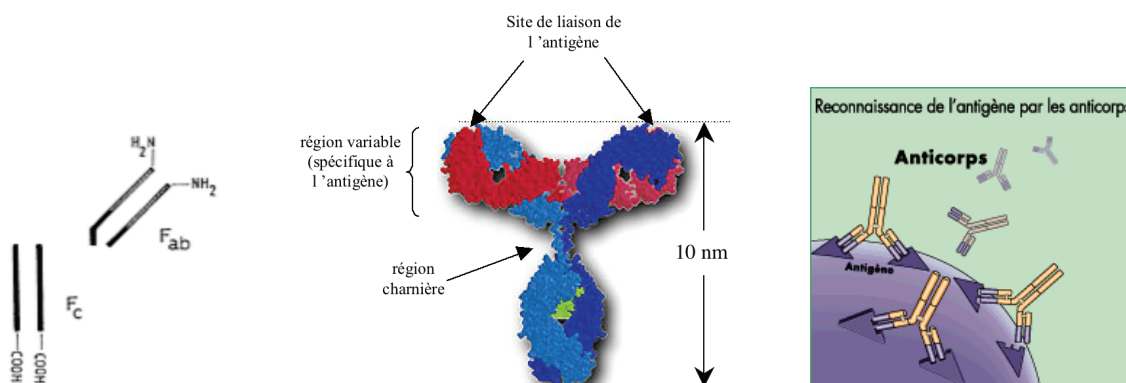


Figure 1. 2 : Structure d'un anticorps : éléments de la structure [COL97], image RX [d'après LEI], illustration du mécanisme d'affinité [GEN].

Notons dès à présent que les anticorps ont tous une morphologie similaire (cf. Figure 1. 2 à gauche), avec une région variable constituée de 2 fragments d'anticorps F_{ab} identiques terminés par les paratopes, sites de liaison spécifique avec l'antigène, et une région fixe F_c (fragment cristallisable), qui contient des acides aminés terminés par un groupement carboxyle (COOH) permettant la liaison avec un substrat solide. Les chaînes protéiques sont repliées, comme le montre la figure suivante sur laquelle est représenté au centre un modèle

tridimensionnel d'un anticorps déduit d'études de cristallographie en rayons X. Cette homogénéité de structure fait des anticorps un biorécepteur de choix permettant la réalisation d'immunocapteurs présentant un caractère générique.

Dans cette classe de récepteur apparaissent aussi des protéines non catalytiques ou d'origine non immune, chémorécepteurs membranaires, qui traversent la membrane cellulaire en déclenchant une modification structurale avec ouverture d'un canal ionique (ex. : l'acétylcholine utilisée comme neurorécepteur), ou activation d'une enzyme (ex. : les lectines qui se lient spécifiquement aux sucres et polysaccharides, très présents dans les glycoprotéines en surface de nombreuses cellules). Les trois processus susceptibles de se produire : liaison, ouverture d'un canal ionique et activité enzymatique, peuvent être utilisés comme moyen de reconnaissance par un biocapteur.

3.3 Hybridation

Lowe *et al.* [LOW90] ont suggéré que des systèmes récepteurs présentant à la fois une forte affinité, comme les anticorps, et une phase d'amplification, comme les enzymes, permettraient de détecter des concentrations dans la gamme 10^{-12} à 10^{-15} M. C'est le cas lorsque deux brins séparés d'une molécule d'ADN interagissent pour reformer la double hélice de départ, ou lorsqu'une molécule d'ARN messenger s'hybride avec la séquence du gène dont il est transcrit. Le phénomène de liaison mis en jeu est l'hybridation par complémentarité des bases azotées des nucléotides qui constituent les acides nucléiques, mettant en jeu des liaisons hydrogène. Ainsi, une séquence d'oligonucléotides synthétisée *in vitro* et fixée sur un support devient un récepteur pour capturer sa séquence complémentaire.

La révolution des puces à ADN [DEV05, LIP99] tient au grand nombre (quelques milliers à centaines de milliers) de séquences correspondant chacune à un gène différent et juxtaposées sur une lame de verre de 1 à quelques cm^2 , chaque « point » contenant jusqu'à un millier d'oligonucléotides identiques. Il est ainsi devenu possible d'analyser en une seule expérience l'expression d'un grand nombre de gènes et de décrire le « transcriptome » d'une cellule, c'est-à-dire l'ensemble des messages sous forme d'ARN transcrits à partir de l'ADN et qui confère à la cellule ses propriétés.

Pourtant, si l'expression des gènes détermine en grande partie la composition en protéines de cellules, ce sont les protéines qui déterminent directement les propriétés cellulaires. Aussi cherche-t-on aujourd'hui à réaliser des puces à protéines, en utilisant des biorécepteurs du type précédent, soit des anticorps dans le but d'analyser la composition en protéines de cellules, soit des protéines d'une cellule pour en étudier les propriétés. Une difficulté dans l'utilisation des protéines (réactions anticorps-protéine) est liée au fait que leurs propriétés dépendent beaucoup de leur structure tridimensionnelle, et que cette structure est beaucoup plus complexe et fragile que celle des acides nucléiques. L'immobilisation est alors une étape cruciale à considérer, afin de ne pas dénaturer l'élément actif biorécepteur.

3.4 Empreinte moléculaire

Les polymères à empreintes moléculaires (MIP) sont apparus récemment en vue de mimer les récepteurs biologiques (anticorps, récepteurs, enzymes) [YE04]. Produits de la chimie bio-organique obtenus par polymérisation de l'espèce cible avec un monomère, puis extraction de l'espèce cible, les MIP revendiquent comme avantages une grande stabilité chimique et physique, une faible quantité de molécules bioactives nécessaires, et la possibilité de répartir spatialement les groupes fonctionnels de sorte à préserver les sites actifs de reconnaissance. Sont visées toutes les applications des biorécepteurs : les immuno-essais de type ELISA, avec détection enzymatique ou fluorescence, les biocapteurs, notamment pour

automatiser le « screening » comparatif de molécules en utilisant le MIP comme phase stationnaire (chromatographie d'affinité), ou encore le contrôle de réactions chimiques, afin d'améliorer les produits bioactifs synthétisés.

4 Immobilisation du biorécepteur

L'immobilisation est ainsi une étape particulièrement importante dans la réalisation d'un capteur chimique ou biologique. C'est elle qui va permettre d'exploiter pleinement les potentialités du biorécepteur et du transducteur choisis.

Le biorécepteur doit être immobilisé sur (ou près de) la surface du transducteur, généralement sous la forme d'un film, tout en conservant ses propriétés de reconnaissance moléculaire vis-à-vis de l'analyte d'intérêt.

Ce film biologique doit idéalement présenter des propriétés de reproductibilité et d'uniformité (distribution et orientation spatiales des éléments actifs). La densité de ces éléments actifs doit être importante pour favoriser la sensibilité globale du capteur. Toutefois une trop grande densité (recouvrement total de la surface active du transducteur) peut parfois gêner au contraire le processus d'approche et de détection de l'espèce cible, en particulier lorsque sont mis en jeu des processus d'affinité, diminuant cette sensibilité globale.

D'autres critères permettront aussi de qualifier une technique d'immobilisation : la stabilité dans le temps du film biologique réalisé (en fonctionnement et en stockage), ainsi que la facilité d'adaptation à différents biorécepteurs. Ce dernier point est important surtout lorsqu'il s'agit de juxtaposer différents biorécepteurs sur un réseau de capteurs, ou de les immobiliser simultanément sur un même transducteur. Enfin, la compatibilité du film avec différents environnements de test (gamme de pH, température, force ionique et composition chimique) sera un élément intéressant à prendre en compte, qui dépend de la nature du biorécepteur mais est influencé également par la technique d'immobilisation.

Nous présentons les principales méthodes d'immobilisation, souvent inspirées de celles utilisées en chromatographie : par adsorption ou par liaison covalente sur une surface solide, par piégeage dans une membrane, par réticulation. La mise en œuvre de plus en plus courante d'un assemblage moléculaire associé à une immobilisation par adsorption ou liaison covalente en vue d'améliorer certaines propriétés fait l'objet d'un paragraphe distinct.

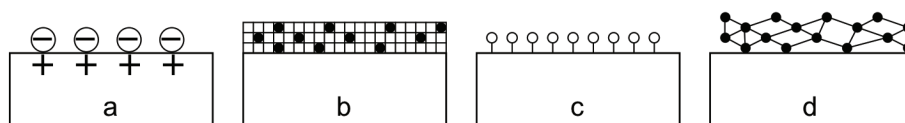


Figure 1. 3 : Méthodes d'immobilisation : a. physisorption, b. inclusion, c. liaison covalente, d. réticulation.

Enfin, à cette étape d'immobilisation est généralement associée une étape de saturation des sites non spécifiques, importante pour la spécificité du capteur réalisé.

4.1 Adsorption

L'adsorption de biomolécules en solution sur une surface solide peut résulter d'interactions physiques ou chimiques. Les liaisons physiques sont de faible énergie : forces de van der Waals, liaison ionique ou interaction hydrophobe. Les phénomènes de chimisorption impliquent le partage ou le transfert d'électron(s) pour constituer une liaison chimique, plus sélective et plus forte.

L'adsorption est une technique simple, elle se fait sur des supports variés, de type verre, plastiques, silicones ou métal. Néanmoins, les forces mises en jeu sont souvent de

faible énergie et les molécules peuvent se désorber lors de modifications physico-chimiques du milieu (pH, force ionique, température, solvant). De plus, la distribution et l'orientation spatiales des biomolécules ne sont pas maîtrisées et les surfaces obtenues sont de ce fait irrégulières et peu reproductibles, favorisant les phénomènes de non spécificité.

Les procédés d'immobilisation par adsorption mettant en jeu des interactions chimiques, plus fortes, présentent souvent l'inconvénient de dénaturer les biomolécules, dont l'activité biologique spécifique est alors diminuée voire détruite.

Cependant, du fait de sa simplicité et de son faible coût, l'adsorption directe de protéines ou autres biomolécules sur des puits de polystyrène est, et demeure, une technique d'immobilisation mondialement répandue dans tous les laboratoires de biologie pour réaliser des tests ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Elle est de ce fait souvent appliquée à la réalisation de biocapteurs. On notera ainsi l'utilisation de matériaux comme la poly-L-lysine pour immobiliser des biorécepteurs sur des biopuces [PEL03, TAI05]. Ce procédé n'a pas été appliqué à d'autres biocapteurs, principalement du fait de la nature strictement ionique de l'interaction.

4.2 Piégeage

Les biomolécules sont incluses ou piégées dans une matrice hôte. Elles peuvent ainsi être incluses dans un gel polymère avant polymérisation, ou encore être piégées au fur et à mesure de la formation électrolytique d'un polymère sur la surface métallisée du transducteur. Globalement, les techniques de piégeage dans une matrice permettent d'immobiliser une grande quantité d'espèce sensible. Par contre, les contraintes stériques, les interactions avec la matrice, une polymérisation par insolation, peuvent endommager la biomolécule et/ou limiter l'accessibilité des sites récepteurs.

L'inclusion peut également se faire sous forme d'encapsulation : en utilisant la technique sol-gel, la biomolécule est immobilisée dans un gel lui-même confiné près du transducteur par une membrane sélective semi-perméable (matrice poreuse transparente de verre, céramique ou autre matériau inorganique). Si cette technique permet d'obtenir des résultats intéressants en termes de conservation de l'activité de la biomolécule et de stabilité de la structure, elle présente ici des inconvénients en termes de fragilité de la membrane et de reproductibilité de la taille des pores, ainsi que de complexité de mise en œuvre.

4.3 Réticulation

Un réactif bifonctionnel réalise des pontages intermoléculaires (liaisons covalentes) entre les groupes fonctionnels de deux protéines, ou d'une protéine et d'un film, ou encore d'une même protéine. Ainsi le glutaraldéhyde, souvent utilisé, possède deux groupements aldéhyde à ses extrémités, qui réagissent avec les groupements amines primaires des enveloppes protéiniques, permettant ainsi de relier les protéines les unes aux autres. On obtient ainsi une membrane sous la forme d'un gel fortement réticulé, plus stable que celle obtenue par une technique de simple adsorption ou inclusion. Néanmoins la réticulation comporte un certain nombre d'inconvénients, notamment la difficulté de contrôler la réaction, qui peut engendrer la superposition de biomolécules susceptible de diminuer l'accessibilité des sites de reconnaissance à l'intérieur de la membrane sélective, et donc diminuer la sensibilité du capteur.

La réticulation est parfois employée en complément des autres méthodes d'immobilisation, pour améliorer la stabilité mécanique de la structure.

4.4 Liaison covalente

Une alternative directe à l'adsorption est la mise en œuvre de liaisons covalentes, de forte énergie, qui permettent d'améliorer les propriétés d'uniformité, de densité et de distribution des biomolécules, favorisant notamment la reproductibilité des surfaces obtenues. De plus, la formation de liaisons fortes améliore la stabilité du film obtenu et la possibilité de régénération du capteur. Enfin, cette technique permet dans certains cas l'orientation des molécules greffées, permettant ainsi d'améliorer la probabilité de reconnaissance et donc la sensibilité du capteur.

Ces liaisons covalentes peuvent être réalisées par activation de groupements fonctionnels existant sur le substrat et qui vont réagir avec des groupements fonctionnels de la biomolécule, ou à l'aide de réactifs bifonctionnels réalisant des pontages entre la biomolécule et le substrat activé.

Le substrat doit ainsi présenter en surface des groupements fonctionnels permettant la liaison covalente. C'est le cas au départ de certains matériaux (groupements hydroxyle OH sur la silice), mais les surfaces doivent être généralement modifiées pour fixer les biomolécules. Ainsi, la fonctionnalisation des surfaces de silice est souvent réalisée à l'aide d'agents de couplage siliciés, dont une extrémité réagit avec le substrat, l'autre présente un groupement fonctionnel de type époxy, amine, acide carboxylique, hydroxyle. Les surfaces métalliques comme l'or ou l'argent peuvent être modifiées par traitement avec des thiols fonctionnalisés en vue de générer un film auto-assemblé présentant en surface l'un des groupements précédents [DUS95, JOS05].

Les biomolécules comme les enzymes et les protéines disposent de groupements fonctionnels de surface permettant ces liaisons covalentes, notamment les fonctions présentes sur la chaîne latérale des acides aminés (cf. annexe « Eléments de biochimie ») : fonction amine pour la lysine, acide carboxylique pour l'aspartate et le glutamate, thiol (hydrogénéosulfure SH) pour la cystéine notamment. Cette grande variété de groupements fonctionnels permet de laisser libres les sites actifs de reconnaissance moléculaire.

Des agents de couplage chimiques, appelés encore « espaceurs » ou « cross-linkers », comme le glutaraldehyde, le carbodiimide, les succinimides sont largement utilisés comme intermédiaire réactionnel ; ainsi de nombreux articles citent l'utilisation d'une chimie conventionnelle EDC/NHS (1-ethyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]-carbodiimide / N-hydroxysuccinimide) [JOS05, LAN03, WEI03].

Pour la réalisation de biocapteurs, des membranes préactivées (ex. Immunodyne™ (Pall Biosupport, East Hill, NY, USA) ou Immobiline™ (Millipore, Bedford, MA, USA)) permettant de lier directement protéines ou enzymes sont apparues dans les années 90. Des polymères possédant des groupements fonctionnels permettant le greffage sont également utilisés par de nombreux auteurs. C'est le cas en particulier du dextran [LAN03, LOF91], matrice d'hydrogel présentant la propriété de limiter les interactions non spécifiques (électrostatiques) du fait de sa conductivité électrique, activée pour présenter en surface des groupes amine NH₂, acide carboxylique COOH ou thiol SH.

4.5 Assemblage moléculaire

Notons enfin l'intérêt d'un greffage indirect par des assemblages moléculaires, technique de plus en plus utilisée qui éloigne la surface du capteur des biomolécules et peut permettre ainsi, d'une part, de protéger le capteur du milieu d'analyse, d'autre part, de favoriser l'accessibilité des sites réactionnels. Des assemblages moléculaires à base de pont avidine (généralement streptavidine) pour l'immobilisation d'espèces biotinylées sont

couramment rencontrés [BUT92, DAV94, DUP04, MOR92, OUE04, PEL03]. Leur but premier est l'orientation des espèces, sous réserve que la biotinylation soit contrôlée [PEL03]. Des études ont montré également le rôle joué par l'éloignement résultant de l'assemblage multicouche. En effet, des sensibilités plus importantes ont été obtenues en liant la biotine (réaction biotine-avidine), ou mieux encore une cystéine (réaction cystéine-thiol), sur l'espèce à greffer, par l'intermédiaire d'un bras espaceur [REN05].

Une approche similaire utilisant comme couche intermédiaire la protéine A ou G, connues pour leur capacité à orienter les anticorps en les immobilisant par leur partie fixe, apparaît aussi largement dans la littérature [TAI05]. Si les signaux obtenus par des techniques de fluorescence (voir plus loin) sont effectivement ainsi augmentés, la sensibilité des capteurs n'est généralement pas améliorée. En effet, les anticorps se fixent, certes de manière orientée, mais uniquement sur les protéines bien orientées elles-mêmes pour les recevoir.

4.6 Techniques de dépôts

Chacune de ces méthodes d'immobilisation nécessite la mise en œuvre de techniques de dépôts appropriées, qu'il s'agisse d'incubation simplement par la mise en présence de l'élément actif en solution, ou d'un dépôt par spray ou à la tournette, par trempage, ou à l'aide de méthodes plus récentes de dépôt sol-gel, Langmuir-Blodgett (LB) ou électropolymérisation. Ces dernières techniques présentent chacune des avantages.

Les procédés sol-gel offrent l'avantage de pouvoir réaliser des dépôts de matériaux à température ambiante, dans un environnement peu sévère qui préserve l'activité des biomolécules. Ils consistent à élaborer des matériaux inorganiques (SiO_2 , TiO_2 , ZrO_2 , etc) ou composites $((-\text{O}-\text{Si}(\text{R}_1, \text{R}_2)-\text{O}-)_n)$ massifs ou en couche mince à partir de molécules précurseurs (alkoxydes) pouvant s'hydrolyser en milieu hydro-organique, se condenser dans le sol jusqu'à former un gel. Les matériaux sont formés par recuit basse température du gel. Les dépôts de couches minces sont réalisés par « spin-coating » (dépôt de sol sur tournette) ou « dip-coating » (trempage du support dans le sol).

Les dépôts de Langmuir-Blodgett (LB) consistent à transférer des molécules amphiphiles (acides gras, phospholipides) en passant le substrat à travers une monocouche de ces molécules présente en surface d'un liquide. Utilisée en combinaison avec une technique d'immobilisation efficace, le dépôt LB permet d'obtenir par adsorption sur une surface plane une ou plusieurs monocouches superposées (assemblage moléculaire) présentant de bonnes caractéristiques d'orientation, de densité et d'homogénéité, contrôlées. Ainsi, des couches d'immunoglobuline (IgG) déposées par cette technique sur une sous-couche de protéine A a montré une sensibilité supérieure de 40% lorsque la protéine A était aussi déposée par cette technique LB [TUR92]. Toutefois, des dépôts ainsi réalisés ont montré des problèmes d'instabilité en solution.

La méthode d'électropolymérisation est aussi une technique d'assemblage moléculaire, intéressante lorsqu'il s'agit de déposer des biomolécules dans un film polymère sur une électrode, en une ou deux étapes, selon que la solution contenant le monomère et l'activateur contient aussi la biomolécule, ou que celle-ci est déposée électrolytiquement au préalable. Un exemple classique d'utilisation de ce procédé concerne les membranes de polypyrroles (PPY) modifiés [DUP04, OUE04]. L'électropolymérisation présente l'avantage de permettre la réalisation d'un film polymère dont la perméabilité est contrôlée par rapport à la taille des espèces cibles, et qui permet le confinement des biomolécules contre la surface de l'électrode.

Certaines techniques sont également développées en vue de contrôler spatialement le dépôt sur la surface, notamment pour la réalisation de multicapteurs associant différents biorécepteurs juxtaposés. Ce « patterning » peut être réalisé [TAI05] à l'aide d'un

confinement physique, comme l'utilisation d'un tampon [LU01], ou par une impression de type jet d'encre ou robot permettant de réaliser des micro-dépôts (réseau de micro-gouttes), ou encore à l'aide de silanes photoactivables.

5 Les techniques de transduction

La liaison de l'analyte entraîne des modifications physiques dans l'élément de reconnaissance moléculaire, que le transducteur doit convertir en une grandeur mesurable :

- soit directement électronique (détecteur miniaturisable), comme dans le cas des transducteurs électrochimiques et électromécaniques ;
- soit d'une autre nature, généralement optique, nécessitant l'adjonction, parfois d'une source de lumière, et toujours d'un détecteur de lumière pour finalement retrouver un signal électronique.

Certains transducteurs peuvent aussi être sensibles à une variation de température, intéressante si la liaison se traduit par une réaction endothermique ou exothermique.

5.1 Electrochimique

Dans le cas d'une transduction électrochimique, la fixation de l'analyte entraîne généralement une réaction d'oxydo-réduction, ou simplement parfois une modification de conductivité électrique au niveau de l'interface, qui modifie un signal électrique. On distinguera dans ce cadre les transducteurs conductimétriques, ampérométriques, potentiométriques et les ISFET.

5.1.1 Conductimétrie ou impédancemétrie

Dans le cas d'un détecteur conductimétrique, la réaction avec l'analyte provoque une variation de conductivité au niveau de l'interface électrode – récepteur immobilisé. Ainsi, un système utilisant le principe d'une mesure d'impédance permet de détecter la réaction. Cette technique est sensible à de faibles variations de conductivité, ce qui la rend intéressante dans le cas des réactions d'affinité (antigène-anticorps).

5.1.2 Ampérométrie

Dans le cas d'un détecteur ampérométrique, la réaction avec l'analyte provoque une variation de courant à potentiel constant. Cette variation de courant provient de l'oxydation ou de la réduction d'une espèce électro-active à un potentiel donné, caractéristique de l'espèce, se produisant localement au contact d'une électrode de travail. Par rapport au détecteur potentiométrique présenté plus loin, une caractéristique de la détection ampérométrique est la consommation d'un des produits de la réaction.

Des précautions sont à prendre par rapport aux électrodes. Elles doivent être inaltérables pour être au même potentiel que celui « vu » par la solution. De plus, la mesure du potentiel sur l'électrode de travail (sur laquelle s'effectue la réaction rédox étudiée) doit être réalisée avec une électrode de référence non polarisable (son potentiel ne dépendrait pas de l'intensité), ou à l'aide d'une électrode ne débitant aucun courant. Il est ainsi généralement nécessaire d'ajouter une troisième électrode dite « de référence », tandis que le courant circule dans le circuit principal entre une « contre-électrode » ou « électrode auxiliaire » et « l'électrode de travail » [SAR91].

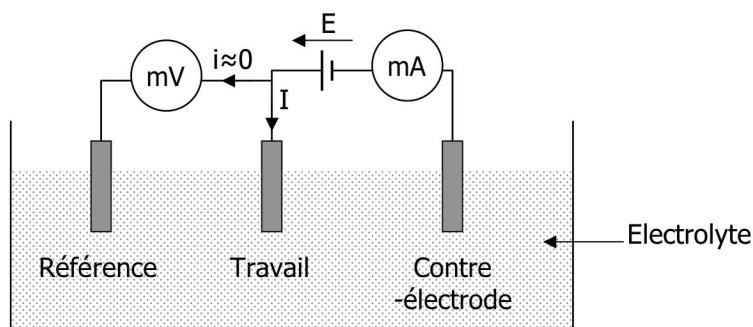


Figure 1. 4 : Représentation schématique d'un circuit de mesure voltamétrique.

Le cas le plus représentatif de détection ampérométrique est celui de l'oxydation aérobie du glucose catalysée par le glucose oxydase et produisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), détectable par électro-oxydation (ou à l'aide de luminophores dont l'oxydation chimiluminescente s'effectue en présence de H_2O_2).

Dans certains cas, l'élément électro-actif n'est pas mis en jeu par la réaction enzymatique initiale, mais par la dernière d'une série de réactions en cascade, un ensemble d'enzymes complémentaires étant co-immobilisées sur le substrat.

Notons enfin la tendance à modifier la surface des électrodes conventionnelles (platine, or, carbone, etc) afin de limiter les problèmes d'interférences d'espèces électro-actives et parfois d'augmenter la sensibilité grâce à des agents visant à préconcentrer l'analyte cible en surface. Des électrodes modifiées peuvent aussi permettre la détection d'espèces ne pouvant normalement pas donner lieu à une détection ampérométrique directe, mais qui perturbent les propriétés électrochimiques de l'électrode modifiée susceptible d'interagir spécifiquement avec ces espèces.

5.1.3 Potentiométrie

Le transducteur potentiométrique détecte une différence de potentiel apparaissant à courant nul entre une électrode ionosensible sélective de mesure (ISE pour Ion Selective Electrode) et une électrode de référence externe (cf. Figure 1. 5). L'électrode de mesure (ISE) est constituée d'une électrode baignant dans une solution de référence interne, séparée de l'électrolyte à analyser par une paroi particulière : la membrane ionique, qui doit posséder des propriétés de conduction ionique ou électronique permettant d'échanger sélectivement les espèces cibles avec l'électrolyte, tout en étant insoluble dans l'eau et étanche. L'égalisation des potentiels électrochimiques de l'espèce échangée dans les solutions internes et externes et la membrane, se traduit par une variation du potentiel électrique interne de l'électrode sensible, proportionnelle au logarithme de l'activité, et dans certaines conditions de la concentration, en analyte (loi de Nernst).

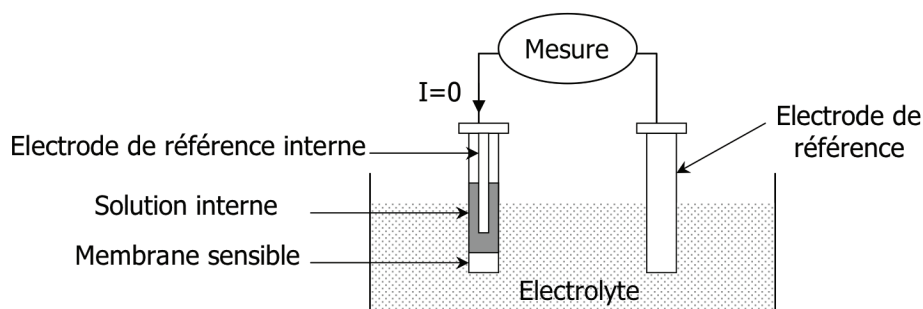


Figure 1. 5 : Principe du transducteur potentiométrique à ISE (d'après [SCH95]).

Par rapport à ce schéma de principe de base de l'ISE, les évolutions récentes du transducteur potentiométrique portent principalement sur le remplacement de la solution interne par un solide (isolant) et l'utilisation des technologies planaires de la microélectronique, en couche mince ou en couche épaisse sérigraphiée.

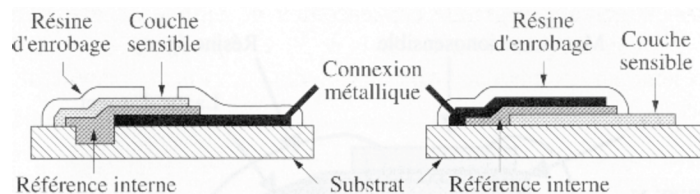


Figure 1.6 : Configurations de microcapteurs potentiométriques planaires [FA B03, chap.4, A. Pradel, E. Saint Aman].

5.1.4 ISFET

L'ISFET, pour « ion sensitive field effect transistor », est assimilable aux dispositifs potentiométriques « tout solide » décrits précédemment, l'interaction des ions avec l'élément sensible donnant lieu à un potentiel de membrane. Mais le transducteur est ici un transistor à effet de champ (MOSFET, metal oxide semiconductor field effect transistor) dont la grille métallique est remplacée par l'ensemble électrode de référence - électrolyte - membrane isolante. Contrairement aux membranes ioniques des électrodes potentiométriques, l'isolant doit ici être imperméable, et c'est la quantité d'espèces chargées fixées en surface qui influencera la réponse du capteur.

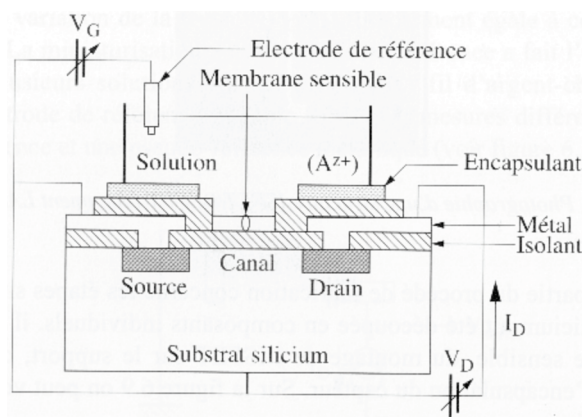


Figure 1.7 : Principe de l'ISFET [FAB03, chap.6, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet].

On rencontre aujourd'hui couramment le terme générique de CHEMFET (chemical FET) pour désigner un microcapteur chimique utilisant comme principe de base la transduction de type FET. Parmi eux, les BIOFET (biological FET) devraient représenter ceux permettant la détection d'une espèce biologique, ou contenant dans leur membrane sensible un bioélément. Ces termes recouvrent une grande variété d'appellations plus spécifiques, selon en particulier la nature du récepteur utilisé. Ainsi, à partir d'un dispositif original sensible au pH, ont été développés des capteurs d'autres ions (ISFET), de gaz (GASFET), enzymatiques (ENFET), immunologiques (IMFET).

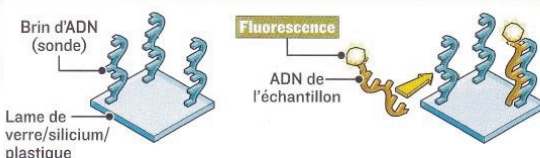
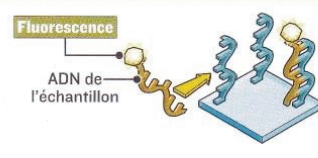
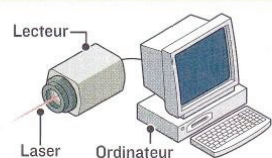
En appliquant une polarisation adaptée par rapport au potentiel de source V_S , soit un potentiel de grille V_G supérieur à la tension de seuil V_T , un canal se forme entre drain et

source et un courant de drain peut circuler. Sa valeur, qui dépend des charges apparaissant à l'interface membrane sensible – électrolyte, est fonction des tensions V_G et V_D (potentiel de drain), avec un régime linéaire pour $V_D < V_G - V_T$. Un circuit de mesure couramment utilisé consiste à maintenir le courant de drain constant en asservissant la tension de grille, dont la variation est directement égale à celle du potentiel interfacial.

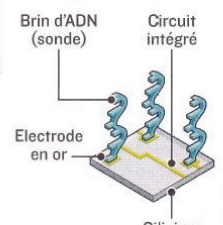
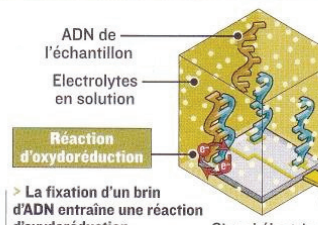
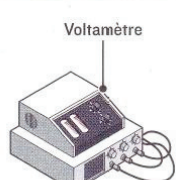
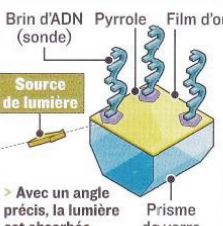
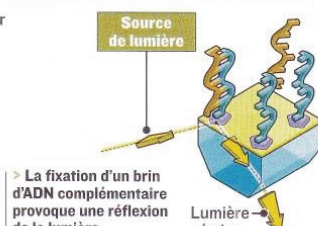
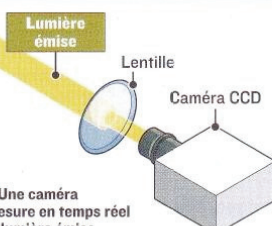
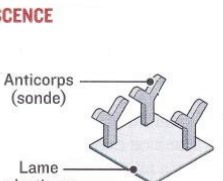
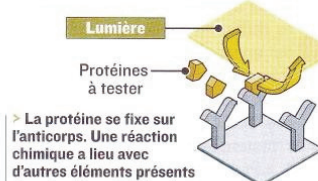
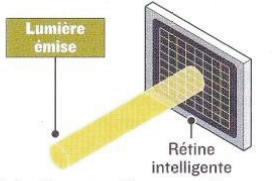
5.2 Optique ou opto-chimique

Dans le cas d'une transduction optique ou plus exactement opto-chimique, la fixation de l'analyte entraîne l'émission de lumière, ou module un signal optique, par modulation d'intensité (absorbance/réfléctance, fluorescence, luminescence), modulation de phase (variation de longueur ou d'indice mesurable par interférométrie), modulation de polarisation (biréfringence ou variation d'ellipticité), ou modulation de longueur d'onde (position spectrale, largeur spectrale). L'image ci-après représente quelques-unes de ces techniques d'analyse qui seront décrites dans ce paragraphe (plus une transduction de type électrochimique), en liaison avec l'appareillage de mesure présent et futur sur les biopuces à ADN.

POUR S'AFFRANCHIR D'ÉQUIPEMENTS LOURDS...

<p>Solution actuelle FLUORESCENCE</p>	 <p>1 Fixation de l'ADN ou de la protéine à la surface de la puce</p>	 <p>2 Mise en contact de l'ADN ou des protéines à tester avec la puce > L'ADN ou la protéine à tester sont marqués avec une molécule de fluorescence. S'ils sont complémentaires de la sonde, ils s'accrochent.</p>	 <p>3 Détection du signal > Un laser est nécessaire pour détecter la fluorescence.</p>	<p>> Avantages</p> <ul style="list-style-type: none"> • Test de basse ou haute densité • Sensible • Reproductible <p>> Inconvénients</p> <ul style="list-style-type: none"> • Marquage de l'ADN ou la protéine à tester • Appareillage lourd
---	--	--	--	---

...TROIS OPTIONS DE MINIATURISATION

<p>Techniques de demain ELECTROCHIMIE</p>	 <p>1</p>	 <p>2 Réaction d'oxydoréduction > La fixation d'un brin d'ADN entraîne une réaction d'oxydoréduction.</p>	 <p>3 > Le signal électrique est mesuré par un voltmètre.</p>	<p>> Avantages</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aucun marquage de l'ADN à tester • Détection en temps réel • Rapide • Sensible <p>> Inconvénients</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reproductible
<p>RÉSONANCE PAR PLASMONS DE SURFACE</p>	 <p>1 > Avec un angle précis, la lumière est absorbée.</p>	 <p>2 > La fixation d'un brin d'ADN complémentaire provoque une réflexion de la lumière.</p>	 <p>3 > Une caméra mesure en temps réel la lumière émise.</p>	<p>> Avantages</p> <ul style="list-style-type: none"> • Détection en cinétique • Aucun marquage de l'ADN à tester <p>> Inconvénients</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ne s'adresse pas à des puces de haute densité
<p>CHIMOLUMINESCENCE</p>	 <p>1</p>	 <p>2 > La protéine se fixe sur l'anticorps. Une réaction chimique a lieu avec d'autres éléments présents dans le milieu et libère de la lumière.</p>	 <p>3 > La lumière est captée par une rétine intelligente qui traite le signal lumineux.</p>	<p>> Avantages</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aucun marquage de la protéine à tester • Faible coût • Appareillage de petite taille <p>> Inconvénients</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ne s'adresse pas à des puces de haute densité

SOURCE : « LUSINE NOUVELLE »

Figure 1. 8 : Illustration de technologies de réalisation de biopuces [PEZ04].

Ce type de transduction, du fait de la nature optique de la grandeur de mesure, présente l'avantage d'une isolation électrique entre l'échantillon de test et l'instrumentation de mesure associée, ainsi que d'une immunité aux champs électromagnétiques.

Il est cependant nécessaire d'associer à l'élément sensible un appareillage souvent lourd, comprenant des dispositifs d'émission de lumière (sauf pour la luminescence) et de détection et analyse de lumière, qui requiert parfois un marquage d'espèce (cas de la fluorescence).

5.2.1 Absorbance

Les phénomènes d'absorption de l'ultraviolet et du visible constituent la base de la colorimétrie et sont largement exploités en analyse quantitative. Les mesures reposent sur la loi de Beer et Lambert qui relie, moyennant certaines conditions, l'absorption de la lumière par un composé et sa concentration :

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon(\lambda) \cdot L \cdot C$$

où A désigne l'absorbance (paramètre optique sans dimension) d'un faisceau lumineux d'intensité initiale I_0 , réduite à une valeur I après traversée d'une épaisseur L (en cm) du composé d'étude en solution dans une matrice non absorbante ; C est la concentration molaire (mol.L^{-1}) de ce composé, et $\varepsilon(\lambda)$ est le coefficient d'absorption molaire ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) à la longueur d'onde de mesure λ . Cette loi n'est vérifiée que dans certaines conditions, en particulier elle n'est valable que pour de faibles concentrations.

Techniquement, la mesure de l'absorbance nécessite un spectromètre, spectrocolorimètre, ou encore spectrophotomètre, comportant une source de lumière, un système dispersif combiné à un monochromateur pour extraire du rayonnement une bande spectrale étroite, une zone de mesure (cuve, etc) et un détecteur d'intensité (photomultiplicateur ou dispositif à semi-conducteur : détecteur à transfert de charge CCD et photodiode). La mesure est réalisée sur un échantillon de mesure, par rapport à un échantillon de référence (blanc analytique).

5.2.2 Fluorescence

Lorsqu'une substance est éclairée par une radiation lumineuse du domaine du visible ou du proche ultraviolet, l'énergie absorbée peut être restituée sous la forme d'énergie thermique, et/ou par émission de lumière à une longueur d'onde supérieure, ou moins énergétique, donc décalée vers le rouge par rapport à la longueur d'onde d'excitation. On parle dans ce cas de fluorescence lorsque les durées de vie sont de l'ordre de 1 ns à 10 ms, de phosphorescence au-delà de 100 ms.

En dehors des molécules possédant une fluorescence naturelle, beaucoup peuvent le devenir par association avec une autre molécule fluorescente, appelée alors « marqueur » fluorescent. Cette technique est largement utilisée, notamment pour la visualisation de tissus biologiques à l'aide de microscopes fluorescents, plusieurs longueurs d'ondes pouvant caractériser différentes parties des cellules étudiées.

C'est typiquement la solution retenue actuellement pour la réalisation des puces à ADN, illustrée sur la figure suivante : typiquement, les ADN cibles sont marquées avec une biotine, la détection se fait après fixation de streptavidine-phycoérythrine sur les biotines. Cette technique permet une mise en parallèle importante, ainsi Affymetrix, leader dans le domaine des biopuces, commercialise des matrices d'un demi-million de plots sur une surface de l'ordre du cm^2 [LIP99].

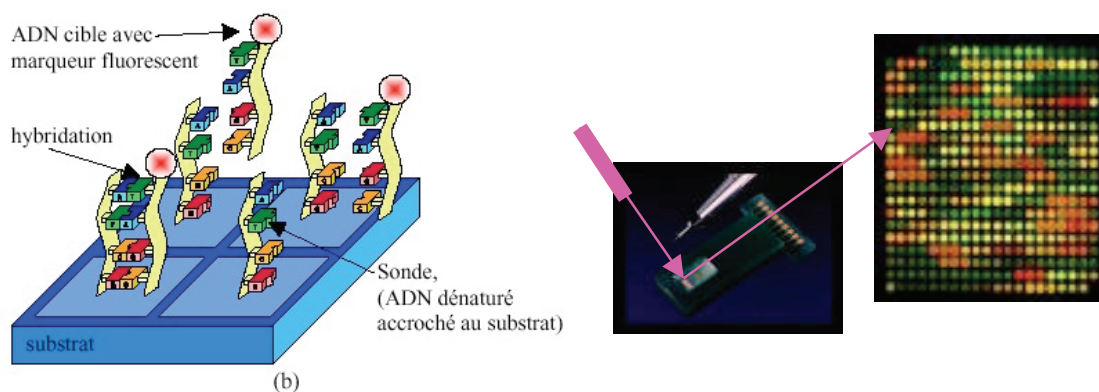


Figure 1. 9 : Schéma de principe et images d'une biopuce à ADN avec détection de fluorescence.

Pour la réalisation de dosages, le phénomène de fluorescence est détecté à l'aide d'un fluorimètre à rapport de fluorescence, qui quantifie la fluorescence par rapport à un standard sur une bande étroite de longueurs d'onde (deux monochromateurs permettent de sélectionner une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde de mesure). L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration pour des solutions très diluées. Pour des solutions trop concentrées, le signal de fluorescence passe par un maximum avant de diminuer de nouveau.

Une autre catégorie d'appareils, le spectrofluorimètre, permet d'enregistrer un spectre de fluorescence et ainsi réaliser des analyses.

Des biocapteurs à fluorescence détectée par des ondes évanescentes sont également développés [TAI05].

5.2.3 Bio/Chimiluminescence

Certaines réactions chimiques ou biochimiques sont accompagnées d'une émission lumineuse. La réaction mise en jeu est une oxydation d'un chromogène faite en présence d'un catalyseur, comme le *luminol* utilisé dans les systèmes d'éclairage de secours non électriques, et qui peut servir notamment à doser le peroxyde d'hydrogène.

Cette technique est par exemple particulièrement utilisée lors des tests immunochimiques ELISA. Un intérêt est qu'elle ne nécessite pas de source de lumière. Par contre, un détecteur est indispensable, qu'il s'agisse d'un simple colorimètre visuel ou d'un spectrophotomètre automatique.

5.2.4 Ondes évanescentes

Pour cette partie, le lecteur intéressé trouvera un document très intéressant et parfaitement adapté à notre problématique en [MAI04].

Une onde évanescente est obtenue lorsqu'une onde incidente, issue du milieu le plus réfringent (prisme, réseau, structure guidante), arrive sur l'interface sous un angle d'incidence supérieur à l'angle de réfraction limite (condition de réflexion totale). Cette onde évanescente a une amplitude qui décroît exponentiellement en fonction de sa distance à l'interface, et possède donc la propriété intéressante d'être confinée au voisinage de cette interface (quelques centaines de nanomètres), siège des interactions biomoléculaires. Les méthodes utilisant les ondes évanescentes sont ainsi adaptées à la mesure des propriétés d'absorbance et/ou de fluorescence [TAI05] des molécules adsorbées en surface du capteur, dans la limite de la profondeur de pénétration de l'onde, par la mesure des variations de phase et

d'amplitude du faisceau réfléchi. Dans certains cas, il existe un angle d'incidence dit « angle de résonance », pour lequel l'onde évanescente est fortement augmentée, et qui est extrêmement sensible à l'indice de réfraction à la surface du capteur. Globalement, ces mesures présentent comme intérêts d'être peu sensibles aux effets de volume, de ne pas perturber l'interaction et de ne pas nécessiter d'étape supplémentaire (en particulier aucun marqueur n'est nécessaire), ainsi les interactions peuvent être suivies en temps réel, autorisant l'étude de cinétiques de réactions.

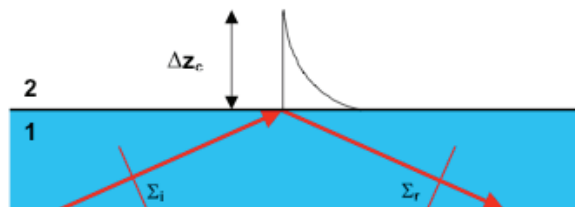


Figure 1. 10 : Onde évanescente créée lors d'une réflexion totale à l'interface de deux milieux [MAI04].

La spectroscopie par réflexion interne, les miroirs résonants et la SPR (Résonance de Plasmons de Surface) sont les techniques optiques évanescentes les plus courantes dans le domaine des biocapteurs.

La spectroscopie par réflexion interne (ou IRS pour Internal Reflection Spectroscopy) utilise l'onde évanescente associée à la réflexion totale de lumière sur une interface métal/diélectrique ou diélectrique/diélectrique. Si l'énergie de l'onde évanescente est absorbée par l'espèce cible, l'immobilisation de cette espèce en surface se traduit par une diminution de l'amplitude de l'onde réfléchie. Cette technique nécessite cependant d'adapter la longueur d'onde incidente au spectre d'absorption de l'espèce cible. Une autre application plus standard de l'IRS consiste à utiliser l'onde évanescente pour exciter des fluorophores adsorbés en surface (TIRF ou Total Internal Reflection Fluorescence). Il est ainsi possible de réaliser des tests immunologiques par fluorescence sans étape de lavage ou de séparation avant lecture du résultat. Pour cela, des antigènes marqués introduits dans le milieu de test sont en compétition avec les espèces cibles pour se lier à l'anticorps immobilisé en surface d'un guide d'onde. Le nombre d'antigènes marqués est estimé à partir du signal de fluorescence couplé dans le guide, et comparé à une solution de référence (calibrage du capteur en l'absence d'espèce cible).

Dans un biocapteur à miroir résonant, l'onde est couplée dans un guide d'onde diélectrique par un prisme placé au contact du substrat. Si l'angle d'incidence est différent de l'angle de résonance de la composante transverse électrique (TE) ou transverse magnétique (TM) du faisceau lumineux, le faisceau est réfléchi directement par le prisme (« miroir ») sans être influencé par le guide. Sinon, la composante TE ou TM correspondante est couplée à travers le substrat dans la couche guidante, dans laquelle elle subit des réflexions internes multiples (« résonance »), permettant à l'onde évanescente de pénétrer dans la couche biologique avec une sensibilité ainsi accrue aux modifications biologiques de surface. Dans ce cas, la réflexion totale se produit toujours sur le prisme, mais avec un saut (retard) de phase de la lumière réfléchie.

Les montages interférométriques, mesurant un déphasage et utilisant un montage différentiel, permettent généralement une meilleure résolution qu'une mesure de variation d'amplitude. L'interféromètre différentiel mesure le déphasage entre des modes TE et TM,

l'interféromètre de Mach-Zehnder mesure le déphasage entre un guide de référence et un guide fonctionnalisé, permettant de compenser des variations de phase dues à une fixation non-spécifique ou au changement d'indice de la solution.

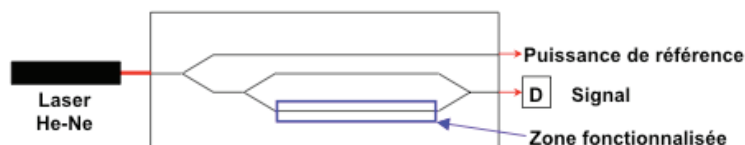


Figure 1. 11 : Schéma de principe d'un interféromètre de Mach-Zehnder intégré.

La biodétection par SPR, pour résonance de plasmons de surface, est proche des miroirs résonants. Un plasmon de surface est classiquement généré par une onde incidente polarisée TM, qui traverse un prisme d'indice de réfraction élevé et se réfléchit sur l'interface avec un film métallique (or ou argent) déposé en surface et placé au contact du diélectrique constitué par le milieu biologique d'étude. Au voisinage d'un angle d'incidence dit « angle de résonance », sont créées des oscillations résonantes dans le plasma constitué par les électrons libres, qui se comportent comme un gaz ionisé, de la bande de conduction du métal. Le « plasmon de surface » ainsi généré correspond à une onde de décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface métal / diélectrique. La majeure partie de l'onde évanescente est confinée dans le diélectrique à moins de 100 nm de l'interface. La résonance des plasmons de surface se traduit par un pic d'absorption d'énergie du faisceau incident près de l'angle de résonance, induisant une chute de réflectivité du métal. D'autres procédés permettent de générer des plasmons de surface, à partir de structures par guide d'onde optique ou par réflexion sur un réseau [HOM03].

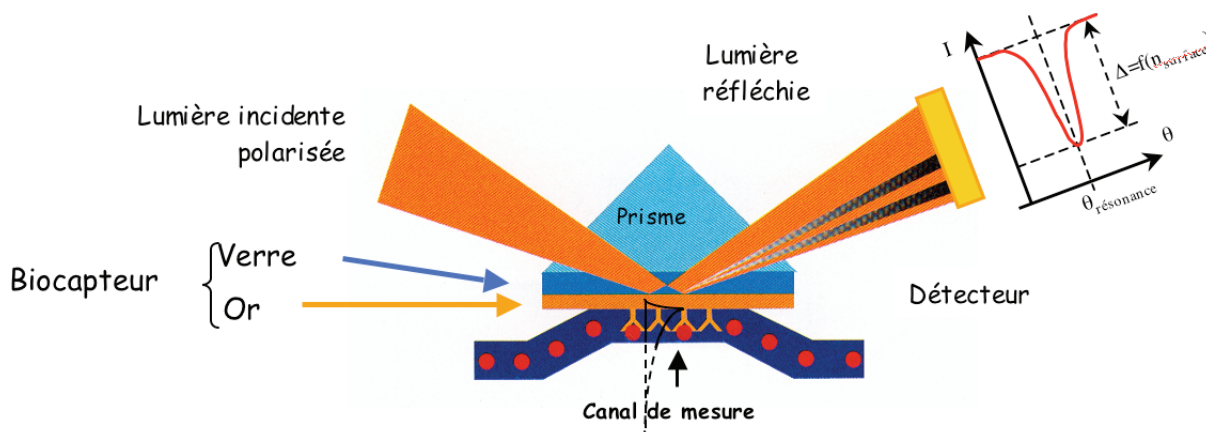
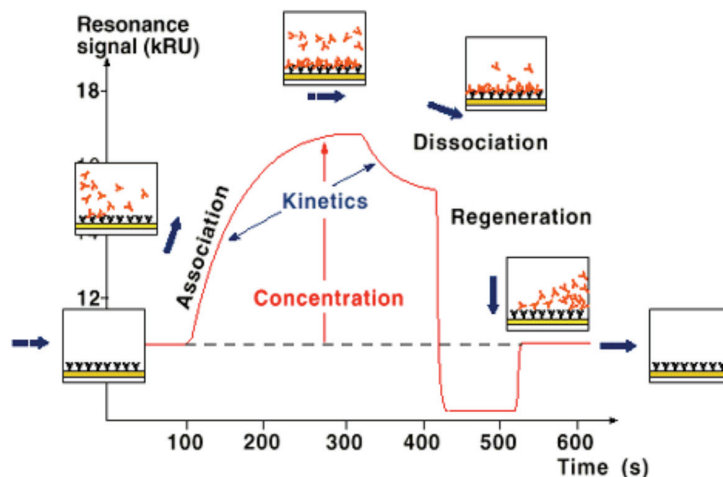


Figure 1. 12 : Principe de la résonance de plasmons de surface, à partir de [INS] et [MON].

Ces méthodes optiques évanescentes permettent ainsi de suivre en temps réel les caractéristiques intrinsèques des réactions, notamment d'affinité, comme le décrit l'illustration ci-dessous. Plusieurs instruments commercialisés se basent sur ces principes de mesure, notamment les miroirs résonants (IASys™ commercialisée par Affinity Sensors) et la SPR (BIAcore™ commercialisé par Biacore International AB¹, SPREETA™ par Texas Instruments²). Là encore, source de lumière et photodétecteur (interrogation angulaire) ou spectromètre (interrogation spectrale) sont indispensables au système.

¹ <http://www.biacore.fr/lifesciences/index.html>

² <http://www.ti.com/snc/products/sensors/spreeta.htm>



Cinétique d'une détection par SPR [INS].

5.2.5 Ellipsométrie

L'ellipsométrie consiste à mesurer les modifications d'amplitude et de phase subies par une lumière polarisée, avant et après réflexion à l'interface de deux milieux d'indices de réfraction différents. Ces mesures donnent des informations sur l'épaisseur et l'indice de réfraction d'une couche adsorbée en surface. Cette technique nécessitant un équipement sophistiqué est très sensible et permet de détecter par exemple des variations d'épaisseur de l'ordre de l'angström (couche mono-atomique).

5.2.6 Un transducteur particulier : Fibre ou guide optique

L'utilisation de fibres optiques [MAR02, MON04] présente des intérêts à double titre.

D'une part, ces éléments peuvent jouer le rôle de support de propagation du signal lumineux. On parle dans ce cas de capteur « extrinsèque », la fibre optique n'ayant pas de rôle direct dans la transduction du signal. Il est ainsi possible par exemple de réaliser des mesures d'absorbance sans avoir à faire de prélèvement, ou pour suivre la concentration d'un produit sur une ligne de production éloignée, avec la possibilité de fonctionner à haute température, en milieu corrosif ou explosif : une sonde à immersion est placée en bout des fibres optiques assurant les trajets lumineux aller et retour entre le point de test et l'instrumentation de mesure.

Par ailleurs, les fibres optiques peuvent aussi être utilisées comme transducteurs sensibles, on parle alors de capteur « intrinsèque ». Dans ce cas, une ou plusieurs caractéristiques de transmission, de réflexion, ou d'émission de la lumière dans une ou plusieurs fibre(s) optique(s) sont fonctions de la grandeur à mesurer. L'effet physique ou chimique peut être ponctuel et mesuré à l'extrémité de la fibre, ou distribué en plusieurs points localisés sur la fibre, ou encore réparti sur toute une longueur de fibre, avec les avantages cités précédemment : test *in-situ* sans prélèvement, éloignement, environnement hostile. Un biocapteur peut ainsi être réalisé en immobilisant l'élément biologique de reconnaissance à l'extrémité d'une fibre optique, ou autour du cœur localement dénudé, la réaction avec l'espèce cible induisant typiquement une variation d'indice modifiant la propagation, ou un décalage en fréquence lié à l'excitation de cibles immobilisées marquées (fluorescence).

L'optique intégrée (fabrication collective utilisant des technologies dérivées de la microélectronique) permet la réalisation de guides optiques planaires « simples » pouvant remplacer dans certains cas les fibres optiques. Par exemple, un guide constitué d'un film mince encadré par deux milieux diélectriques d'indices de réfraction plus faibles, d'un côté le

substrat, de l'autre côté le milieu de test, à l'interface duquel vont se produire les interactions biomoléculaires, pourra servir de support à une analyse par spectroscopie de réflexion interne (IRS). Dans ce cas, un faisceau lumineux injecté dans ce film sous la forme d'un mode guidé, générera une onde évanescente aux deux interfaces de la structure guidante. L'optique intégrée permet aussi la réalisation de composants optiques complexes comme un interféromètre, dont un des deux bras peut aisément être modifié pour jouer le rôle d'élément sensible par rapport à l'autre bras, dit de référence.

Un instrument commercialisé, le RAPTOR (Research International, Monroe, WA-USA) [TAI05] utilise le principe de la biodétection par fibre optique et intègre l'ensemble de la chaîne d'analyse, de l'échantillonnage au résultat. Cet instrument nécessite cependant un traceur fluorescent.

5.3 Electro-mécanique

Dans le cas d'une transduction électro-mécanique, la modification d'une grandeur mécanique liée à la fixation de l'analyte entraîne la variation d'un signal électrique. L'effet mécanique mis en jeu peut être un effet de masse, mais d'autres effets peuvent aussi jouer un rôle, selon la sensibilité du transducteur, comme des variations de viscoélasticité ou de géométrie par exemple. Depuis quelques années apparaissent aussi des études mettant en jeu l'électromagnétisme dans le principe de base de biocapteurs, à l'aide de billes magnétiques permettant d'amplifier le signal obtenu, notamment par des transducteurs électro-mécaniques : cette technique sera présentée en dernière partie de ce paragraphe.

5.3.1 Onde élastique

L'onde élastique, ou onde acoustique, correspond à un déplacement mécanique, généré par effet piézoélectrique et se propageant par élasticité dans le matériau. Toute perturbation de la propagation de l'onde, notamment en présence d'un effet mécanique aux limites ou dans la structure du dispositif, est susceptible de se traduire par une modification des pertes et/ou de la vitesse de propagation.

Deux principaux types de structures sont utilisées : les dispositifs dits à ondes volume (ou BAW pour Bulk Acoustic Wave), communément appelés aussi microbalances à quartz (ou QCM pour Quartz Crystal Microbalance) du fait d'une grande sensibilité à l'effet de masse en particulier, et les dispositifs planaires. Les structures de base de ces dispositifs sont représentées sur la figure suivante.

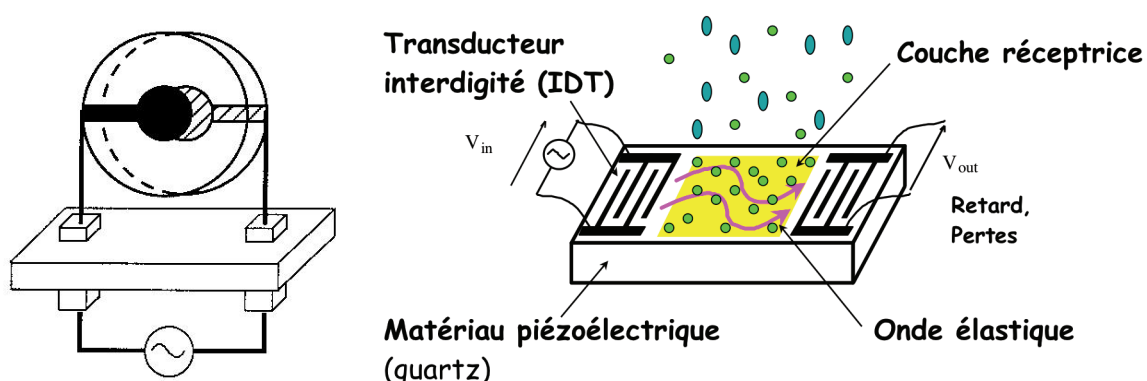


Figure 1. 13 : Schémas d'une microbalance à quartz (à gauche) et d'un dispositif planaire (à droite).

La microbalance à quartz fonctionne selon un mode de vibration en cisaillement d'épaisseur, à des fréquences typiques de 500 kHz à 10 MHz, pouvant atteindre la centaine de mégahertz dans le cas d'un disque piézoélectrique très fin.

Le dispositif planaire est constitué d'électrodes interdigitées déposées en surface du substrat piézoélectrique, permettant la conversion entre une énergie électrique (entrée/sortie) et l'énergie mécanique transportée par l'onde élastique. Dans le cas d'une application capteur, ce dispositif comporte le plus souvent deux ports, comme représenté sur la figure ci-dessus : il est utilisé en électronique comme « ligne à retard », dans laquelle l'onde se propage d'une structure interdigitée vers l'autre, avec un retard caractéristique parfaitement défini, de l'ordre de quelques microsecondes. Des dispositifs planaires appelés « résonateurs » sont aussi parfois étudiés pour ces applications : la résonance correspond à la superposition constructive d'ondes incidentes et réfléchies entre les deux structures interdigitées. Des résonateurs à un port peuvent être réalisés, à l'aide d'une structure interdigitée centrale bidirectionnelle pour la conversion électro-mécanique, encadrée par des structures interdigitées permettant de réfléchir une partie de l'énergie mécanique reçue vers le centre de la structure. Ces structures planaires, filtres et résonateurs, présentent des fréquences d'oscillation ou de résonance de 100 MHz à quelques centaines de MHz, et de très bons coefficients de qualité permettant de réaliser des oscillateurs ultra-stables. Utilisant les technologies de surface de la microélectronique ou des microsystèmes, ces dispositifs présentent notamment les intérêts d'une fabrication collective et d'une possibilité de miniaturisation.

Plusieurs types d'ondes acoustiques peuvent être générées : citons en particulier les ondes de Rayleigh ou communément SAW pour Surface Acoustic Wave, les modes de plaque transverses horizontaux (SH-APM pour Shear Horizontal Acoustic Plate Mode), les ondes de Love (ou SH-SAW pour Shear Horizontal Surface Acoustic Wave). Susceptibles chacune de présenter des avantages et des inconvénients pour la détection, ces structures dont l'étude, avec celle des mécanismes d'interaction mis en jeu lors des détections, constitue le cœur de nos travaux de recherche, seront présentées au chapitre suivant. Mentionnons d'ores et déjà les fortes potentialités de ces dispositifs en termes de sensibilité, notamment à l'effet de masse (en particulier pour les dispositifs à ondes de Love), ce qui leur confère de plus un caractère générique, l'effet de masse étant omniprésent lors de l'immobilisation des espèces cibles.

Tous les types de transducteurs à ondes élastiques peuvent faire l'objet d'une mesure passive, par caractérisation d'impédance à l'aide d'un impédancemètre ou d'un analyseur de réseau, ou d'une mesure active, par montage en oscillateur et mesure de fréquence. La mesure passive, qui permet de suivre séparément gain et phase, sera préférée dans une étape de caractérisation en laboratoire. La mesure active présente des avantages en termes de résolution de mesure (qui jouera un rôle déterminant sur la résolution du capteur) et d'intégrabilité du système (transducteur et mesure), aussi elle sera généralement préférée en phase d'application à la détection.

5.3.2 Microstructure mobile

Les technologies récentes développées pour la réalisation de microsystèmes fournissent de nouveaux dispositifs de transduction permettant la réalisation de microcapteurs intégrés [DUF05, ZIE04]. Ainsi, une microstructure mobile, par exemple une micropoutre (cf. Figure 1. 14), pourra être exploitée selon deux modes de fonctionnement. En mode dynamique, la variation de masse liée à la sorption d'espèces cibles par la couche sensible déposée en surface, provoquera une variation de la fréquence de résonance de la structure. En mode statique, c'est une modification des contraintes (effet bilame), qui se traduira par une

variation de la courbure de la micropoutre. Ces nouveaux transducteurs permettent d'espérer aussi de très bonnes sensibilités.

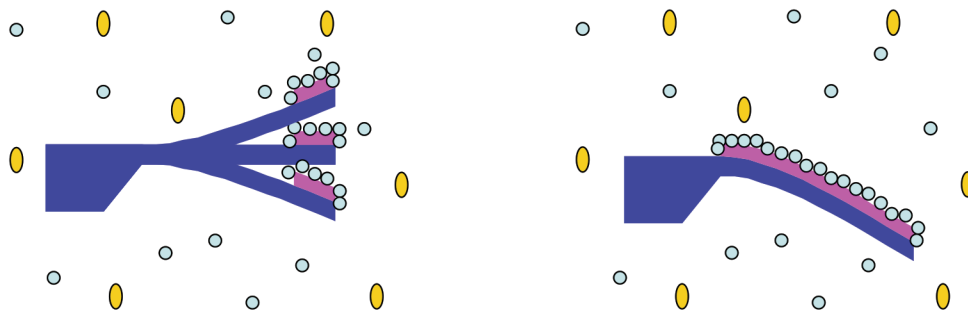


Figure 1. 14 : Principe d'un capteur à micropoutre, détection en mode dynamique (à gauche) ou statique (à droite).

Dans le cas du montage dynamique, la microstructure doit généralement être excitée, à l'aide d'un actionnement piézoélectrique (par collage sur un support piézoélectrique), électrostatique (avec des électrodes placées sur la micropoutre et sur le substrat au-dessous d'elle), électromagnétique (en faisant circuler un courant variable dans une piste métallique intégrée dans la poutre, celle-ci étant placée dans un champ magnétique), ou encore électrothermique (avec une résistance chauffante intégrée dans la micropoutre). Les deux modes de fonctionnement requièrent un dispositif de mesure de la déflexion, statique ou dynamique, obtenue. La solution la plus communément retenue consiste à suivre la variation de l'angle de réflexion d'un faisceau laser sur la microstructure (mesure de type microscope à force atomique ou AFM). La difficulté d'intégration d'un tel système limite cependant son intérêt par rapport à d'autres solutions comme la mesure de la capacité entre la microstructure et le substrat, ou de la valeur d'une résistance piézoélectrique intégrée sur la microstructure, ou encore de la variation d'intensité lumineuse transmise entre un guide optique intégré sur la micropoutre et un autre, placé en vis-à-vis lorsque la structure est au repos.

Comme pour les transducteurs à ondes élastiques, la détection en mode dynamique pourra faire l'objet d'un montage en oscillateur, qui permettra une meilleure résolution de mesure et donc un meilleur seuil de détection. Néanmoins, un mode dynamique, tel que représenté sur le schéma ci-dessus, présentera des inconvénients pour la détection en milieu liquide, le coefficient de qualité étant très fortement atténué dans ce cas. Aussi les travaux en cours sur les bio-détecteurs utilisent principalement le mode statique. Mais l'étude de nouveaux modes dynamiques, avec un déplacement transverse horizontal par rapport à la direction de la poutre, permettrait de limiter les pertes d'énergie dans le milieu liquide de test.

5.3.3 Billes magnétiques

De même que pour la technique ELISA (cf. Annexe « Techniques Immunologiques »), des particules magnétiques peuvent être utilisées afin d'amplifier le signal. En effet, le fait d'utiliser la surface de billes magnétiques pour fixer les biorécepteurs puis les espèces cibles, permet d'augmenter la surface active équivalente. Les interactions avec les antigènes des espèces cibles sont de plus favorisées, lorsqu'elles se produisent dans le volume de la solution et pas uniquement sur la surface du transducteur. L'application d'un champ magnétique permet d'attirer ces billes magnétiques et leur revêtement biologique contre la surface du transducteur.

Cette technique est par exemple mentionnée en [PYU98], associée à un transducteur à ondes acoustiques, et en [ZIE04], associée à un transducteur de type micropoutre dont les billes magnétiques amplifient la déflexion lors de la détection. D'autres types de transducteurs

peuvent aussi être mis en œuvre avec des particules magnétiques, en particulier des magnéto-résistances, utilisées conventionnellement comme têtes de lecture dans les disques durs [GRA04].

6 Bilan et orientation de nos travaux

Nous avons ainsi présenté les grandes parties d'étude d'un biocapteur : le biorécepteur, son immobilisation, et le transducteur, en exposant les choix technologiques mis en œuvre commercialement ou dans la littérature.

Actuellement, la majorité des biocapteurs étudiés et commercialement disponibles utilisent des enzymes fixées sur des électrodes solides opérant en mode ampérométrique. Parmi les applications, les plus représentatives concernent la détection d'oxygène et de glucose. Si les instruments réalisés donnent en général satisfaction, l'inconvénient de ce type de capteur est qu'il est très dépendant de l'application. En effet, la détection d'une nouvelle espèce cible nécessite une étude spécifique de la partie récepteur assurant la reconnaissance.

Plus récemment apparue sur le marché, la technologie des biopuces permet l'analyse simultanée de milliers de paramètres. Mais cette technologie nécessite le greffage de marqueurs (cet inconvénient pourra disparaître en mettant en œuvre d'autres types de détection), et donne une indication en fin de procédé.

Une technologie émergente, qui a donné lieu à des commercialisations mais nécessite encore de nombreuses améliorations, utilise la résonance des plasmons de surface (SPR). Permettant de mesurer la fixation de molécules à la surface d'une couche métallique déposée sur un prisme, elle se distingue par l'absence de marquage des cibles, ce qui est particulièrement intéressant, non seulement pour éviter une étape de marquage, mais surtout pour conserver leurs propriétés, notamment de réactivité, à des espèces fragiles, notamment lors d'interactions protéines-protéines. De plus, le suivi en temps réel permet de suivre la cinétique de l'interaction, qui pourra permettre de déterminer ainsi les constantes dynamiques mises en jeu (association, dissociation, affinité). Une limitation provient de la profondeur de pénétration du champ évanescent (quelques centaines de nanomètres), et donc de la faible épaisseur permettant une sensibilité effective du transducteur.

Nos travaux visent à la réalisation d'un capteur qui se pose comme un concurrent direct de la SPR, avec les mêmes avantages d'absence de marquage et de suivi temps réel des cinétiques, avec en outre des possibilités d'intégration sous la forme d'un système portable (capteur et instrumentation), et une sensibilité accrue permettant d'éviter ou limiter des étapes préalables de pré-concentration (réduction du système et du temps). Les dispositifs à ondes élastiques de Love réunissent des propriétés permettant d'espérer obtenir ce résultat. Nous les associerons dans un premier temps à un récepteur de type immunologique, permettant de proposer une plate-forme générique, adaptable à un grand nombre d'applications, sous réserve de pouvoir produire les anticorps spécifiques de l'espèce cible. Cet objectif constitue la base de nos travaux de recherche sur les systèmes de biodétection.

7 Références bibliographiques

1. [BAC05] J.P. Bachellerie, J. Cavallé
Les ARN sur tous les fronts.
Pour la Science, Dossier n°46 « Génome humain et médecine », janvier-mars
2005, p.52-57.

2. [BUT92] J.E. Butler, L. Ni, R. Nessler, K.S. Joshi, M. Suter, B. Rosenberg, J. Chang, W.R. Brown and L.A. Cantarero
The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene.
J. Immunol. Methods 150 (1992) 77-90.
3. [COL97] A.F. Collings, F. Caruso
Biosensors : recent advances
Rep. Prog. Phys. 60 (1997) 1397–1445.
4. [DAV94] J. Davies, C. J. Roberts, A.C. Dawkes, J. Sefton, J.C. Edwards, T.O. Glasbey, A.G. Haymes, M.C. Davies, D.E. Jackson, M. Lomas, K.M. Shakesheff, S.J.B. Tendler, M.J. Wilkins, P.M. Williams
Use of Scanning Probe Microscopy and Surface Plasmon Resonance as Analytical Tools in the Study of Antibody-Coated Microtiter Wells.
Langmuir 10 (1994) 2654-2661.
5. [DEV05] F. Devaux, C. Jacq, P. Marc
Les puces à ADN : vers une nouvelle biologie
Pour la Science, Dossier n°46 « Génome humain et médecine », janvier-mars 2005, p.22-27.
6. [DUF05] I. Dufour, C. Bergaud
Capteurs à microstructures mobiles,
dans « Microcapteurs chimiques : applications en milieu gazeux »
Ed. Hermès, Traité EGEM, Série Microsystèmes, à paraître.
7. [DUP04] A. Dupont-Filliard, M. Billon, T. Livache, S. Guillerez
Biotin/avidin system for the generation of fully renewable DNA sensor based on biotinylated polypyrrole film.
Analytica Chimica Acta 515 (2004)271–277.
8. [DUS95] C. Duschl, A.F. Sevin-Landais, H. Vogel
Surface engineering: optimization of antigen presentation in self- assembled monolayers.
J. Biophys. 70 (1995) 1985.
9. [FAB03] P. Fabry, J. Fouletier
Microcapteurs chimiques et biologiques : applications en milieu liquide.
Ed. Hermès, Traité EGEM, Série Microsystèmes, 2003, ISBN 2-7462-0743-5.
10. [GEN] <http://www.genetic.ch>
11. [GRA04] D.L. Graham, H.A. Ferreira, P.P. Freitas
Revue : Magnetoresistive-based biosensors and biochips.
TRENDS in Biotechnology 22 n°9 (2004) 455-462.
12. [HOM03] J. Homola
Revue : Present and future of surface plasmon resonance biosensors.
Anal. Bioanal. Chem. (2003) 377 : 528-539.

13. [INS] www.montp.inserm.fr/ifr3/pf/doc/ppt/proteome02.ppt , INSERM.
14. [JAF00] N. Jaffrezic, E. Souteyrand, C. Martelet, S. Cosnier, P. Labbe et C. Pijolat
Les capteurs chimiques, en particulier les chapitres :
Reconnaissance chimique et biochimique, C. Martelet, p.2-15
Généralités sur les biocapteurs, J.M. Kauffmann, p.132-146
Edité par le Club MicroCapteurs Chimiques (CMC2), ISBN 2-907922-51-3.
15. [JOS05] S. Joseph, T.M.A. Gronewold, M.D. Schlensog, C. Olbrich, E. Quandt,
M. Famulok, M. Schirner
Specific targeting of ultrasound contrast agent (USCA) for diagnostic
application: an in vitro feasibility study based on SAW biosensor.
Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 1829-1835.
16. [LAN03] K. Länge, F. Bender, A. Voigt, H. Gao, M. Rapp
A Surface Acoustic Wave Biosensor Concept with Low Flow Cell Volumes
for Label-Free Detection.
Anal. Chem. 75 (2003) 5561-5566.
17. [LEI] Cours de microbiologie en ligne de l'université de Leicester
<http://www-micro.msb.le.ac.uk>
18. [LIP99] R.J. Lipshutz, S.P.A. Fodor, T.R. Gingeras, D.J. Lockhart
Review : High density synthetic oligonucleotide arrays.
Nature America Inc. (<http://genetics.nature.com>), Nature genetics supplement
21 (1999) 20-24.
19. [LOF91] S. Löfas, M. Malmqvist, I. Rönnerberg, E. Stenberg, B. Liedberg, I. Lundström
Bioanalysis with surface plasmon resonance.
Sensors and Actuators B 5 (1991) 79-84.
20. [LOW90] C.R. Lowe, B.F.Y. Yon Hin, D.C. Cullen, S.E. Evans, L.D. Gray Stephens,
P. Maynard
Review : Biosensors.
J. Chromatography A 510 (1990) 347-354.
21. [LU01] H.B. Lu, J. Homola, C.T. Campbell, G.G. Nenninger, S.S. Yee, B.D. Ratner
Protein contact printing for a surface plasmon resonance biosensor with on-
chip referencing.
Sensors and Actuators B 74 (2001) 91-99.
22. [MAD93] M. Madou, M.J. Tierney
Required technology breakthroughs to assume widely accepted biosensors.
Appl. Biochem. Biotech. 41 (1993) 109-128.
23. [MAI04] E. Maillart
Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons
de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires
en temps réel.
Thèse de Doctorat, Université Paris XI Orsay, 30 juin 2004.

24. [MAR02] M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi
Revue : Fiber-optic biosensors - An overview.
Anal. Bioanal. Chem. 372 (2002) 664-682.
25. [MON] www.biochimie.univ-montp2.fr/licence/liaison/surf_plas.htm
Université de Montpellier.
26. [MON04] D.J. Monk, D.R. Walt
Revue : Optical fiber-based biosensors.
Anal. Bioanal. Chem. 379 (2004) 931-945.
27. [MOR92] H. Morgan, D.M. Taylor
A surface plasmon resonance immunosensor based on the streptavidin-biotin complex.
Biosens. Bioelectron. 7 (1992) 405-410.
28. [OUE04] O. Ouerghi, A. Touhami, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, H.B. Ouada, S. Cosnier
Electrodeposited biotinylated polypyrrole as an immobilization method for impedimetric immunosensors.
IEEE Sensors Journal 4:5 (2004) 559-567.
29. [PAD96] B.M. Paddle
Review article : Biosensors for chemical and biological agents of defence interest.
Biosens. Bioelectron. 11 (1996) 1079-1113.
30. [PEL03] P. Peluso, D.S. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, K. Witte, L.S. Jung, P. Wagner, S. Nock
Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays.
Analytical Biochemistry 312 (2003) 113-124.
31. [PEZ04] A. Pezet
Les biopuces se démocratisent.
Usine Nouvelle 2919 – 27 mai 2004 – 62-64.
32. [PYU98] J.C. Pyun, H. Beutel, J.U. Meyer, H.H. Ruf
Development of a biosensor for E. coli based on a flexural plate wave (FPW) transducer.
Biosensors & Bioelectronics 13 (1998) 839-845.
33. [REN05] B. Renberg, I. Shiroyama, T. Engfeldt, P.A. Nygren, A.E. Karlström
Affibody protein capture microarrays: Synthesis and evaluation of random and directed immobilization of affibody molecules.
Analytical Biochemistry 341 (2005) 334-343.
34. [ROU97] F. Rouessac, A. Rouessac
Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes
3^e édition, Masson, Paris, 1997, ISBN 2-225-85445-9

35. [SAR91] J. Sarrazin, M. Verdaguer
L'oxydoréduction, Concepts et expériences
Ellipses, ISBN 2-7298-9122-6, 1991
36. [SCH87] J.S. Schultz
Biosensors: Fundamentals and Applications
Ed. APF Turner, I. Karube and G.S. Wilson (New York: Oxford University Press) (1987) pp.638–54 & Scientific American August (1991) 48.
37. [SCH95] N. Schmitt
Fonctionnalisation de la microbalance à quartz et fixation covalente d'anticorps : application aux immunocapteurs gravimétriques
Thèse en Sciences de la Vie et de la Santé, Université François Rabelais (Tours) (18/12/1995).
38. [TAI05] C.R. Taitt, G.P. Anderson, F.S. Ligler
Review : Evanescent wave fluorescence biosensors.
Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 2470–2487.
39. [TUR92] I.V. Turko, I.S. Yurkevich and V.L. Chashchin
Oriented immunoglobulin G layer onto the Langmuir-Blodgett films of protein A.
Thin Solid Films 210/211 (1992) 710-712.
40. [WEI03] J. Wei, Y. Mu, D. Song, X. Fang, X. Liu, L. Bu, H. Zhang, G. Zhang, J. Ding, W. Wang, Q. Jin, G. Luo
A novel sandwich immunosensing method for measuring cardiac troponin I in sera.
Analytical Biochemistry 321 (2003) 209-216.
41. [YE04] L. Ye, K. Haupt
Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery.
Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 1887-1897.
42. [ZIE04] C. Ziegler
Cantilever-based biosensors.
Anal. Bioanal. Chem. 379 (2004) 946-959.

2. De l'étude de la propagation de l'onde acoustique...

Nous avons vu que plusieurs types d'ondes acoustiques pouvaient être générées par un dispositif planaire. L'étude de ces structures et des mécanismes d'interaction mis en jeu lors des détections constitue le cœur de nos travaux de recherche. Après quelques éléments généraux sur le dispositif de détection étudié, nous nous intéresserons rapidement aux ondes de Rayleigh ou communément SAW pour Surface Acoustic Wave, puis aux modes de plaque transverses horizontaux (SH-APM pour Shear Horizontal Acoustic Plate Mode). Les études et résultats théoriques et expérimentaux sur ces dispositifs nous ont amenés à la conclusion que la sensibilité du capteur était largement liée à la densité d'énergie élastique présente au voisinage de l'interface avec la couche réceptrice, par rapport à la quantité totale d'énergie dans la structure. En tenant compte de ces éléments et des contraintes technologiques de fabrication, nous avons démarré l'étude des ondes de Love (ou SH-SAW pour Shear Horizontal Surface Acoustic Wave), sur lesquelles nous nous focaliserons ensuite et dans les chapitres suivants. Des éléments concernant des améliorations envisagées pour ces dispositifs seront aussi présentés, notamment au niveau de la géométrie des électrodes interdigitées et de la nature des matériaux assurant la propagation de l'onde.

1 Les bases du dispositif de détection et de son étude

1.1 Le principe du détecteur

Le schéma du principe de base du détecteur à ondes acoustiques ou élastiques a été présenté au chapitre précédent (cf. Figure 1. 13). Ainsi, l'application d'un signal électrique sinusoïdal aux bornes d'électrodes interdigitées (IDT) permet, par effet piézoélectrique inverse, de générer des compressions et dilatations mécaniques dans le substrat, qui, pour certaines fréquences bien identifiées, sont constructives et peuvent ainsi se propager le long du substrat. Un IDT déposé plus loin permet de convertir de nouveau en signal électrique cette onde mécanique au cours de son passage. Sur le chemin acoustique (entre les IDTs) est déposée la couche réceptrice, destinée à retenir spécifiquement l'espèce cible. Il en résulte des modifications des caractéristiques physico-chimiques de la couche (variations de masse, d'épaisseur, de comportement visco-élastique, ...), qui agissent sur la propagation de l'onde, notamment sur sa vitesse de phase, parfois son atténuation. En plaçant la ligne à retard dans un montage oscillateur, toute variation de la vitesse de phase de l'onde peut être mesurée avec une grande précision par une variation de la fréquence d'oscillation.

Ainsi, la sensibilité globale du capteur résulte de trois sensibilités partielles, résultant de la décomposition du biocapteur selon la structure représentée en début du chapitre précédent (cf. Figure 1. 1) :

- La première correspond à l'affinité de la couche réceptrice vis-à-vis de l'espèce cible.
- La seconde est déterminée par la nature et la valeur respective des différentes modifications physico-chimiques susceptibles de se produire au niveau de la couche réceptrice lors de l'immobilisation du composé : variation de masse, d'épaisseur, modification du comportement visco-élastique, ...etc.

- La troisième est liée à la sensibilité du dispositif à ondes acoustiques vis-à-vis d'une variation de chacun des paramètres de la couche réceptrice. Cette sensibilité dépend notamment de la géométrie des structures et de la nature des ondes utilisées.

1.2 La sensibilité du dispositif à ondes acoustiques

Le dispositif à ondes acoustiques est avant tout sensible à l'effet de masse, ce qui lui procure un large spectre d'applications, contrairement à un autre dispositif qui nécessiterait la variation d'un paramètre bien spécifique, comme l'indice optique typiquement dans le cas d'une fibre optique. Ainsi, toute immobilisation de matière se traduit par une variation de masse, éventuellement accompagnée de la variation d'autres paramètres. Cet effet de masse est mis en jeu, de façon souvent prépondérante, dans un grand nombre de cas de détection utilisant des dispositifs à ondes acoustiques. Aussi le paramètre usuellement abordé pour qualifier et comparer entre elles ces structures est la « sensibilité à l'effet de masse », encore appelée fréquemment sensibilité gravimétrique (le terme de sensibilité inertielle serait mieux adapté, s'agissant d'un effet de masse). Une définition retenue par la plupart des équipes travaillant sur les capteurs à ondes acoustiques provient sans doute de l'usage des microbalances à quartz pour mesurer l'épaisseur de dépôts effectués en surface :

$$S_{mv} = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{1}{b \cdot \rho} \quad \text{où} \quad \Delta V = V(b) - V_0$$

V_0 et $V(b)$ étant les vitesses de phase de l'onde acoustique, pour le dispositif respectivement sans et avec une couche déposée en surface, b et ρ étant respectivement l'épaisseur et la masse volumique de cette couche, la quantité $b \cdot \rho$ représentant la masse surfacique. Ainsi, une sensibilité maximale correspond à un point d'inflexion de la courbe représentant cette sensibilité en fonction de b .

Cependant, cette définition ne reflète pas directement la sensibilité du dispositif utilisé en tant que capteur chimique, où l'on n'assiste pas nécessairement à un pur « dépôt » de matière à partir d'un dispositif nu, mais plutôt à une modification des paramètres d'un dépôt existant au départ, constitué par la couche réceptrice. Aussi préférons-nous l'utilisation pour la sensibilité à l'effet de masse la définition suivante :

$$S_{mv} = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{1}{\Delta m} \quad \text{où} \quad \Delta V = V(m + \Delta m) - V_0$$

V_0 et $V(m + \Delta m)$ étant les vitesses de phase de l'onde acoustique, pour le dispositif avec une couche réceptrice de masse surfacique respectivement m et $m + \Delta m$. Dans le cas de la détection d'une vapeur, la variation de masse surfacique est généralement modélisée en première approximation par une variation $\Delta \rho$ de la masse volumique ρ de la couche réceptrice, auquel cas $\Delta m = b \cdot \Delta \rho$, b étant l'épaisseur de la couche, et $V(m + \Delta m) = V(\rho + \Delta \rho)$. Dans le cas d'une détection de type immunologique, il est vraisemblable qu'un modèle plus proche de la réalité correspondrait à une variation Δb de l'épaisseur de cette couche. Cependant, quelques calculs ont montré un comportement identique selon que l'on considère une variation d'épaisseur ou de masse volumique. Aussi considèrerons-nous par la suite uniquement une variation de ρ pour quantifier l'effet de masse, avec une variation suffisamment importante, typiquement $\Delta \rho / \rho = 5\%$, pour limiter les problèmes de précision liés aux arrondis dans les calculs numériques.

De plus, cette définition présente l'avantage d'être généralisable à l'étude de la sensibilité à d'autres paramètres qu'une variation de masse surfacique. Ainsi, la sensibilité relative de la vitesse V à la variation d'un paramètre X quelconque s'exprimerait :

$$S_{xv} = \frac{\Delta V}{V(x)} \frac{1}{\Delta x} \quad \text{où} \quad \Delta V = V(x + \Delta x) - V(x)$$

$V(x)$ et $V(x+\Delta x)$ étant les vitesses de phase de l'onde acoustique, pour un dispositif donné (quelle que soit sa structure, avec ou sans couche réceptrice par exemple), lorsque le paramètre X vaut respectivement x et $x+\Delta x$.

Avec cette dernière définition de S_{mv} , généralisée à S_{xv} , une sensibilité maximale correspond simplement à un maximum sur la courbe représentant cette sensibilité en fonction de n'importe quel paramètre de la structure.

1.3 Caractéristiques fréquentielles et effet d'une détection

Une courbe caractéristique d'un dispositif à onde acoustique à deux ports est la représentation de sa réponse en transmission, en gain et en phase, en fonction de la fréquence. Ainsi, un analyseur de réseau permet de mesurer ce paramètre, noté S_{21} . Sur la figure suivante est représentée une courbe de réponse typique, centrée autour de la fréquence de résonance. On retrouve la fonction de transfert T_{IDT} et la bande passante à 3 dB $\Delta f_{3dB}/f_0$ d'un dispositif classique, de la forme [DIE74] :

$$T_{IDT}(f) \propto \frac{\sin(x)}{x} \quad \text{avec} \quad x \approx N \cdot \frac{\pi}{2} \cdot \frac{f - f_0}{f_0} \quad \text{et} \quad \frac{\Delta f_{3dB}}{f_0} \approx \frac{1,77}{N}$$

où f_0 est la fréquence de synchronisme, f la fréquence et N le nombre d'électrodes interdigitées.

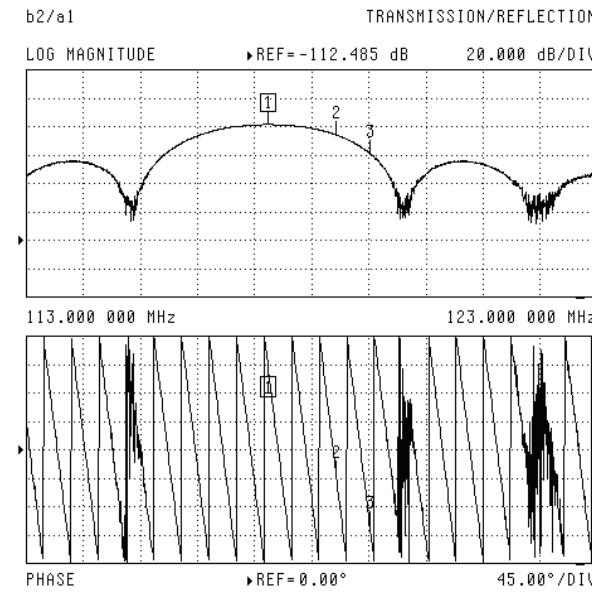


Figure 2. 1 : Réponse fréquentielle d'une ligne à retard (S_{21} en gain et en phase).

Lors d'une détection, une diminution de vitesse de phase de l'onde acoustique, due à un effet de masse typiquement, va se traduire par un retard de phase plus important, soit par un décalage vers le bas de la courbe de phase, associé à un décalage vers les basses fréquences du lobe de gain (cf. Figure 2. 1 et Figure 2. 2). Un suivi à l'analyseur de réseau

pourrait permettre de quantifier de telles variations de phase, en ayant la possibilité de suivre l'allure globale du spectre en fréquence, et notamment les pertes d'insertion du dispositif, susceptibles de varier aussi. Mais la résolution d'une telle mesure demeure limitée et n'est pas compatible avec la détection de faibles quantités ou concentrations d'espèces cibles.

En plaçant la ligne à retard dans un montage oscillateur, toute variation de la vitesse de phase de l'onde, ou déphasage $\Delta\varphi$, va pouvoir être mesurée avec une grande précision par une variation de la fréquence d'oscillation Δf , comme représenté sur le schéma qui suit.

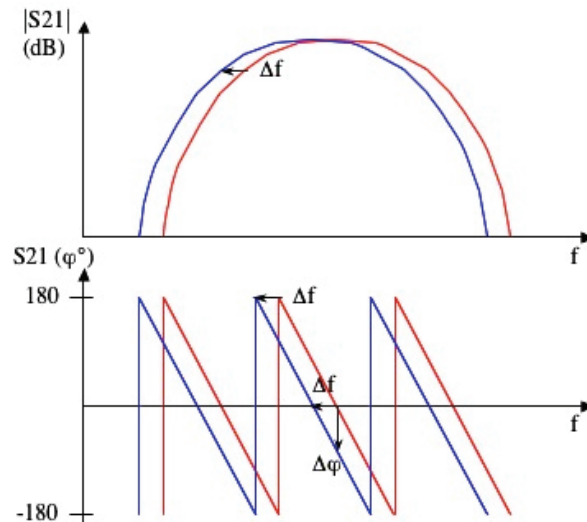


Figure 2. 2 : Représentation de la variation de la réponse en transmission lors d'une détection.

En effet, la ligne à retard étant placée dans la boucle de rétroaction d'un amplificateur permettant de compenser les pertes d'insertion, une oscillation va apparaître, à une fréquence déterminée par la condition de phase. En cas de détection, si les pertes n'augmentent pas ou peu de sorte à rester compensées, le système va continuer à osciller, sur un point équiphase, donc à une fréquence légèrement plus petite. Une bonne stabilité du montage oscillateur sera donc déterminante pour obtenir un bon seuil de détection du capteur. On peut noter de plus que, à variation de phase $\Delta\varphi$ égale, la variation de fréquence Δf de l'oscillateur, et donc la sensibilité du capteur, sera d'autant plus grande que la pente de la phase en fonction de la fréquence, soit $d\varphi/df$, est faible. En contre-partie, la stabilité de l'oscillateur, et donc le seuil de détection, sera diminuée. Un compromis est donc à réaliser à ce niveau, en fonction de l'application visée (détection de traces ou non) et de son environnement, pouvant perturber dans certains cas la ligne de base de façon prépondérante par rapport à la stabilité intrinsèque de l'oscillateur, comme c'est le cas souvent en milieu liquide (cf. chapitre 4).

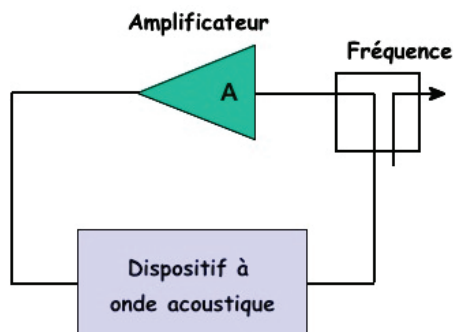


Figure 2. 3 : Schéma de principe du montage oscillateur.

1.4 Caractéristiques temporelles

Il est souvent intéressant d'analyser la réponse impulsionnelle d'une ligne à retard dans le domaine temporel. Le schéma suivant représente symboliquement le paquet d'onde émis à un instant $t = 0$ par les électrodes d'entrée, de même largeur L que la structure interdigitée d'émission. Si l'on regarde l'énergie arrivant au niveau des électrodes de sortie, elle commence à augmenter lorsque le paquet d'onde a parcouru la distance ℓ séparant les deux structures interdigitées, soit à un temps $\theta_R = \ell/v_R$. Cette énergie augmente progressivement jusqu'à un maximum qui se produit lorsque le paquet d'onde est exactement sous la structure de réception, identique à celle d'émission, soit après une durée supplémentaire $L/v_R = (N-1)/(2 \cdot f_0)$. Puis l'énergie diminue de nouveau tandis que le paquet d'onde continue d'avancer.

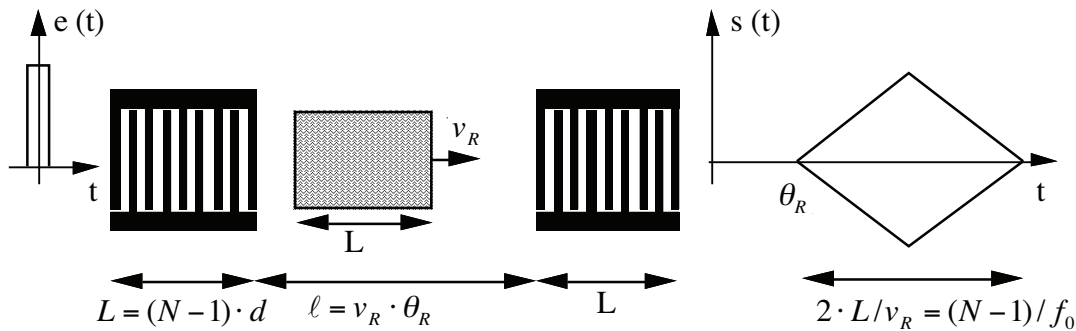


Figure 2. 4 : Réponse impulsionnelle d'une ligne à retard à deux transducteurs identiques.

Ce principe correspond à un cas idéal. En pratique, des réflexions se produisent, sur les structures interdigitées et sur les bords du substrat. Il en résulte une diminution du pic acoustique principal qui vient d'être décrit, et l'apparition de pics parasites, à des instants différents selon les distances parcourues avant d'être au niveau de la structure interdigitée de sortie. Ainsi, une réponse temporelle relevée à l'analyseur de réseau, qui effectue une transformée de Fourier inverse de la réponse fréquentielle, montre le pic principal repéré par le marqueur 1, à $t_1 = 1,25 \mu\text{s}$, et un pic parasite, repéré par le marqueur 3, à $5,30 \mu\text{s}$. On peut notamment constater l'absence de « triple écho », qui correspondrait à la fraction d'onde réfléchi par la sortie puis de nouveau par l'entrée, et dont le maximum se produirait à un instant égal à $3t_1 = 3,75 \mu\text{s}$. Aussi le pic parasite présent est-il lié à des réflexions sur les bords du substrat. Ce type de réflexion peut être fortement atténué par des astuces technologiques, comme une taille en biseau des extrémités du substrat ou le dépôt d'un matériau absorbant acoustique.

Le pic repéré par le marqueur 2, proche de $t = 0$, correspond à la propagation d'énergie sous une forme électromagnétique. Un pic important à ce niveau est typiquement lié à une mauvaise configuration de la masse électrique au niveau du dispositif et/ou de la cellule de test. En plus de précautions à ce niveau, il est préférable, et parfois indispensable, compte-tenu de la symétrie électrique du transducteur, de l'attaquer en différentiel afin de réduire le rayonnement électromagnétique. On utilisera pour cela des « baluns », ou transformateurs de gain unitaire à point milieu. Nous reviendrons sur ce point lors des études en milieu liquide, dans le chapitre suivant.

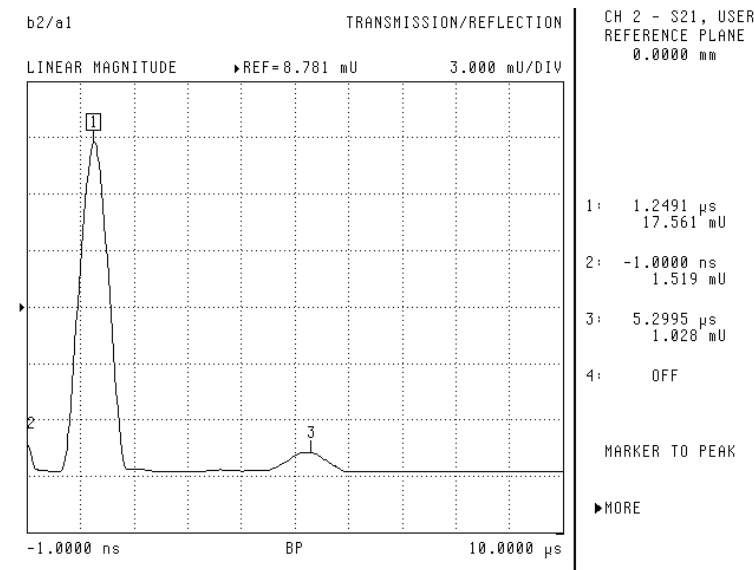


Figure 2. 5 : Réponse temporelle d'une ligne à retard obtenue à l'analyseur de réseau par transformée de Fourier inverse de la réponse fréquentielle (S21)
 Quartz coupe AT, $\lambda = 40 \mu\text{m}$, onde SH, $F_0 = 115 \text{ MHz}$, guide de surface SiO_2 $4,6 \mu\text{m}$.

1.5 Influence de la géométrie des électrodes

L'étude de la géométrie des électrodes a fait l'objet de nombreuses publications au cours des trente dernières années, en vue d'obtenir des dispositifs toujours plus performants pour des applications de télécommunications notamment. Une étude bibliographique et une synthèse sur l'influence de la géométrie des électrodes et les électrodes unidirectionnelles, en vue d'applications à la détection, sont exposées en [LEH97]. Nous en reprenons ici les principaux éléments, en nous limitant à une description qualitative permettant de montrer les intérêts et inconvénients des principales structures, en vue de retenir des voies d'études qui permettraient d'améliorer nos capteurs.

1.5.1 Electrodes interdigitées simples

La géométrie la plus simple est celle représentée sur la Figure 2. 6. a), avec des électrodes alternativement reliées aux deux potentiels de part et d'autre de la structure (RF+ et référence, ou RF+ et RF- en différentiel). Chaque paire de doigts émet une onde élastique. A la fréquence de synchronisme, les ondes émises par l'ensemble des paires de doigts se superposent de façon cohérente et donnent naissance à une onde se propageant dans le matériau (en volume ou en surface selon le cas).

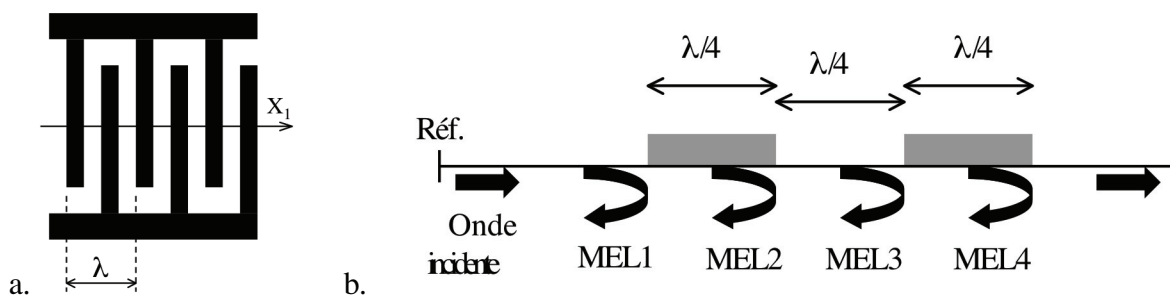


Figure 2. 6 : a) Schéma d'électrodes interdigitées simples,
 b) illustration vue en coupe des réflexions MEL sur chaque bord d'électrode.

D'un point de vue électrique, la structure présente un schéma équivalent, au voisinage de la fréquence de synchronisme, représenté sur la figure ci-dessous, où $Y_s = 1/R_s$ représente les pertes ohmiques des électrodes, C_t la capacité électrostatique (ou statique), constituée des capacités en parallèle présentées par les électrodes interdigitées et qui dépend du taux de métallisation, $Y_a = G_a(\omega) + jB_a(\omega)$ l'impédance de rayonnement acoustique, avec B_a tendant vers l'infini au voisinage de ω_0 [FEL86].

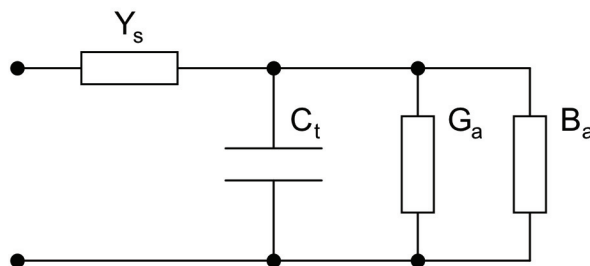


Figure 2. 7 : Circuit équivalent d'un transducteur interdigité, configuration parallèle.

D'un point de vue mécanique, du fait de la symétrie des électrodes, deux paquets d'ondes sont émis dans les deux sens de propagation (X_1 positif et négatif), de façon symétrique ou non selon les propriétés de symétrie cristallographique du matériau supportant la propagation [HOU91, DEJ94]. Ainsi, si l'on considère une ligne à retard constituée de deux électrodes de ce type, environ la moitié seulement de l'énergie se dirige vers la structure de réception.

De plus, si l'on considère la structure de réception de l'onde, chaque électrode, en raison de sa masse et de son impédance électrique, perturbe mécaniquement et piézoélectriquement la surface du substrat. Ainsi, à la limite de chacune, c'est-à-dire à chaque rupture d'impédance acoustique, il se crée des réflexions acoustiques, appelées réflexions MEL (« Mass / Electrical Loading ») [HAN76, MOR85] (cf. Figure 2. 6. b). La réflectivité MEL totale d'un transducteur est la somme de ces réflexions partielles.

Dans une structure de géométrie simple en $\lambda/4$ comme celle considérée ici, la situation est celle représentée sur la figure précédente, à droite. Les réflexions MEL1 et MEL3 sont en phase, puisque le coefficient de réflexion est le même pour ces deux ondes et que le chemin parcouru par MEL3 est celui parcouru par MEL1 augmenté d'une longueur d'onde λ . Il en est de même pour MEL2 et MEL4. De plus, MEL1 et MEL2, avec une différence de chemin parcouru égale à $\lambda/2$, mais avec des coefficients de réflexion opposés du fait d'un passage du substrat à l'électrode pour MEL1 et inversement pour MEL2, sont aussi en phase finalement. Ainsi, les quatre ondes réfléchies se superposent de façon constructive, et la totalité du transducteur génère une onde réfléchie importante, d'autant plus que le nombre de doigts est élevé et que le coefficient de couplage électromécanique du matériau est grand. Ce phénomène est à l'origine du triple écho évoqué dans le paragraphe précédent, parfaitement identifiable sur la réponse temporelle, et se traduit par l'apparition de distorsion sur la réponse fréquentielle.

1.5.2 Electrodes interdigitées doubles

Une évolution simple de la géométrie précédente et permettant d'améliorer fortement les résultats obtenus, consiste à dédoubler chaque doigt métallique, comme représenté sur la figure suivante. Par analogie avec le paragraphe précédent, la différence de chemin acoustique entre MEL1 et MEL3, ou entre MEL2 et MEL4, est égale à $\lambda/2$, avec le même coefficient de réflexion. Aussi ces ondes provenant de réflexions internes dues à la géométrie des électrodes

s'annulent deux à deux. Notons que cette annulation des réflexions concerne uniquement les réflexions mécaniques dues aux passages surface métallisée – surface libre et inversement. Au comportement global de la structure s'ajoute bien évidemment le comportement acousto-électrique de chaque transducteur évoqué précédemment.

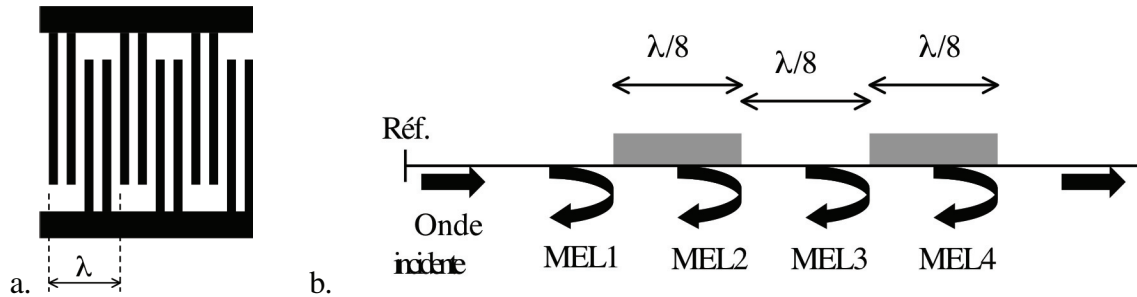


Figure 2. 8 : a) Schéma d'électrodes interdigitées doubles,
b) illustration des réflexions MEL sur chaque électrode vue en coupe.

1.5.3 Electrodes interdigitées unidirectionnelles

Si la structure en doubles doigts permet d'annuler les réflexions internes se produisant aux ruptures d'impédances acoustiques, certaines géométries judicieuses permettent d'utiliser ces réflexions pour conférer au transducteur un comportement unidirectionnel, visant à éviter les pertes d'énergie sur les extrémités des structures.

Afin d'expliquer qualitativement le fonctionnement interne d'une structure de ce type, rencontrée communément sous le symbole SPUDT pour « Single Phase UniDirectional Transducer », et qui comporte différentes variantes, nous introduirons les notions de centres de transduction et de réflexion [WRI85].

On appelle centres de transduction (CT) les endroits pour lesquels l'onde réfléchie et l'onde incidente sont en phase. Pour un transducteur simple en $\lambda/4$, les CT coïncident avec le centre des électrodes, ou des espaces entre électrodes. Pour une structure en doubles doigts, les CT correspondent typiquement aux centres des espaces situés entre deux électrodes de même polarité.

On appelle centres de réflexion (CR) les endroits du transducteur pour lesquels le coefficient de réflexion acoustique local est imaginaire pur. Une structure à simples doigts a ses CR situés au centre des électrodes, tandis qu'une structure à doubles doigts n'a pas de CR.

Ces deux notions, difficilement représentables de manière concrète dans le cas général, découlent de la théorie dite « COM » pour « Coupling-Of-Mode Theory » [THO86], qui permet de relier onde incidente, onde réfléchie et grandeurs électriques par des équations différentielles.

Des études ont montré que l'on pouvait atteindre une directivité maximum du transducteur, si les CT et CR sont espacés de $\pm \lambda/8 + k \lambda/2$. Ce résultat peut être illustré à l'aide du schéma suivant.

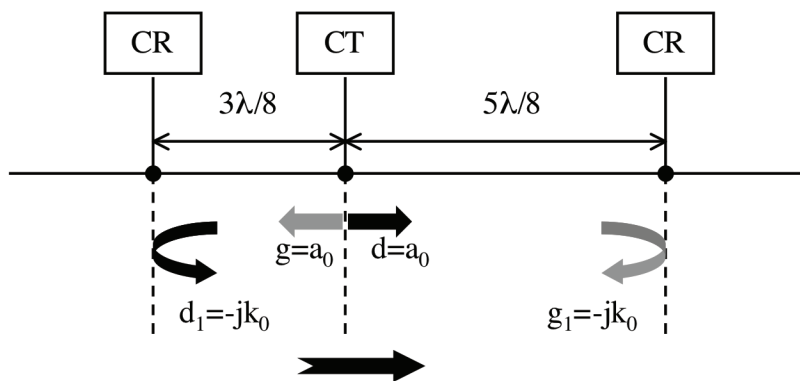


Figure 2. 9 : Illustration des centres de transduction et de réflexion permettant une directivité maximale.

Sur ce schéma, d et g représentent les ondes acoustiques créées respectivement vers la droite et vers la gauche par les CT, d₁ et g₁ les ondes réfléchies sur les deux CR adjacents. Lorsque d₁ arrive au CT, sa différence de phase avec d est notée Δφ_d, celle de g₁ avec g est notée Δφ_g, et l'on a :

$$\Delta\varphi_d = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{3\lambda}{8} \cdot 2 \right) + \frac{\pi}{2} = 2\pi \quad \text{et} \quad \Delta\varphi_g = \frac{2\pi}{\lambda} \left(\frac{5\lambda}{8} \cdot 2 \right) + \frac{\pi}{2} = 3\pi$$

Le déphasage de π/2 est dû au coefficient de réflexion imaginaire sur le CR (-jk₀). Ainsi, d et d₁ sont en phase, tandis que g et g₁ sont en opposition de phase. Un transducteur comportant une telle répartition de ses CT et CR est donc globalement unidirectionnel vers la droite. On peut alors diminuer simultanément les pertes d'insertion et le niveau de triple écho [HAR89, WRI85]. Parmi les géométries rencontrées, deux motifs de base sont représentés sur la figure suivante : les géométries de type « Electrode Width Control » ou EWC, et « Distributed Acoustic Reflection Transducer » ou DART.

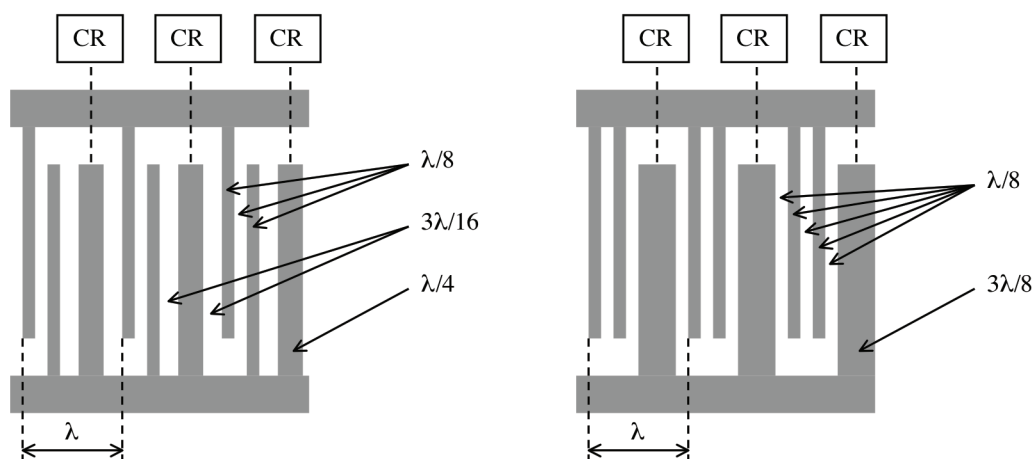


Figure 2. 10 : Géométries de transducteurs unidirectionnels de type EWC (à gauche) et de type DART (à droite).

Une difficulté réside cependant dans la proposition de géométries permettant cette unidirectionnalité, en contrôlant simultanément la fonction de transfert (amplitude et phase) et les réflexions dues aux problèmes d'adaptation, sur la structure globale. Les années 90 ont vu nombre publications dans ce domaine, pour la réalisation de filtres et résonateurs, avec des géométries très variées permettant d'obtenir des résultats plus ou moins intéressants, de façon plus ou moins délicate par rapport à la précision technologique. Des investigations sur ce thème sont envisagées afin d'obtenir des structures présentant de faibles pertes d'insertion,

qui faciliteraient de façon très appréciable et parfois indispensable le fonctionnement de nos capteurs, en milieu liquide en particulier.

2 Les ondes étudiées

Dans les dispositifs plans auxquels nous nous intéressons, chaque motif interdigité est susceptible de générer 3 ondes de volume et 1 onde de surface (Rayleigh), chacune avec un coefficient de couplage électro-mécanique (noté souvent K^2 ou emc) qui lui est propre pour un matériau et une orientation cristallographique donnée. Pour chaque onde, il pourra y avoir propagation effective seulement si les ondes émises par tous les motifs interdigités de la structure interdigitée (IDT) d'émission sont en phase. Il y aura ainsi une seule fréquence, dite de synchronisme, ou de résonance, qui va correspondre à la propagation effective de l'onde de Rayleigh. Pour les ondes de volume, il n'y aura propagation constructive qu'au-delà d'une fréquence dite de coupure, et à chaque fréquence sera associé un angle d'émission par rapport à la surface du dispositif.

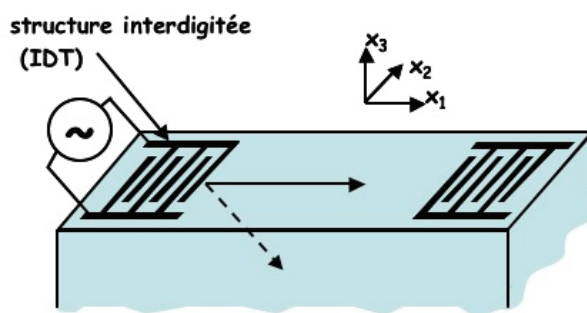


Figure 2. 11 : Schéma de principe d'émission d'ondes acoustiques avec un dispositif planaire.

Lors de l'étude des différents dispositifs, nous négligerons les effets « de bord » dans la direction X_2 , c'est-à-dire que nous considérerons le substrat et les IDTs infinis dans cette direction.

2.1 Les ondes de Rayleigh (SAW)

Notre première approche des ondes acoustiques a porté sur les ondes de Rayleigh, communément appelées SAW même si ce terme est susceptible de recouvrir plusieurs types d'ondes de surface, et qui ont fait et font encore l'objet de nombreuses études pour leur utilisation dans des dispositifs commerciaux (lignes à retard, résonateurs, filtres divers à l'aide de structures interdigitées spécifiques). Comme représenté sur la figure suivante, l'onde de Rayleigh est une onde de polarisation elliptique contenue dans le plan sagittal (plan X_1X_3), comprenant donc une composante longitudinale (polarisation ou mouvement des molécules parallèle à l'axe X_1 de propagation globale de l'onde de surface) et une composante transverse verticale (mouvement des molécules suivant X_3). Cette onde est dite « de surface », dans la mesure où l'énergie décroît exponentiellement dans le volume de sorte qu'elle est localisée près de la surface du dispositif, sur une distance de quelques dixièmes de la longueur d'onde λ (périodicité des IDTs).

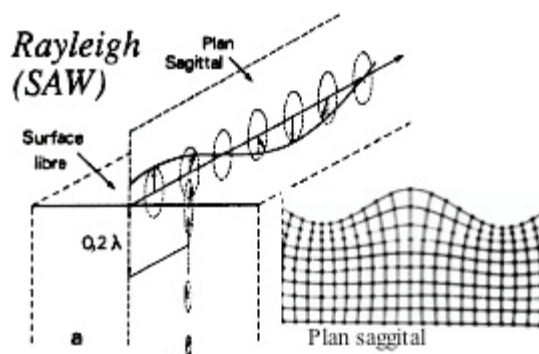


Figure 2.12 : Représentation des déplacements pour une onde de Rayleigh.

Les dispositifs à ondes de Rayleigh ont été étudiés et mis en œuvre pour la détection de composés gazeux, avec de bonnes performances en termes de sensibilité et de seuil de détection [REB92, DEJ94, ZIM02, et références incluses]. Cependant, ils ne sont pas adaptés à la détection en milieu liquide (sauf détection de seuil de type absence/présence éventuellement), à cause de la composante transverse verticale de leur polarisation qui rayonne une grande partie de l'énergie dans le liquide de test qui serait présent en surface. Nous nous sommes alors orientés vers des ondes ne comportant pas de composante verticale dans leur polarisation.

2.2 Les ondes SH-APM

Les ondes de plaque transverses horizontales (SH-APM pour Shear Horizontal Acoustic Plate Mode) nous ont semblé dans un premier temps présenter un certain nombre d'avantages [HOU91, DEJ94, EST99, et références incluses]. En effet, les ondes de volume constructives se propagent avec un certain angle d'émission par rapport à la surface. Si l'on veut pouvoir recevoir cette onde avec l'IDT de réception disposé en surface et du même côté du substrat, il faut considérer des ondes susceptibles de se propager par réflexions successives entre deux faces parallèles, donc dans une « plaque ». Le substrat de type quartz que nous connaissions présentait l'intérêt de pouvoir générer des ondes transverses horizontales (TH) pures ; en effet, pour certaines orientations cristallographiques (plan sagittal perpendiculaire à l'axe cristallographique du quartz X, d'ordre 2), les coefficients de couplage des ondes longitudinale et transverse verticale sont nuls simultanément. De plus, l'onde TH se réfléchit sur une interface en conservant sa polarisation, contrairement aux ondes longitudinale et transverse verticale.

Les études sur la propagation des ondes TH entre les deux plans parallèles d'un substrat ont montré la possibilité de deux types de propagation, selon la distance séparant les deux plans de réflexions par rapport à la longueur d'onde λ . Dans une plaque épaisse, les ondes sont dites « guidées », et seules certaines fréquences ou zones de fréquences permettent la réception d'énergie localisée au niveau de l'IDT de sortie. Dans une plaque mince, les faisceaux d'ondes incidentes et réfléchies entre les deux surfaces sont superposés. Les interférences qui en résultent sont constructives si et seulement si, en faisant l'hypothèse (cas idéal) qu'il n'y a pas de changement de phase à la réflexion sur une face de la plaque, les plans équiphases (perpendiculaires au vecteur d'onde) incidents et réfléchis se coupent au niveau des deux surfaces libres [DEJ94]. On obtient alors, comme dans un guide d'onde, des ondes stationnaires, appelées SH-APM, pour des valeurs de fréquence discrètes f_m , dont l'ordre m correspond au nombre de nœuds dans l'épaisseur de la plaque :

$$f_m = f_c \sqrt{1 + \left(\frac{m \cdot \lambda}{2 \cdot h \cdot C_a} \right)^2} \quad \text{avec} \quad f_c = \frac{C_a}{\lambda} \sqrt{\frac{C_{44}}{\rho}} \quad \text{et} \quad C_a^2 = \frac{C_{66}}{C_{44}} - \left(\frac{C_{46}}{C_{44}} \right)^2$$

où h est l'épaisseur de la plaque, f_c correspond à la fréquence dite « de coupure » à partir de laquelle des ondes TH constructives sont émises et qui correspond au mode $m = 0$, les paramètres C_{ij} sont les constantes de rigidité du matériau constituant la plaque, en tenant compte de son orientation cristallographique, et C_a est un facteur appelé « constante d'anisotropie ».

Un schéma illustrant cette propagation d'ondes SH-APM et un spectre en fréquence en transmission sont représentés respectivement en Figure 2. 13 et Figure 2. 14.

SH-APM

(Shear Horizontal Acoustic Plate Modes)

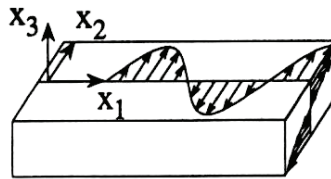


Figure 2. 13 : Représentation schématique des ondes SH-APM, mode 1.

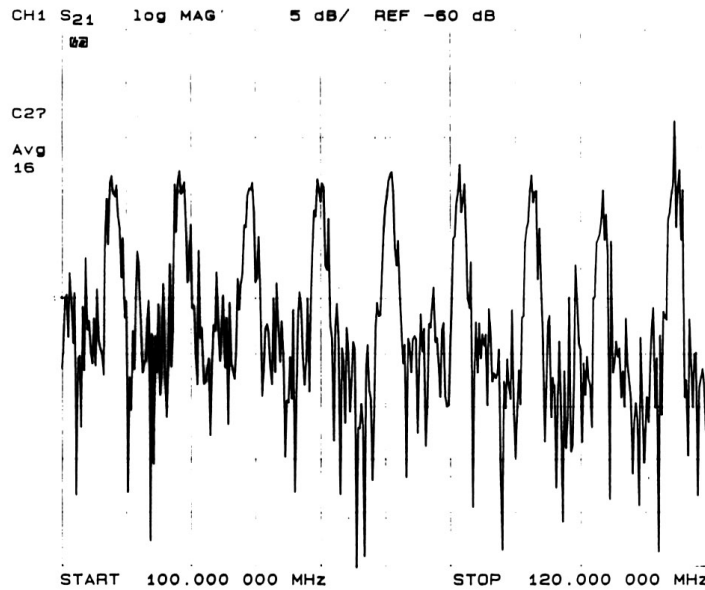


Figure 2. 14 : Réponse fréquentielle en transmission ($|S_{21}|$) d'une ligne SH-APM (quartz coupe BT).

Ces dispositifs, en plus de pouvoir fonctionner plus facilement en milieu liquide du fait de leur polarisation TH, présentent la possibilité d'une seconde interface sensible. On peut ainsi, soit augmenter la sensibilité globale du dispositif en utilisant les deux surfaces sensibles, soit privilégier la surface opposée aux IDTs, ce qui permet un isolement de l'électronique par rapport au milieu liquide de test. Le spectre multimode pouvait laisser envisager une richesse de signaux, éventuellement exploitable, au prix d'une électronique de

conditionnement plus complexe, comportant notamment des filtres adaptables et un déphaseur ajustable en tension, développé spécifiquement, pour limiter le phénomène de saut de mode.

Pour compléter l'approche géométrique originale développée dans un premier temps et pouvoir mieux appréhender d'un point de vue théorique les potentialités de ces dispositifs, une modélisation considérant la propagation de l'onde dans une structure multicouche a été utilisée [AND93, EST99]. Dans cette approche, les équations relatives à la propagation d'ondes dans chaque matériau constituant la structure multicouche sont prises en compte sous la forme d'une matrice pour déterminer des ondes partielles. Puis, les conditions aux interfaces et à l'infini de part et d'autre permettent de ne retenir dans chaque matériau que les combinaisons linéaires de ces ondes partielles susceptibles de se propager effectivement dans la structure globale.

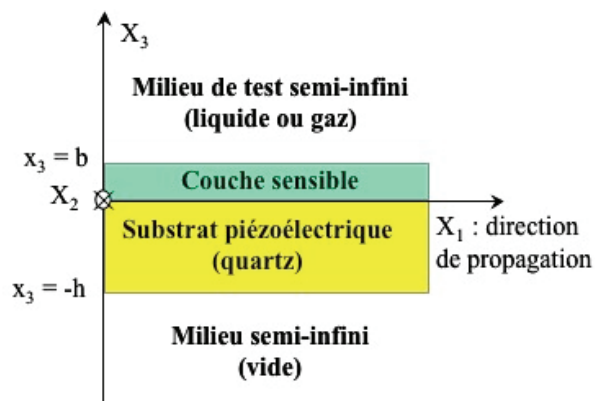


Figure 2. 15 : Structure multicouche modélisant la structure à ondes SH-APM.

Ces travaux ont permis de démontrer que la sensibilité à l'effet de masse de ces dispositifs SH-APM était généralement faible, et ne pourrait dépasser celle des ondes de Rayleigh que pour des plaques très minces, de l'ordre de la longueur d'onde, classiquement quelques dizaines de micromètres). Ces faibles sensibilités, pour des épaisseurs technologiquement réalisables, ont été confirmées expérimentalement, en particulier à l'aide de prototypes réalisés avec le banc de photolithographie directe par faisceau laser qui était disponible au laboratoire IXL [EST99].

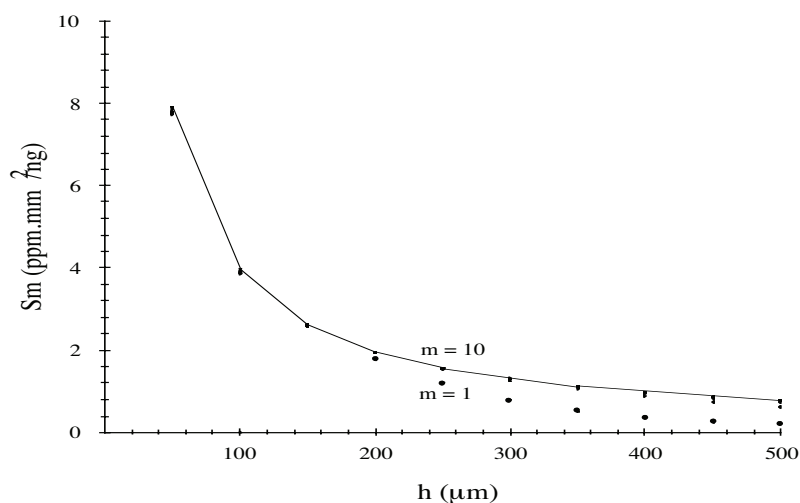


Figure 2. 16 : Influence de l'épaisseur de la plaque sur la sensibilité relative à l'effet de masse (Quartz coupe ST, épaisseur h , $\lambda = 32 \mu\text{m}$, couche sensible CuPC d'épaisseur $0,2 \mu\text{m}$).

2.3 Les ondes de Love (SH-SAW)

Ces travaux nous ont amenés à rechercher une structure qui permettrait, à la fois d'avoir une onde de polarisation TH pour autoriser un fonctionnement en milieu liquide, et de confiner l'énergie sur une faible épaisseur à proximité de l'interface pour obtenir une bonne sensibilité. L'onde SH-SAW (Shear Horizontal Surface Acoustic Wave), ou onde de Love paraissait pouvoir ainsi associer les avantages des deux structures précédentes. Pour que la propagation de cette onde puisse se produire, des IDTs sont déposés sur un substrat orienté de sorte à ne générer que des ondes de polarisation TH pure (notamment avec un plan sagittal perpendiculaire à l'axe cristallographique X du quartz, comme pour les ondes SH-APM) ; puis une couche d'un matériau approprié doit être placée sur la surface du dispositif. Si la vitesse de propagation de l'onde de volume transverse se propageant dans la direction X_1 de ce matériau est inférieure à celle se propageant dans le substrat, alors l'énergie mécanique est couplée et confinée dans cette couche, ainsi appelée « couche guidante », tandis qu'elle décroît exponentiellement dans le substrat.

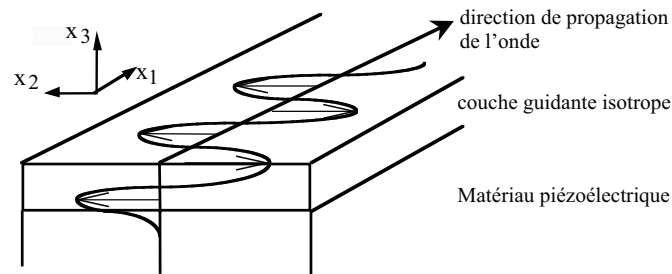


Figure 2. 17 : Vue schématique d'une onde de Love.

L'étude de ces dispositifs, qui offrent à ce jour les meilleurs résultats en terme de sensibilité à l'effet de masse, fait l'objet du paragraphe suivant.

3 Etude des dispositifs à ondes de Love

3.1 Modélisation

Comme pour les ondes SH-APM, l'étude théorique de la propagation des ondes de Love repose sur un modèle multicouche de la structure, comportant le substrat, ici supposé infini (par rapport à la longueur d'onde et à la profondeur de pénétration de l'onde), la couche guidante d'épaisseur h , la couche sensible lorsqu'elle est présente, d'épaisseur notée b , et enfin le milieu de test supposé infini (gaz, liquide). Une structure typique est constituée de quartz d'épaisseur 0,5 mm et de quelques micromètres de SiO_2 .

Dans un premier temps, une étude analytique de la structure en milieu gazeux a pu être menée, notamment en négligeant la piézoélectricité du quartz et les pertes de propagation dans les matériaux [ZIM02], afin de déterminer les équations de dispersion permettant de caractériser la vitesse d'une onde plane transverse horizontale ayant un déplacement de la forme :

$$U_2(x_1, x_3, t) = U_{02} e^{-jk_3 x_3} e^{j(\omega t - kx_1)}$$

avec U_{02} le déplacement en $x_3 = 0$, k le nombre d'onde longitudinal et k_3 le nombre d'onde transverse vertical, qui pourra être différent selon la couche considérée.

La périodicité spatiale sur x_1 imposée par la périodicité des électrodes interdigitées (λ) entraîne :

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{\omega}{V_p}$$

avec V_p la vitesse de phase de l'onde et ω la pulsation angulaire.

Cette étude a été complétée pour tenir compte de la présence d'un milieu liquide adjacent, tout en conservant un grand nombre d'hypothèses simplificatrices. Pour une structure {substrat piézoélectrique / guide / couche sensible / liquide newtonien}, la relation de dispersion suivante a été obtenue [TAM01] :

$$k\chi_b b = -\arctan\left\{\frac{C_{44h}\chi_h}{C_{44b}\chi_b} \tan\left[k\chi_h h - \arctan\left(\frac{C_{44s}\chi_s}{C_{44h}\chi_h}\right)\right]\right\} - \frac{1}{2} \arctan\left(\frac{k_L V_p \eta}{C_{44b}\chi_b}\right)$$

$$\text{avec } \chi_s = C_a \sqrt{1 - \frac{\rho_s V_p^2}{C_a^2 C_{44s}}} \quad C_a = \sqrt{\frac{C_{66}}{C_{44}} - \frac{C_{46}^2}{C_{44}^2}} \quad \chi_{h,b} = \sqrt{\frac{\rho_{h,b} V_p^2}{C_{44h,b}} - 1} \quad k_L = \sqrt{\frac{\omega \rho_L}{2\eta}}$$

avec des indices s pour des paramètres se rapportant au substrat, h pour le guide d'épaisseur h, b pour la couche sensible d'épaisseur b, L pour le liquide, et avec C_{44} les modules de rigidité élastique transverse des matériaux, ρ leurs masses volumiques, η la viscosité du liquide.

Ces études ont mis en évidence des conditions d'existence de l'onde de Love et ont permis d'avoir une approche physique intéressante pour la compréhension de ce mode de propagation, donnant des résultats rapides. Pour aller plus loin dans la modélisation et la simulation des capteurs à ondes de Love, en prenant en compte un plus grand nombre de paramètres des matériaux, une approche numérique a été mise en œuvre.

Une approche analogue à celle utilisée pour l'étude des ondes SH-APM [TAM02] a permis de tenir compte de paramètres comme la piézoélectricité du substrat, les paramètres électriques d'un liquide adjacent (permittivité ϵ_L , conductivité σ), ainsi qu'un comportement viscoélastique du liquide ou de la couche sensible. Ainsi, la résolution analytique considère un liquide de test visqueux, dit newtonien, c'est-à-dire ayant un comportement mécanique purement dissipatif du type amortisseur, modélisé par une relation entre contrainte T_{ij} et déformation S_{kl} :

$$T_{ij} = \eta \frac{\partial S_{kl}}{\partial t}$$

Avec cette résolution numérique, il est possible de considérer un comportement rhéologique maxwellien, associant une contribution élastique sous la forme d'un ressort et d'un amortisseur en série :

$$T_{ij} + \tau \frac{\partial T_{ij}}{\partial t} = \eta \frac{\partial S_{kl}}{\partial t} \quad \text{avec} \quad \tau = \frac{\eta}{\mu_L}$$

Dans ces expressions, η et μ_L sont respectivement la viscosité et le module de rigidité élastique transverse du liquide.

L'approche numérique retenue aujourd'hui comme la plus universelle et la plus prometteuse consiste à modéliser chaque couche de matériau par une matrice de transfert [MAZ05], initialement proposée par W.J. Thomson [THO50], et approfondie par N.A. Haskell [HAS53]. La réappropriation de cette méthode, au sein d'une application logicielle innovante, associée à la mise en œuvre de nouveaux algorithmes de calculs, vise à simuler la propagation des ondes de Love et l'influence de nombreux paramètres de la structure, y compris en tenant compte de modules de pertes, ce qui n'a pas pu être réalisé avec la résolution numérique précédente. Cette application est d'un grand intérêt pour l'exploitation et l'analyse de résultats expérimentaux.

3.2 Résultats

Ces études théoriques ont permis par exemple de mettre en évidence le couplage progressif de l'onde acoustique dans la couche dite « guidante ». Ainsi, la figure suivante représente, en trait foncé, la vitesse de l'onde de Love, qui diminue, depuis une valeur proche de la vitesse de l'onde de volume transverse dans le quartz V_{quartz} pour une couche guidante très mince, à une valeur proche de celle de l'onde de volume transverse dans le matériau guidant V_{guide} si celui-ci a une épaisseur de l'ordre de la longueur d'onde. Ces vitesses sont données respectivement par les expressions :

$$V_{\text{quartz}} = \sqrt{\frac{C_{44\text{quartz}}}{\rho_{\text{quartz}}}} \quad \text{et} \quad V_{\text{guide}} = \sqrt{\frac{\mu_{\text{guide}}}{\rho_{\text{guide}}}}$$

avec C_{44} ou μ (notation rencontrée plus fréquemment pour les matériaux isotropes) les modules de rigidité élastique transverse dans le quartz et le guide, ρ la masse volumique de chaque matériau. Pour des épaisseurs très élevées, des modes de Love d'ordre supérieur peuvent même apparaître, ainsi un second à partir d'une épaisseur de $\lambda/2$, de vitesse supérieure, qui a un comportement analogue au premier en démarrant avec une vitesse proche de celle dans le quartz pour tendre vers celle dans le guide. Cependant, ces modes ne sont pas étudiés actuellement du fait de contraintes technologiques limitant les épaisseurs de guides réalisables.

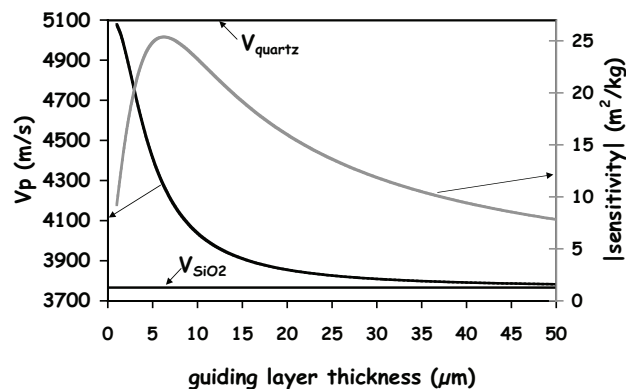


Figure 2. 18 : Vitesse de phase de l'onde de Love et sensibilité à l'effet de masse en fonction de l'épaisseur de couche guidante (quartz AT, $\lambda = 40 \mu\text{m}$, SiO_2 , couche sensible PMMA) [ZIM04a].

Sur cette figure est superposée, en trait plus clair, la sensibilité à l'effet de masse en fonction de l'épaisseur du guide d'onde. On voit que cette sensibilité est maximale pour une épaisseur donnée, proche du point d'inflexion de la vitesse. Les courbes représentées sur la figure suivante montrent que cette épaisseur optimale est fonction de h/λ .

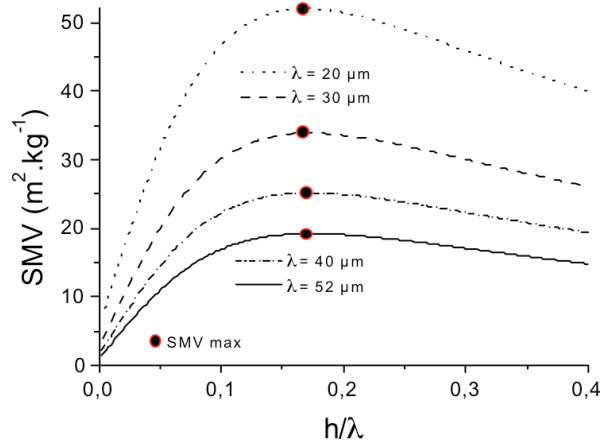


Figure 2. 19 : Influence de l'épaisseur du guide normalisée par rapport à la longueur d'onde sur la sensibilité à l'effet de masse (quartz, $\lambda = 40 \text{ nm}$, SiO_2 , milieu de test liquide de viscosité $\eta = 3 \text{ cP}$, masse volumique $\rho = 1000 \text{ kg/m}^3$).

La courbe ci-dessous met en évidence l'influence de l'épaisseur du guide, mais aussi de l'orientation cristallographique du quartz, sur cette sensibilité du dispositif à l'effet de masse.

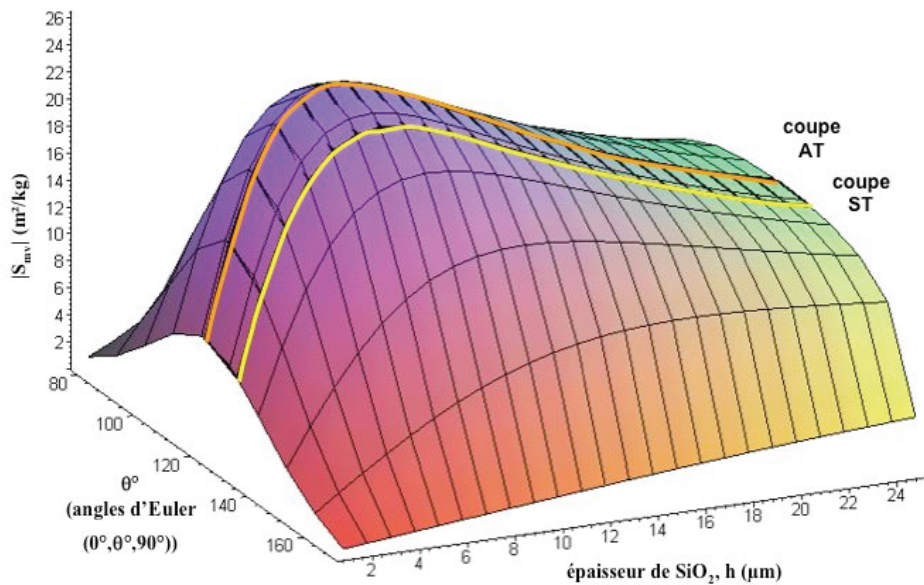


Figure 2. 20 : Sensibilité à l'effet de masse (quartz AT, $\lambda = 40 \text{ nm}$, SiO_2 , Couche sensible polymère PMMA 50 nm).

Concernant l'influence du liquide, les résultats obtenus à ce jour sont ceux calculés par la première résolution numérique. Nous avons ainsi pu retrouver en particulier l'influence de la viscosité η d'un liquide viscoélastique, ainsi que celles de la conductivité électrique σ et de la permittivité électrique ϵ_L d'un liquide en régime newtonien, représentées sur les figures ci-après [TAM02]. Nous pouvons remarquer en particulier la faible influence des paramètres électriques par rapport aux paramètres mécaniques. Par exemple, la transition d'une eau pure, non conductrice, à une eau fortement conductrice, induirait une diminution de vitesse relative de l'ordre de 18 ppm, tandis qu'une variation de seulement $1 \text{ cP}^{1/2}$ induirait une diminution de l'ordre de 500 ppm. Ces résultats seront cependant à relativiser (cf. chapitre 3, §2). En effet,

d'une part, ils correspondent à un comportement d'un capteur sur un substrat de quartz, faiblement piézoélectrique, d'autre part ils considèrent l'influence des paramètres uniquement sur la propagation de l'onde, tandis que les paramètres électriques pourront également avoir une influence sur la génération et la réception de l'onde au niveau des transducteurs interdigités.

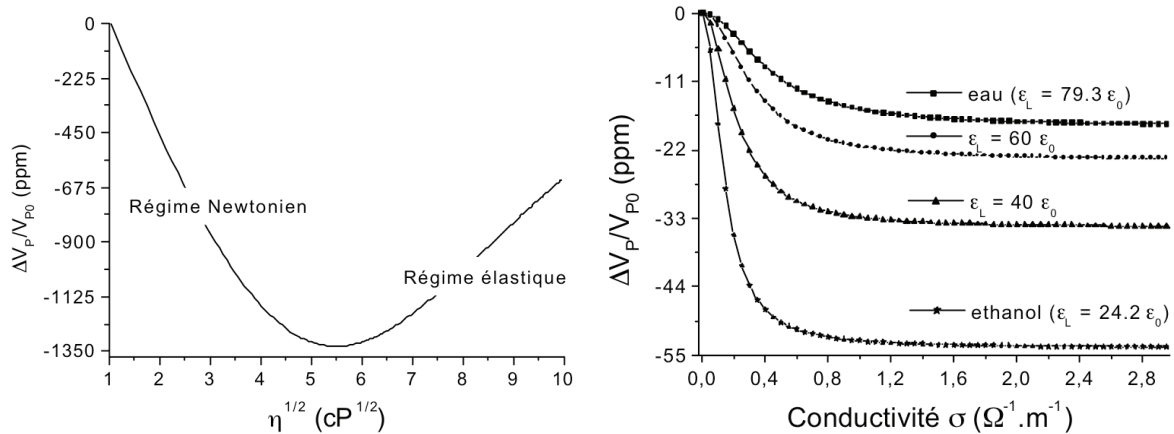


Figure 2. 21 : Influence de la viscosité d'un liquide maxwellien (à gauche) et des paramètres électriques d'un liquide newtonien (à droite) sur la vitesse de l'onde de Love (Quartz ST, $\lambda = 52 \mu\text{m}$, $\text{SiO}_2 6 \mu\text{m}$, liquide de référence eau : $\rho_L = 10^3 \text{ kg/m}^3$, $\eta = 1 \text{ cP}$, sauf éthanol : $\rho_L = 789,3 \text{ kg/m}^3$, $\eta = 1,2 \text{ cP}$).

Enfin, d'autres études ont également permis de vérifier que la sensibilité augmente globalement lorsque les vitesses de l'onde de volume transverse dans le matériau guidant et dans le quartz sont plus éloignées, donc lorsque V_{guide} est plus faible [ZIM04a]. Ces éléments donnent des orientations pour choisir ou imaginer de nouveaux matériaux, qui présenteraient des caractéristiques intéressantes pour la réalisation des capteurs, tant au niveau de la couche guidante que de la couche sensible pour certaines applications, comme illustré sur la figure ci-après.

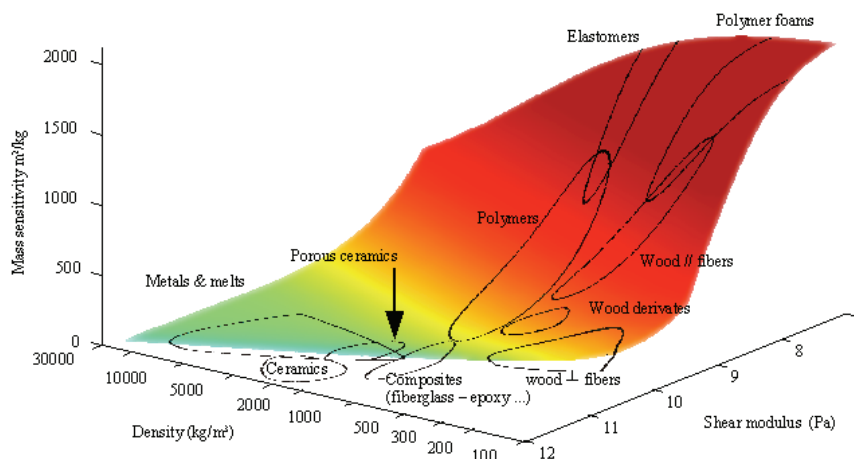


Figure 2. 22 : Représentation en 3D de la sensibilité à l'effet de masse en fonction de la masse volumique et du module d'élasticité transverse du guide [ZIM04a]. Les valeurs de matériaux sont issues de [ASH99].

Ces résultats sont néanmoins à nuancer, dans la mesure où les pertes par propagation dans les matériaux n'ont pas encore été prises en compte, or elles sont typiquement plus

importantes pour les matériaux de plus faible module transverse, qui s'avèreraient les plus intéressants. La prise en compte de ces pertes, outre un travail important de résolution numérique adaptée à un système beaucoup plus complexe, pose le problème de leur modélisation. De nombreux modèles sont proposés dans la littérature, en particulier pour des polymères [FER80, KRE97], chaque modèle pouvant s'appliquer dans des cas précis. De plus, l'aspect fréquentiel est rarement évoqué, et le comportement est généralement sur le matériau volumique et non en couche.

Ces difficultés nous ont d'ailleurs amenés à proposer l'utilisation des dispositifs à ondes acoustiques pour caractériser des matériaux déposés en couche, dans une gamme de fonctionnement haute fréquence [RAZ05].

4 Conclusion

Nous avons ainsi retracé une progression dans nos études théoriques sur les dispositifs à ondes acoustiques. Des ondes de Rayleigh, nous avons été amenés à nous intéresser à la propagation des modes de plaque transverses horizontaux, pour finalement retenir les ondes de Love comme offrant les meilleurs atouts pour la réalisation de microcapteurs en milieu gazeux ou liquide. De bons résultats ont été obtenus en milieu gazeux [ZIM04b], confirmés par une campagne de test récente, avec des concentrations détectées inférieures à 0,1 ppm.

Les résultats obtenus ont permis d'ouvrir de nouvelles voies de recherche sur ces dispositifs, afin d'en améliorer nettement les performances, et d'espérer obtenir également des résultats satisfaisants pour la détection de traces en milieu liquide. Ce dernier constitue un environnement particulièrement contraignant pour le système, comme nous le verrons par la suite.

Parmi ces voies, nous avons mentionné en particulier l'étude de dispositifs unidirectionnels et la recherche de nouveaux matériaux pour guider l'onde acoustique. Sur ce dernier point, une thèse avec nos collègues du Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique (LCOO – CNRS UMR5802 – Université Bordeaux 1), en co-tutelle avec l'IXL, a démarré en décembre 2004. Elle vise la synthèse de matériaux polymères organosiliciés nanostructurés originaux, pour l'élaboration de microsystèmes de détection rapide de biomolécules. Remarquons que ces matériaux, destinés à supporter la propagation de l'onde acoustique, constitueront aussi l'interface active du capteur. Ils doivent donc présenter en même temps des surfaces adaptées à cette fonction, tant d'un point de vue mécanique (rugosité de surface notamment) que physico-chimique (mouillabilité, sites de surface).

Une autre voie de recherche concerne la caractérisation mécanique aux hautes fréquences des matériaux en couche, à partir des dispositifs à ondes acoustiques.

Ces voies de recherche sont particulièrement liées et complémentaires avec les études théoriques de modélisation et simulation.

De plus, une attention particulière est à porter aux évolutions des technologies des dispositifs à ondes élastiques étudiés pour des applications en microélectronique. En effet, les techniques des microsystèmes permettent d'envisager actuellement la réalisation de membranes piézoélectriques minces, intégrées directement sur le silicium avec l'électronique de conditionnement. Ces dispositifs, communément désignés par le sigle « FBAR » pourraient constituer l'équivalent de dispositifs de type QCM (microbalance à quartz), robustes, mais fonctionnant à haute fréquence grâce à leur très faible épaisseur, et susceptibles de ce fait de présenter de bonnes caractéristiques en terme de sensibilité. Un inconvénient pourrait résider, comme dans le cas des QCM, dans le non isolement d'une électrode par rapport au milieu de test.

5 Références bibliographiques

1. [AND93] J.C. Andle
An experimental and theoretical analysis of acoustic plate mode devices for biosensor applications.
Thèse, Université du Maine (USA), 1993.
2. [ASH99] M.F. Ashby
Materials Selection in Mechanical Design.
2nd ed, Butterworth Heinemann, Flexicover, 1999.
3. [DEJ94] C. Déjous
Capteurs acoustiques à modes de plaque transverses horizontaux - Application à la détection en milieux liquides et gazeux.
Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux I - n° 1204 - 14 décembre 1994.
4. [DIE74] E. Dieulesaint, D. Royer
Ondes élastiques dans les solides : Application au traitement du signal.
Masson, 1974.
5. [EST99] I. Esteban
Etude et intégration de capteurs acoustiques à modes de plaque transverses horizontaux (SH-APM). Application à la détection de gaz organophosphorés.
Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux I - n° 2030 - 20 janvier 1999.
6. [FEL86] M. Feldmann, J. Hénaff
Traitement du signal par ondes élastiques de surface.
Masson et CENT-ENST, Collection Technique et Scientifique des télécommunications, Paris, 1986, ISBN 2-225-80740-X.
7. [FER80] J.D. Ferry
Viscoelastic properties of polymers.
J. Wiley & Sons, 3rd edition, 1980, ISBN 0-471-04894-1.
8. [HAN76] K. Hanma, B. Hunsinger
A triple transit suppression technique.
IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings (1976) 328-331.
9. [HAR89] C.S. Hartmann, B.P. Abbott
Overview of design challenges for single phase unidirectional SAW filters.
IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings (1989) 79-89.
10. [HAS53] N.A. Haskell
The dispersion of surface waves on multilayered media.
Bull. Seism. Soc. Am. 43 (1953) 17-34.
11. [HOU91] M. Hoummady
Ondes élastiques transverses horizontales émises par des transducteurs interdigités déposés sur des plaques minces de quartz. Applications aux capteurs de viscosité et aux détecteurs de gaz.
Thèse n°202, Université de Franche-Comté, 1991.

12. [KRE97] D.W. van Krevelen
Properties of polymers.
Elsevier, 1997, ISBN 0-444-82877-X.
13. [LEH97] F. Lehoux, S. Giard
Etude de l'influence de la géométrie des structures interdigitées sur les ondes acoustiques.
Rapport de fin d'études d'Ingénieur ENSEIRB, Laboratoire IXL, juin 1997.
14. [MAZ05] P. Mazein
Étude de dispositifs à ondes de Love par modélisation numérique de la propagation d'ondes acoustiques. Application à l'optimisation de structures et à la caractérisation de matériaux en vue de la réalisation de capteurs chimiques.
Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 1 n°3027, 3 octobre 2005.
15. [MOR85] D.P. Morgan
Surface-Wave Devices for Signal Processing.
Elsevier, Studies in Electrical and Electronic Engineering 19, 1985, ISBN0-444-42511-X.
16. [RAZ05] F. Razan, C. Zimmermann, D. Rebière, C. Déjous, J. Pistré, M. Destarac, B. Pavageau
Radio frequency thin film characterization with polymer-coated Love-wave sensor.
Sensors and Actuators B, vol. 108, (2005) 917-924.
17. [REB92] D. Rebière
Capteurs à ondes acoustiques de surface - Application à la détection des gaz.
Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 1 - n° 826 - 23 septembre 1992.
18. [TAM01] O. Tamarin, C. Déjous, D. Rebière, J.Pistré
Simple Analytical Method To Estimate The Influence Of Liquids Viscosity On Love Wave Chemical Sensors.
IEEE International Ultrasonics Symposium, Atlanta - USA, 7-10 octobre 2001.
19. [TAM02] O. Tamarin
Etude de capteurs à ondes de Love pour applications en milieu liquide. Cas de la détection de bactériophages en temps réel.
Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 1- n° 2623 - 20 décembre 2002.
20. [THO50] W.J. Thomson
Transmission of elastic waves through a stratified solid medium.
J. Appl. Physics 21 (1950) 89-93.
21. [THO86] T. Thorvaldsson, F.M. Nyffeler
Rigorous derivation of the Masson equivalent circuit parameters from coupled-mode theory.
IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings (1986) 91-96.

22. [WRI85] P.V. Wright
The natural single-phase unidirectional transducer : a new low-loss SAW transducer.
IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings (1985) 58-63.
23. [ZIM02] C. Zimmermann
Conception, réalisation et étude de microcapteurs à ondes de Love pour applications en milieu gazeux. Cas de la détection de composés organophosphorés.
Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 1 - n° 2471 - 22 février 2002.
24. [ZIM04a] C. Zimmermann, P. Mazein, D. Rebière, C. Déjous, F. Josse, J. Pistré
A Theoretical Study of Love Wave Sensors Mass Loading and Viscoelastic Sensitivity in Gas and Liquid Environments.
IEEE International Ultrasonics Conference , Montréal, Canada, 24-27 août 2004, 813-816.
25. [ZIM04b] C. Zimmermann, P. Mazein, D. Rebière, C. Déjous, J. Pistré, R. Planade
Detection of GB and DMMP vapors by Love-Wave acoustic sensors using strong acidic fluoride polymers.
IEEE Sensors Journal, vol. 4, n°4 (2004) 479-488.

3. ...à la plate-forme de détection en milieu liquide

Ce chapitre présente les réalisations technologiques et validations expérimentales des dispositifs à ondes de Love pour une utilisation en milieu liquide. La première partie concerne la plate-forme de test, comprenant les dispositifs eux-mêmes, les cellules de test, ainsi que l'électronique de conditionnement et d'acquisition du signal en vue de la réalisation d'un système multicateur portable. La seconde partie est dédiée aux caractérisations en milieu liquide, en fonction de différents paramètres physiques du milieu de test ou environnant.

1 La plate-forme de test

Concernant chaque élément, ligne à retard, cellule de test et électronique de rétroaction, deux versions ont été successivement développées et réalisées. Les premiers prototypes ont consisté en des adaptations des éléments pré-existants, au Laboratoire IXL ou au sein d'autres équipes internationales travaillant sur des dispositifs de ce type, afin de montrer la faisabilité d'un fonctionnement en milieu liquide, compatible avec l'objectif de détection. A partir des résultats de ces études, et de celles menées en parallèle sur les applications en milieux gazeux et les caractérisations de matériaux, une seconde version a été développée et réalisée, en vue de faciliter la manipulation des capteurs et d'améliorer leurs caractéristiques.

1.1 La ligne à retard

Le dispositif de base est constitué d'une double ligne à retard sur quartz avec une couche guidante de SiO_2 . L'une des lignes est utilisée comme voie de mesure ; l'autre peut selon le cas, doubler la première, jouer le rôle de référence (sans couche sensible ou avec couche sensible non fonctionnelle), ou de seconde voie de mesure (avec une couche sensible différente). Les deux versions de ces dispositifs sont représentées ci-après.

La version 1 est collée et câblée sur un support en alumine sérigraphiée, comportant au dos une résistance de chauffage, l'ensemble constituant un élément interchangeable.

La version 2 est conçue pour une nouvelle cellule de test, présentée plus loin, qui ne nécessite plus de câblage. Notons en particulier des électrodes dorées, l'aluminium de la version 1 étant peu compatible avec une utilisation en milieu salin, comme l'est typiquement un milieu biologique ou plus encore une eau de mer, milieu d'intérêt pour les biocapteurs. Le matériau or présente cependant des inconvénients d'un point de vue du procédé de fabrication des dispositifs. Notamment, sa mauvaise adhérence nécessite l'utilisation de matériaux intermédiaires d'accrochage, typiquement chrome ou titane. C'est aussi un matériau exclu de certains procédés de fabrication en salle blanche, du fait de sa diffusivité importante. De plus, du point de vue du fonctionnement même des dispositifs, l'or présente une masse importante, par rapport à l'aluminium par exemple. Aussi, afin de limiter la rupture d'impédance acoustique présentée par les transducteurs, ceux-ci sont d'épaisseur plus fine dans ce cas.

Dans les deux cas, une difficulté technologique réside dans la réalisation de la couche guidante de SiO_2 , qui doit être déposée à moins de 400 °C (pour rester en dessous de la transition de phase du quartz) en évitant des chocs ou inhomogénéités thermiques, avec une épaisseur optimale de l'ordre de 5 μm . De ce point de vue, l'utilisation des nouveaux

matériaux en cours d'étude (cf. chapitre précédent), qui seront déposés à la tournette (« spin-coating ») ou par trempage (« dip-coating »), devrait aussi faciliter la réalisation des dispositifs.

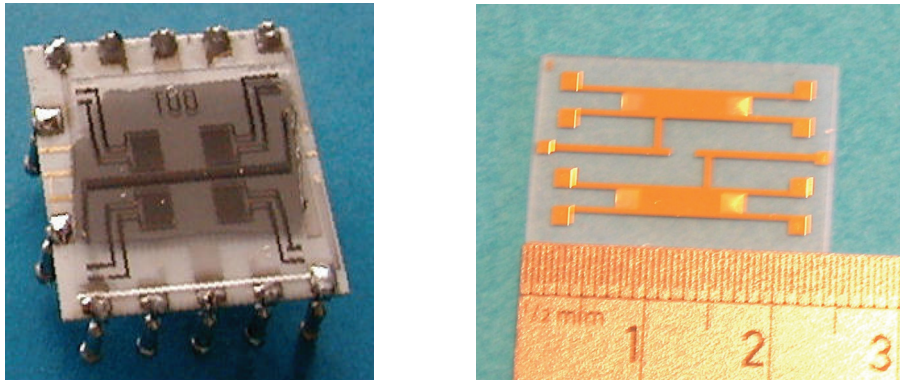


Figure 3.1 : Doubles lignes à retard à ondes de Love, en version 1 (à gauche) sur une alumine support 1"x1" et en version 2 (à droite).

Les principales caractéristiques de ces dispositifs sont regroupées dans le tableau suivant.

Tableau 3.1 : Principales caractéristiques des lignes à retard à ondes de Love utilisées.

		Version 1	Version 2
Substrat	Nature, coupe	Quartz ST	Quartz AT/ST
	Dimensions	$\sim 0,5 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$	$0,5 \times 16 \times 24 \text{ mm}^3$
Guide d'onde	Nature, épaisseur	SiO ₂ , 6 μm	SiO ₂ , 4 à 5 μm
Electrodes (IDTs)	Nature, épaisseur	Al 300 nm	Ti/Au ($\sim 30/70 \text{ nm}$)
	Périodicité λ	52 μm	40 μm
	Types de doigts	Doubles doigts $\lambda/8$	Doubles doigts $\lambda/8$
	Nb de paires N	50	45
	Ouverture W	50 $\lambda = 2,6 \text{ mm}$	40 $\lambda = 1,6 \text{ mm}$
	Distance centre à centre L _{cc}	125 $\lambda = 6,5 \text{ mm}$	210 $\lambda = 8,4 \text{ mm}$

1.2 La cellule de mesure

La première cellule de test utilisée est représentée ci-dessous. Chaque dispositif à onde acoustique est collé et câblé sur une carte imprimée fournie par l'Université de Delft. Elle comporte un capteur de température placé au préalable sous le capteur et une résistance de chauffage. Cette carte reçoit une galette de plexiglass ou de téflon usinée de sorte à aménager une cavité au-dessus de la partie active du capteur. Un joint intermédiaire assure l'étanchéité de l'électronique par rapport au milieu de test liquide. L'ensemble est maintenu par pression à l'aide de 4 vis traversantes en périphérie.

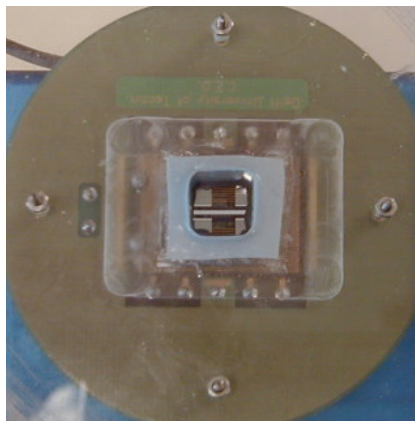


Figure 3. 2 : Cellule de test en version prototype d'essai.

Après une première étape de faisabilité et en tenant compte de l'expérience et du savoir-faire acquis dans l'ensemble de l'équipe sur plusieurs sujets et domaines d'applications, une nouvelle cellule de test a été réalisée. Nous avons retenu le principe de base de nos collègues américains, l'équipe du Professeur Fabien Josse, qui consiste à réaliser une cellule de test multifonctionnelle permettant de recevoir le dispositif nu, les contacts électriques étant réalisés à l'aide de contacts à ressort. Les images suivantes représentent ainsi la cellule actuelle, en trois éléments : une embase destinée à recevoir le dispositif, une partie intermédiaire assurant les connexions électriques (contacts à ressort sur les lignes à retard, connecteurs HF en sorties axiales), et enfin un couvercle, comportant un joint usiné pour assurer l'étanchéité et aménager sur le capteur une cellule de volume de 250 à 500 mL. Ce couvercle est interchangeable selon l'application : avec cavité centrale ouverte pour injecter ou enlever du liquide à la micropipette, avec cavité fermée par du verre pour contrôler la circulation du liquide sur le capteur, sans cavité pour des tests en circulation en milieu gazeux ou liquide. Les accès fluidiques sont aussi adaptables selon qu'il s'agit d'une application gaz (figure ci-dessous) ou liquide (avec des raccords Luer).

Avec cette cellule, l'élément de base interchangeable devient uniquement le substrat comportant les lignes à retard, qui reste ainsi aisément manipulable.

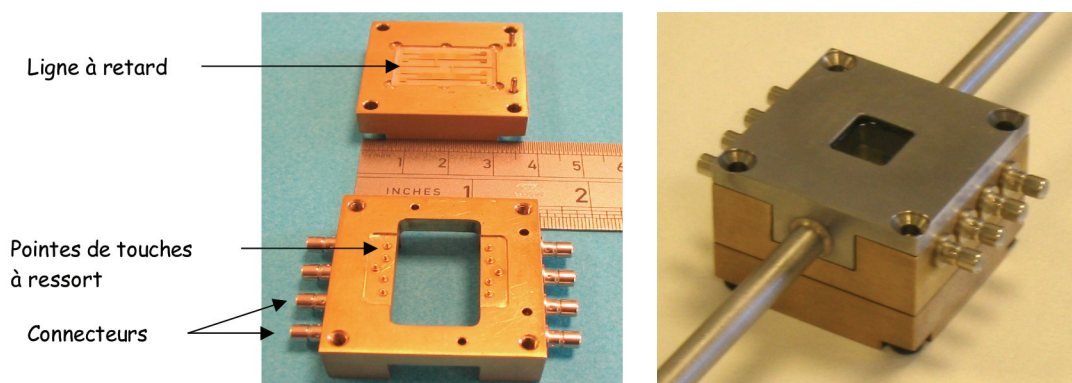


Figure 3. 3 : Cellule de test multifonctionnelle actuelle.

1.3 L'oscillateur

Nous avons vu au chapitre précédent que la réalisation d'un système de détection permettant d'atteindre de faibles concentrations, et susceptible d'être portable, nécessitait un montage en oscillateur. Les éléments de base en sont, autour de la ligne à retard qui le pilote, un amplificateur ajustable, constitué d'un amplificateur fort gain fixe faible bruit et d'un atténuateur variable, et un coupleur. Le synoptique représenté ci-dessous fait apparaître

également un filtre passe-bande, ainsi que des transformateurs à gain unitaire (« baluns »), permettant l'utilisation en mode différentiel des lignes à retard. Ces éléments sont particulièrement indispensables lors d'une utilisation en présence d'un milieu de test adjacent conducteur, ou d'un plan métallique en surface, utilisé pour annuler l'influence d'une variation de conductivité électrique sur le capteur. Un élément conducteur sur le guide de SiO_2 , au-dessus des structures interdigitées en particulier, crée en effet une capacité de couplage électromagnétique parasite rendant la ligne inutilisable.

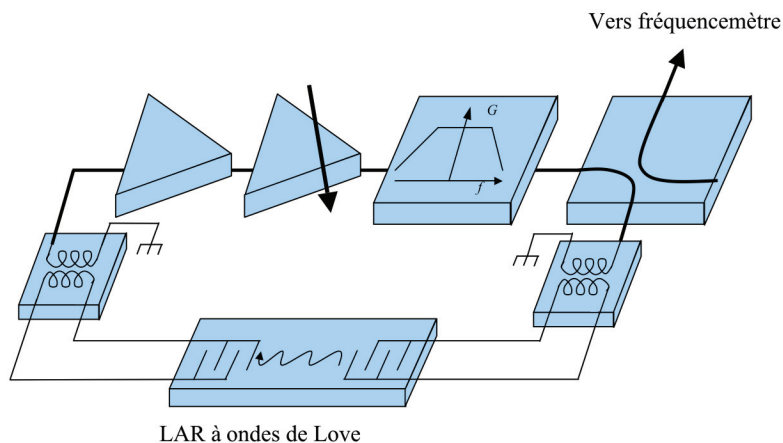


Figure 3. 4 : Schéma synoptique de l'oscillateur piloté par une ligne à retard à onde acoustique.

Si l'amplificateur compense les pertes de la ligne à retard (vérification de la condition de gain), la fréquence d'oscillation est déterminée par la condition de phase de Barkhausen :

$$k \cdot L_{cc} + 2 \cdot \Phi_{IDT} + \Phi_{ampli} = 2n\pi \quad \text{avec} \quad k = \frac{2\pi}{V_p} f$$

dans laquelle le terme $2 \cdot \Phi_{IDT} + \Phi_{ampli}$ (déphasages dus aux transducteurs interdigités et à l'électronique d'amplification) est considéré constant. Ainsi une petite variation du déphasage de la ligne à retard, liée à une variation de vitesse de phase, se traduit par une variation de fréquence.

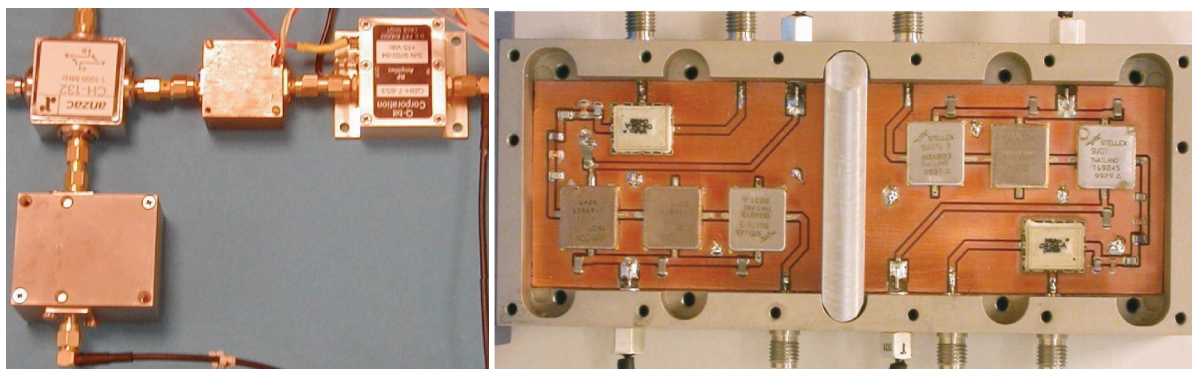


Figure 3. 5 : Electronique de rétroaction en version simple discrète (à gauche) et double CMS (à droite).

Les versions en composants discrets et en montage CMS de cette électronique de conditionnement sont représentées ci-dessus. Sur la version de droite, une conception et une réalisation soignées ont permis d'obtenir un excellent rapport signal/bruit, conduisant à une

stabilité à court-terme de l'ordre de 0,1 Hz/s [MOL04], déterminante pour obtenir un bon seuil de détection dans des applications comme celles en milieu gazeux en particulier.

1.4 De l'acquisition du signal au système multicateur portable

1.4.1 Banc de test

L'image ci-dessous représente le premier banc de test en milieu liquide, mettant en œuvre les premières cellules de test, régulées en température à l'aide d'un bain sec thermostaté qui permet par ailleurs de porter à la même température les échantillons liquides de test. Les cellules sont associées à une électronique de conditionnement en éléments discrets afin d'avoir toute latitude pour compenser les pertes. En effet, la présence du milieu liquide peut se traduire par une variation des pertes en transmission très différentes, en fonction notamment de sa viscosité. La fréquence est mesurée à l'aide d'un fréquencemètre commercial. L'ensemble est piloté par ordinateur.

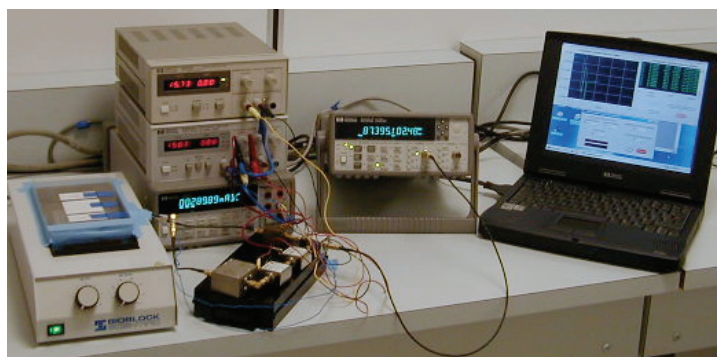


Figure 3. 6 : Banc de test (version 1) des dispositifs en milieu liquide.

L'objectif à terme est la réalisation d'un système multicateur autonome. En effet, un capteur donné ne présente jamais une réponse indépendante des paramètres autres que la quantité de l'espèce visée (influence de la température, non spécificité, ...etc). Aussi, un réseau de capteurs, chacun équipé d'une couche sensible différente, permettra d'enrichir la signature afin de détecter une ou plusieurs espèces dans un composé complexe à l'aide d'un traitement du signal intégrant l'ensemble des réponses. De plus, le système nécessitera la mise en place d'une circulation de fluide permettant la génération d'un flux de liquide au-dessus du capteur, selon un protocole à établir en fonction de l'application. Il comportera des phases à débit contrôlé de référence, de mesure et de nettoyage pour la régénération du capteur.

1.4.2 Circulation fluidique

L'image ci-dessous représente la mise en parallèle de 4 nouvelles cellules doubles (une seule ligne par cellule est utilisée ici), associées à leur électronique de conditionnement (oscillateur). De part et d'autre sont disposées deux pompes péristaltiques, pouvant assurer chacune un débit contrôlé unique sur 1 à 4 voies simultanément.

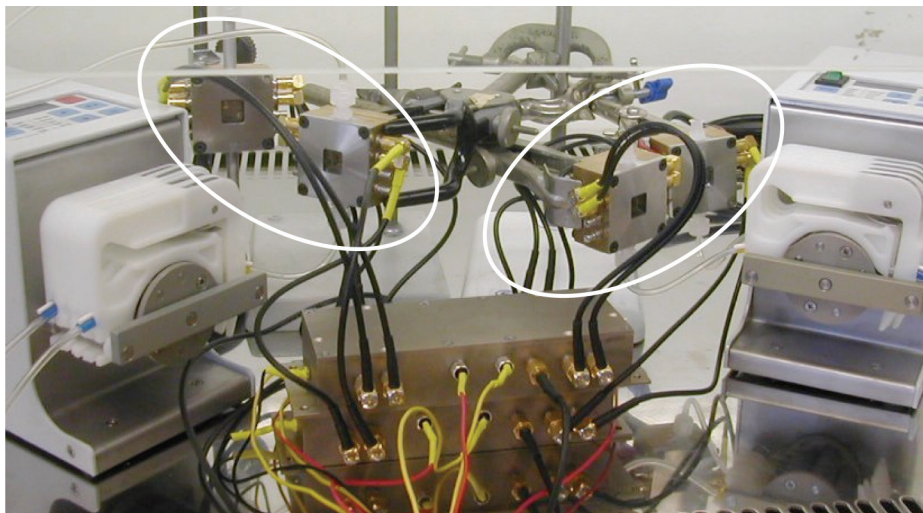


Figure 3. 7 : Banc de test (version 2) d'un ensemble de 4 dispositifs doubles avec circulation fluïdique.

A terme, l'objectif est d'automatiser un réseau de circulation fluïdique avec injection des réactifs dans un flux continu de solution de référence, principe de base du système FIA (« Flow Injection Analysis ») schématisé ci-dessous. Selon que la vanne est en position 1 ou 2, le capteur reçoit respectivement le liquide de référence ou le liquide de test, le volume de celui-ci étant déterminé par la boucle de chargement représentée en 2. Le débit sur le capteur est maintenu constant, à l'aide d'une pompe péristaltique, éventuellement complétée d'un limiteur d'amplitude de pulsations et d'un capteur de pression, en amont de l'entrée. La solution d'analyte est insérée par une seringue dans la boucle 2 pendant que la vanne est en position 1.

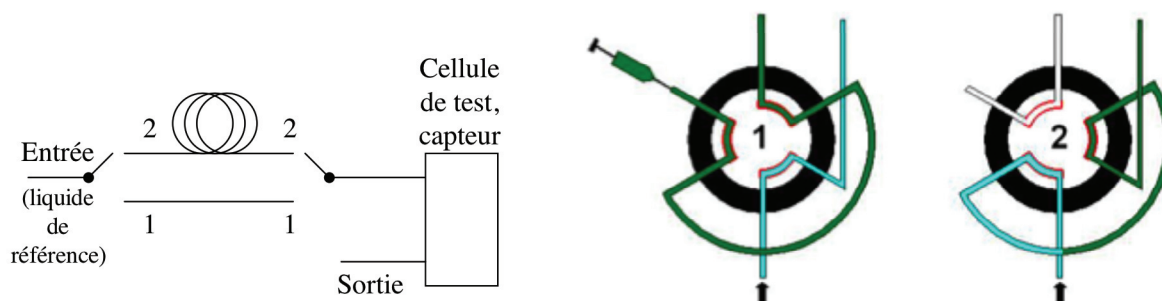


Figure 3. 8 : Principe d'un système d'injection à flux continu (d'après [MAIL04]).

L'objectif d'un tel système est de créer les meilleures conditions d'un « échelon d'espèce cible » sur le capteur, en limitant les injections manuelles à la micropipette directement au-dessus de la surface active, qui génèrent toujours des perturbations physiques à l'origine d'une dégradation importante du seuil de détection du capteur, comme nous le verrons plus loin. Ce système en flux continu empêche cependant une circulation en circuit fermé, qui pourrait dans certains cas permettre d'accumuler sur le capteur des espèces cibles, présentes au départ en faible concentration, afin d'atteindre le seuil de détection du capteur.

1.4.3 Système multicapteur intégré

Enfin, la possibilité d'intégrer électronique d'acquisition, éventuellement régulation en température, et traitement du signal, avait fait l'objet d'une étude dans le cadre du CRED³.

³ CRED : Centre de Recherche Etude et Développement, IUT A – Université Bordeaux 1.

Une conception originale, autour d'un microcontrôleur du type HC11, avait permis l'acquisition de une à quatre voies fréquentielles à 100 MHz environ avec une précision, nécessaire pour les capteurs, de 1 Hz [CAZ99]. D'autre part, un traitement de signal exploitant le régime dynamique de la réponse des capteurs à l'aide d'un réseau de neurones avait été étudié pour délivrer une information en temps réel du type alarme [BOR98]. Ce système, représenté ci-dessous, permet un fonctionnement en autonome, ou peut être relié à un ordinateur pour un fonctionnement de laboratoire, permettant une interface plus complète et une sauvegarde des données. Un travail important de finalisation du système complet a permis récemment de le rendre opérationnel [LAC05] et d'en livrer un exemplaire comme centrale d'acquisition au Centre d'Etude du Bouchet [CEB04]. Le bon fonctionnement de ce dispositif a été validé lors de la dernière campagne de test.



Figure 3.9 : Système d'acquisition et de traitement du signal multicapteur.

Ainsi, de nombreux éléments sont réunis en vue de mener à terme un développement de leur intégration dans le but de réaliser un système de détection rapide dédié portable, dans lequel les capteurs seraient des éléments interchangeables. Le point central réside maintenant dans les performances de ces capteurs en milieu liquide, qui, du fait d'un milieu de test plus complexe, et d'interactions très différentes, moins connues et moins contrôlées à ce jour, sont encore inférieures à celles obtenues en milieu gazeux et sont insuffisantes pour un grand nombre d'applications. Des améliorations de ce point de vue passent par une caractérisation des capteurs par rapport aux paramètres du milieu de test environnant, en relation avec les études théoriques, et par une étude du système immunologique mis en jeu sur le capteur. Ces deux points font l'objet respectivement du paragraphe et du chapitre suivants, et permettront de définir des voies d'améliorations.

2 Caractérisations en milieu liquide

Cette partie reprend de façon très synthétique une partie des résultats des travaux de thèse d'Ollivier Tamarin, présentés de façon plus approfondie dans son mémoire [TAM02].

2.1 Corrélation des variations de vitesse et de fréquence

Afin de corrélérer théorie et expérience, il est nécessaire de relier les variations de vitesse de phase de l'onde de Love aux variations de fréquence de l'oscillateur, mesurées en pratique. Cette relation peut être déterminée en différenciant la condition de phase de Barkhausen (cf. §1.3) par rapport à un paramètre quelconque, supposé perturber la propagation dans la ligne à retard sans perturber la distance centre à centre entre les transducteurs (L_{cc}). On obtient ainsi :

$$\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{V_g}{V_0} \cdot \frac{\Delta V}{V_0}$$

où V_g est la vitesse de groupe de l'onde de Love.

2.2 Influence du volume de liquide

Dans les expériences en milieu liquide, le volume de l'échantillon de test introduit au-dessus du capteur peut avoir une importance, en fonction de l'épaisseur de pénétration δ de l'onde dans ce milieu. Une expression de δ , défini comme la distance sur x_3 à laquelle la vitesse de l'onde est réduite d'un facteur $1/e$, peut être calculée avec des hypothèses simplificatrices [MAR89, JAK98] :

$$\delta = \frac{1}{k_L} = \sqrt{\frac{2\eta}{\omega\rho_L}}$$

D'un point de vue expérimental, un volume d'eau a été ajouté à plusieurs reprises dans la cavité au-dessus du capteur. Le volume à partir duquel la fréquence ne varie plus (400 μL sur 120 mm^2) a permis de retrouver une épaisseur de l'ordre de 2,5 mm, très supérieure à la profondeur de pénétration calculée théoriquement, de l'ordre de 50 nm pour l'eau. Cette différence est en grande partie liée à la mouillabilité du substrat, qui limite l'homogénéité du liquide pour de faibles quantités. C'est cette valeur qu'il faudra prendre en compte comme quantité de liquide minimale pour des applications à la micropipette en cellule ouverte, afin de s'affranchir de la sensibilité au volume.

Lors d'applications en cellule fermée, l'important sera de garder toujours remplie la cavité de la cellule de test, qui aura une épaisseur généralement supérieure à la profondeur de pénétration théorique. En effet, la valeur de δ est multipliée par 10 pour un facteur 100 en viscosité, soit par exemple, pour un liquide de même densité que l'eau et de viscosité importante 10 000 cP au lieu de 1 cP, une profondeur de pénétration de 0,5 μm , encore très inférieure aux épaisseurs de cavité imaginées à ce jour.

2.3 Influence de la viscosité

L'influence de la viscosité a été étudiée à l'aide d'un mélange eau-glycérol, dont la conductivité électrique est négligeable, à des concentrations jusqu'à 50% (au-delà, les pertes importantes ne sont plus compatibles avec le fonctionnement en oscillateur dans les conditions du test). Les résultats expérimentaux présentent une bonne concordance avec les résultats théoriques, qui prévoient une variation relative de fréquence (ou de vitesse) proportionnelle à la racine carrée de la viscosité du liquide, tant que celui-ci peut être considéré comme newtonien.

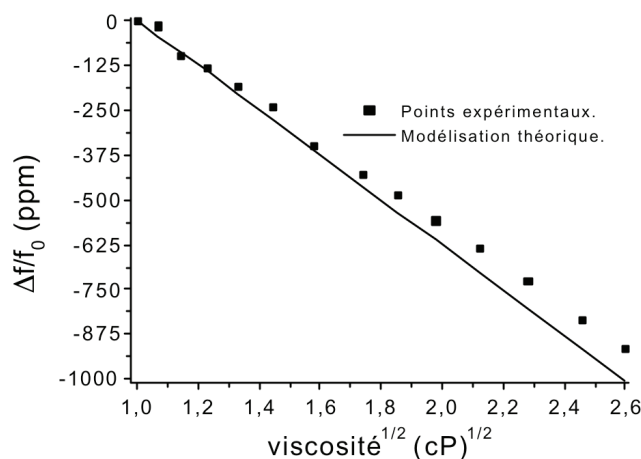


Figure 3. 10 : Réponse relative de la ligne à retard en fonction de la viscosité.

L'influence de la viscosité sur les pertes en transmission a aussi été étudiée, en mesurant les pertes à l'aide d'un analyseur de réseau, et comparée à un résultat théorique reliant les variations de pertes en transmission $\Delta\gamma$ aux variations de vitesse de phase dues à une variation de viscosité en régime newtonien [JAK98] :

$$\Delta\gamma = -\frac{2\pi}{\lambda} \cdot \frac{\Delta V_p}{V_p}$$

La courbe suivante montre de nouveau une bonne concordance entre théorie et expérience.

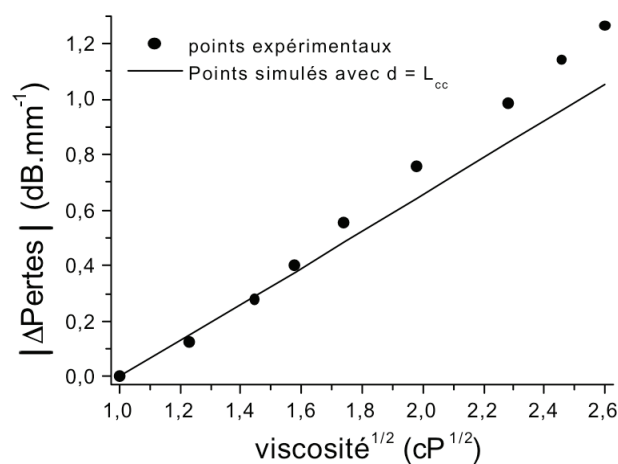


Figure 3. 11 : Influence de la viscosité sur les pertes en transmission de la ligne à retard.

2.4 Influence de la permittivité électrique

La bonne cohérence entre les résultats théoriques et expérimentaux précédents sur l'influence d'un paramètre mécanique comme la viscosité, ont été obtenus en considérant comme point de référence le dispositif en présence d'eau pure. Par contre, le calcul de la variation de fréquence liée à la présence d'eau sur le capteur, par rapport au dispositif sous air, donne une valeur très inférieure à la valeur obtenue expérimentalement, même en utilisant la résolution numérique et en tenant compte des paramètres électriques de l'eau pure ($\epsilon_L = 79,3 \cdot \epsilon_0$, $\sigma = 0 \Omega^{-1} \cdot m^{-1}$). Cette différence est liée à l'influence du liquide sur la génération et la réception de l'onde acoustique par les transducteurs interdigités.

En effet, l'admittance ramenée par le liquide modifie la valeur des paramètres de l'admittance équivalente du transducteur (cf. §1.5), excepté R_s , notamment du fait de sa permittivité électrique [JAK97]. Ainsi, une variation de fréquence relative expérimentale due à la présence d'eau de -1270 ppm est composée pour environ -580 ppm d'effets mécaniques (valeur théorique vérifiée en utilisant une ligne à retard dont la surface est métallisée pour annuler les effets électriques), pour environ -280 ppm d'effets électriques sur la propagation de l'onde, et environ -410 ppm d'effets électriques sur les transducteurs.

2.5 Influence de la conductivité électrique

L'influence de la conductivité électrique a été étudiée à l'aide d'une solution aqueuse de chlorure de sodium (Na^+Cl^-), de concentration massique entre 0 % (eau pure, $\sigma \approx 0 \text{ W}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) et 5 % (50 g/L, $\sigma \approx 7 \text{ W}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$), soit une concentration supérieure à celle de l'océan, de l'ordre de 35 g/L. De nouveau, les résultats obtenus avec deux dispositifs, un nu, l'autre métallisé, comparés aux calculs théoriques, ont permis de retrouver l'influence de la conductivité électrique sur la propagation de l'onde, prise en compte par la modélisation, et sur les transducteurs, non modélisée. Ces résultats sont représentés sur les courbes suivantes. Il apparaît sur la figure de gauche, relative à la réponse de la ligne nue, que, pour une eau à 50 g/L de Na^+Cl^- , la variation relative de fréquence de -260 ppm se décompose en -40 ppm environ de contribution visqueuse, seulement -10 ppm de contribution électrique sur la propagation, et -210 ppm de contribution électrique additionnelle.

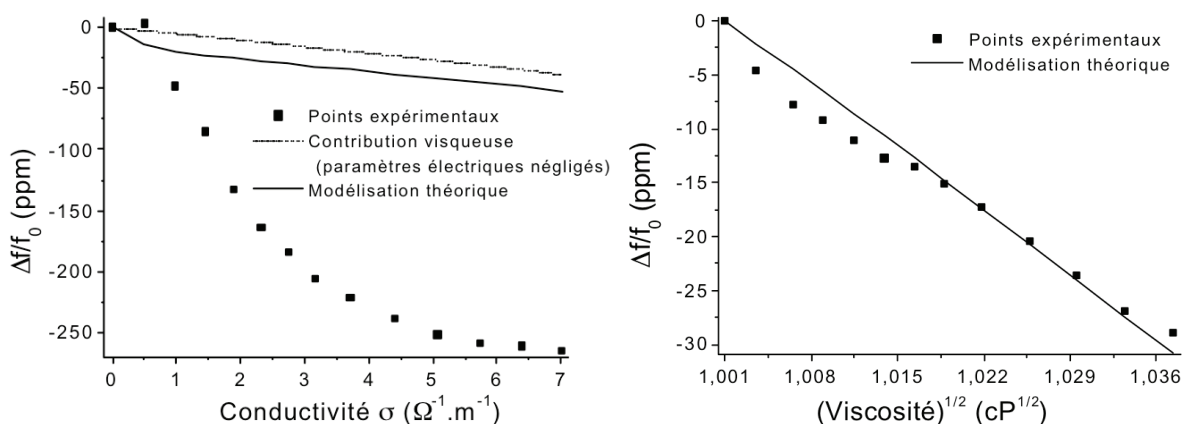


Figure 3.12 : Influence d'une solution aqueuse de NaCl de 0 à 5 % en masse sur une ligne nue (à gauche) et métallisée (à droite).

Ainsi, les effets électriques sur les transducteurs sont importants par rapport à ceux sur la propagation, qui sont eux-mêmes du même ordre de grandeur que l'effet mécanique dû aux variations, pourtant extrêmement faibles, de viscosité. Néanmoins, la variation de fréquence relative de -260 ppm, obtenue pour une très grande plage de conductivité électrique, reste faible devant la forte influence des paramètres mécaniques en général, puisqu'une variation de viscosité de 1 à 8 ppm induit une variation de fréquence relative proche de -1 000 ppm.

3 Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre les différentes réalisations technologiques, des lignes à retard à un système multicapteur susceptible d'intégrer l'acquisition et le traitement du signal. Le système a permis la détection de composés gazeux à très faible concentration dans le cadre d'un marché pour la Direction Générale de l'Armement [DEJ04].

Dans une seconde partie ont été présentés les résultats de caractérisation des dispositifs en fonction des paramètres d'un milieu liquide adjacent. La comparaison de ces résultats

expérimentaux avec les calculs théoriques ont validé la modélisation des paramètres mécaniques (viscosité) et mis en évidence leur influence prépondérante par rapport aux effets électriques dans le cas de nos dispositifs sur quartz. Concernant les paramètres électriques (conductivité, permittivité), la comparaison a montré l'importance des effets sur l'admittance des transducteurs interdigités par rapport à ceux sur la propagation de l'onde, seule étudiée avec le modèle actuel. Ces caractérisations valident le fonctionnement du système en milieu liquide, et pourront aider à l'analyse des résultats obtenus dans le cadre d'une application à la biodétection, qui fait l'objet du chapitre suivant.

Par ailleurs, d'autres applications en milieu liquide sont étudiées en parallèle et valident le fonctionnement en milieu liquide dans différentes conditions. C'est le cas de tests de caractérisations en temps réel d'échantillons de liquide prélevés au cours d'une polymérisation et déposés sur le capteur par un bras robotisé, qui ont montré une bonne robustesse et reproductibilité du système [RAZ05]. C'est le cas également d'essais avec une cellule microfluidique en PDMS intégrée sur le capteur, permettant de faire circuler des microquantités de liquide (de l'ordre du microlitre) confiné près de la surface du capteur, sur quelques dizaines de micromètres, qui font aussi l'objet d'une collaboration avec le Laboratoire du Futur de Rhodia (post-doc de M. Guirardel et thèse de V. Raimbault en cours). Un tel confinement est intéressant à plusieurs titres : volume réduit de l'échantillon d'analyse ($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ }\mu\text{L}$, $1 \text{ }\mu\text{m}^3 = 1 \text{ fL}$), confinement du milieu réactionnel près de la surface sensible (sensibilité et rapidité de réaction), fabrication collective et parallélisation. Enfin une application à la détection de métaux lourds est en cours d'étude, à l'aide de couches de polypyrroles et hétéropolysiloxanes, développées par l'Institut Européen des Membranes de Montpellier [ACI03].

4 Références bibliographiques

1. [ACI03] ACI « nouvelles méthodes analytiques et capteurs 2003 »
Détection des métaux dissous, projet n°26.
2. [BAC05] J.P. Bac
Pour la Science, Dossier n°46 « Génome humain et médecine », janvier-mars 2005, p.52-57.
3. [BOR98] C. Bordieu
Utilisation des réseaux de neurones artificiels pour la détection et la reconnaissance des gaz en temps réel.
Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 1 - n° 1893 - 3 juillet 1998
4. [CAZ99] C. Cazaubon, H. Lévi, C. Bordieu, D. Rebière, J. Pistré
Système multicapteurs de détection, portable, utilisant la technique du fenêtrage temporel.
Revue d'Électricité et d'Électronique, n°3, mars 1999, p.55-58.
5. [DEJ04] C. Déjous, J.L. Lachaud, P. Mazein, N. Moll, J. Pistré, D. Rebière
Marché 02.01.061.00.470.91.50/DGA/DCE/CEB, décembre 2002-septembre 2004.

6. [JAK97] B. Jakoby, A. Venema, M.J. Vellekoop
Design of Love wave sensor devices for the operation in liquid environments.
IEEE Ultrasonic Symposium (1997) 375-379.
7. [JAK98] B. Jakoby, M.J. Vellekoop
Viscosity sensing using a Love-wave device.
Sensors and Actuators A 68 (1998) 275-281.
8. [LAC05] J.L. Lachaud
Réalisation d'un système d'analyse de gaz avec régulation en température du capteur et traitement du signal par réseau de neurones.
Mémoire Ingénieur CNAM, Centre Régional d'Aquitaine, n°354, 21 juin 2005.
9. [MAR89] S.J. Martin, A.J. Ricco, T.M. Niemczyk, G.C. Frye
Characterization of SH acoustic plate mode sensors.
Sensors and Actuators 20 (1989) 253-268.
10. [MOL04] N. Moll, C. Déjous, D. Rebière, J. Pistré, R. Planade
An improved Love-wave oscillator for low concentration chemical sensing application.
DCIS 2004, Bordeaux, France, 2004, 276-280.
11. [RAZ05] F. Razan
Etude de microcapteurs à ondes acoustiques dédiés à la détection fine de produits chimiques à l'échelle laboratoire et industrielle.
Collaboration IXL – LOF Rhodia.
Thèse en cours, décembre 2002 - décembre 2005.
12. [TAM02] O. Tamarin
Etude de capteurs à ondes de Love pour applications en milieu liquide. Cas de la détection de bactériophages en temps réel.
Thèse de Doctorat de l'Université Bordeaux 1- n° 2623 - 20 décembre 2002.

4. Application à la biodétection

1 Le principe du biocapteur

Sur la figure ci-dessous est illustré très schématiquement le principe du biocapteur à onde acoustique, tel que décrit au chapitre 1, et appliqué au cas du détecteur à onde de Love : l'onde est confinée dans la couche guidante de surface, seule représentée sur le schéma, la membrane sensible est constituée d'anticorps, greffés en surface par l'intermédiaire d'un agent de liaison, le capteur ainsi réalisé est prêt à assurer la détection d'une espèce cible s'immobilisant sur l'anticorps.

Le choix d'un principe de détection fondé sur une réaction immunologique de type antigène-anticorps confère au capteur une grande spécificité, ainsi qu'un caractère générique. En effet, l'utilisation d'un nouvel anticorps, adapté à un micro-organisme cible différent, permettra une mise en œuvre identique, en particulier au niveau du greffage sur la surface, grâce à la grande similitude entre tous les anticorps (cf. chap.1§3.2).

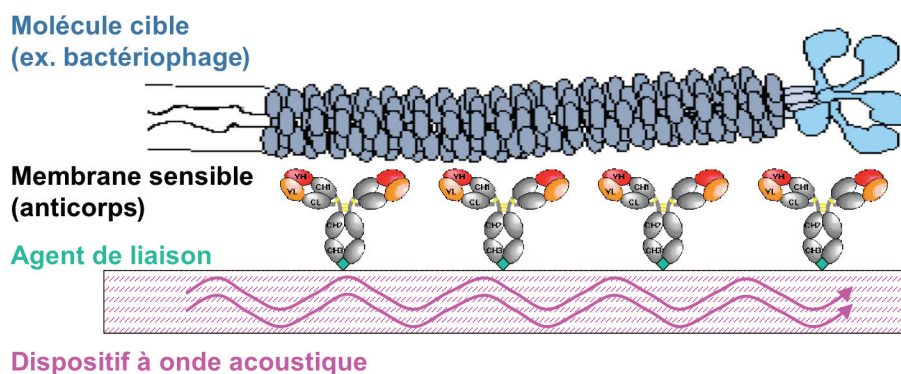


Figure 4. 1 : Principe du biocapteur à onde acoustique.

Nous allons successivement nous intéresser, dans ce chapitre, aux différentes catégories d'espèces cibles (bactéries, virus, petites molécules), puis aux modèles biologiques sélectionnés pour notre application. Trois autres parties seront ensuite consacrées, l'une à l'étude du greffage des anticorps, les deux suivantes à l'application à la détection d'un bactériophage (virus de bactérie) et d'une bactérie. Ces parties reprennent les travaux de thèse d'O. Tamarin [TAM02], qui ont montré la faisabilité de la détection en temps réel d'un bactériophage à l'aide d'un dispositif à onde de Love, en collaboration étroite avec le Laboratoire d'Immunologie et Parasitologie (Université Victor Segalen Bordeaux 2). Elles sont complétées de travaux récents menés dans le cadre des travaux de thèse de N. Moll, sur les biocapteurs à ondes de Love, notamment appliqués à la détection de bactéries, et de ceux de D.H. Dinh, en co-tutelle entre le LCOO (Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique, CNRS UMR 5802, Université Bordeaux 1) et l'IXL, qui étudie de nouveaux matériaux et leur fonctionnalisation afin d'augmenter de façon significative les performances de ces capteurs. Nous concluons enfin sur l'avancement de cette thématique et sur les perspectives d'études envisagées.

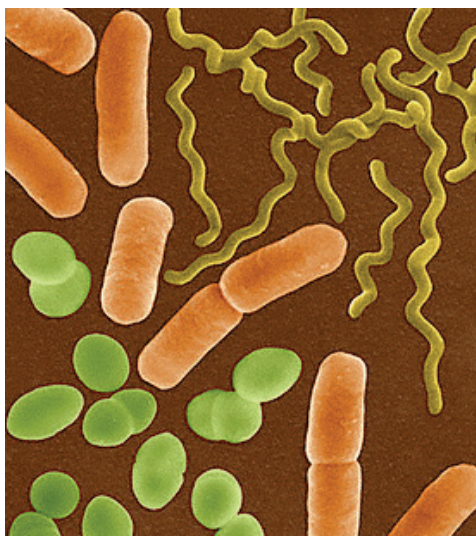
2 Les espèces cibles : bactéries, virus, petites molécules

2.1 Bactéries

Une bactérie est un micro-organisme généralement unicellulaire, procaryote (sans noyau), mesurant typiquement entre 0,5 et 5 μm . Le composant principal d'une cellule bactérienne est l'eau ; les autres composants sont des macromolécules (protéines, acides nucléiques, polysaccharides), des petites molécules organiques (masse de 100 à 1000 Da) et des ions inorganiques. On distingue trois formes représentatives classiques (Figure 4. 2), les bactéries de forme :

- arrondie (-coccus) : *Streptococcus*, *Staphylococcus*
- bâtonnet (bacillus) : *Escherichia coli* (*E.coli*), *Bacillus*, *Pseudomonas*
- spiralée (spirillum) : *Leptospira*, *Spirillum*.

La bactérie est une cellule vivante autonome (Figure 4. 3), vivant en colonie, capable de se reproduire seule par division cellulaire après duplication de son unique chromosome (une bactérie vit en moyenne 20 minutes, et une population double environ toutes les demi-heures dans des conditions favorables), capable de se déplacer, à l'aide en général de flagelles. Ses mouvements sont influencés par la composition du milieu, lui permettant de s'attarder à proximité de nutriments, de s'éloigner en présence de danger.



[KUN, 23996A.jpg]
(Image MEB)

Figure 4. 2 : Photocomposition de trois formes communes de bactéries : coccus, bacillus, spirillum.

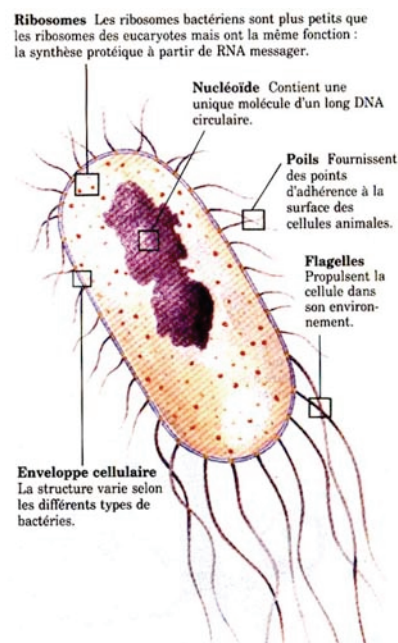


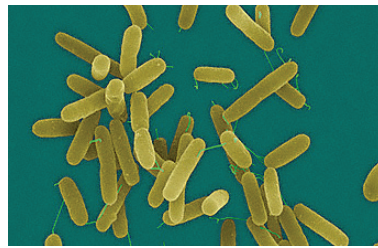
Figure 4. 3 : Représentation schématique d'une bactérie [CUL].

Les images suivantes, réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage, représentent quelques exemples typiques de bactéries, en formes de bacilles et de coques, grossies quelques milliers de fois. Parmi elles, les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) font environ 1 μm de long, les *Pseudomonas* de l'ordre de 3 μm . On peut noter sur l'image des *Bacillus anthracis* la présence non seulement des bacilles, mais aussi de spores, forme arrondie très résistante qui assure la conservation et la dispersion de la bactérie. Placées dans

un milieu favorable, les spores germent pour donner un nouveau cycle de croissance végétative des bacilles.



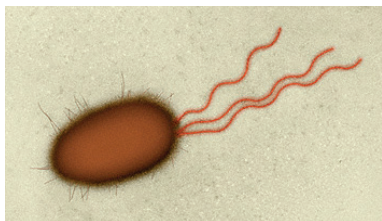
Escherichia coli [KUN]



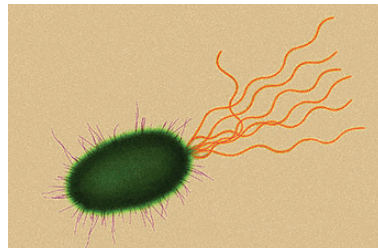
Pseudomonas aeruginosa
[KUN, 97270A.jpg]



Bacillus anthracis
spores et bacilles
[KUN, 21186D.jpg]



Escherichia coli
[KUN, 71230H.jpg]



Pseudomonas spp.
[KUN, 71250E.jpg]

Figure 4. 4 : Images MEB de bacilles.



Streptococcus
Formation de chaînette
caractéristique
[KUN, 97238.jpg]



Staphylococcus aureus
En amas
[BSI]

Figure 4. 5 : Images MEB de coques.

Beaucoup de bactéries sont non pathogènes et même bénéfiques. Citons en particulier les *streptomyces coelicolor* qui constituent les deux tiers des antibiotiques, ou encore la très connue *Escherichia coli* (*E. coli*) dont la présence dans notre intestin participe à la digestion. D'autres souches, même proches, peuvent au contraire provoquer des troubles plus ou moins graves, comme les *E. coli* entéro-hémorragiques (ECEH, *E. coli* O157/H7), mises en cause majoritairement, avec *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* et *Campylobacter jejuni*, lors d'infections bactériennes liées à l'eau dans les pays industrialisés. De plus, certaines bactéries sécrètent des toxines auxquelles elles confèrent leur pouvoir pathogène. C'est ainsi le cas du *Bacillus anthracis* (bacille du charbon, ou anthrax), qui entraîne une issue fatale pour l'être humain infecté du fait de la production par la bactérie de deux toxines et d'un antigène. Les

bactéries ne peuvent être détruites que par des antibiotiques, qui agissent en s'attaquant à leur paroi, en perturbant la réplication de leur ADN ou en empêchant la synthèse de leurs protéines.

2.2 Virus et bactériophages

Un virus est un organisme parasitaire intracellulaire qui s'attaque aux cellules eucaryotes (à noyau). Ils sont en général dix fois plus petits que les bactéries (20 à 300 nm). Les bactériophages sont des virus infectant les cellules procaryotes (bactéries ou pseudo).

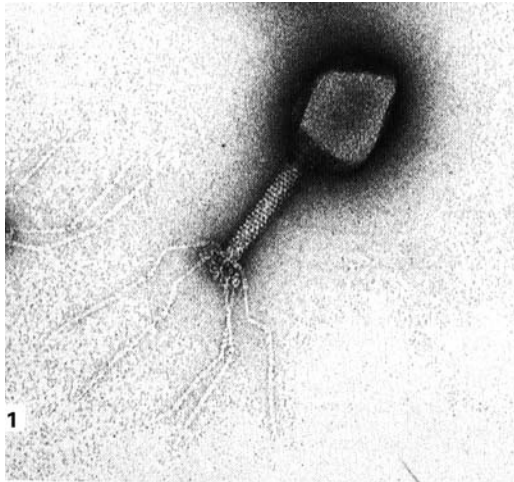
Un virus est composé d'une enveloppe ou capsidite abritant un matériel génétique sous forme d'acide nucléique (ADN ou ARN) entouré de protéines (mais ne constituant pas un chromosome). Il ne peut se développer ni se reproduire seul, mais doit parasiter une cellule vivante (bactérie, cellule végétale ou animale), grâce à ses protéines de fixation, pour en pirater les fonctions enzymatiques et métaboliques, ainsi faire exprimer son matériel génétique, et dès lors se multiplier. Les multiples descendants ainsi créés iront alors infecter de nouvelles cellules.



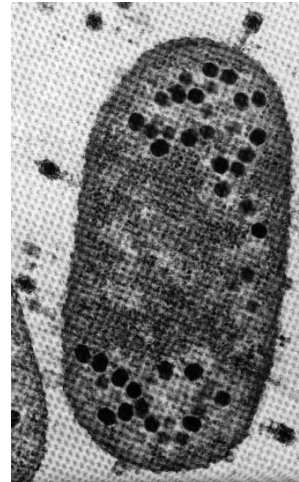
Figure 4. 6 : Représentation schématique [TOU04] et Image MEB [LOM] du virus influenza (grippe).

La plupart des virus sont sphériques avec une capsule recouverte d'épines comme celui de la grippe. Cependant, d'autres formes existent : les images suivantes (Figure 4. 7) représentent un bactériophage T4 avec une tête polyédrique contenant un ADN, une queue striée et des fibres de fixation, ainsi qu'une bactérie *E. coli* infectée par ce bactériophage. D'autres encore présentent une symétrie cubique ou hélicoïdale résultant en une organisation symétrique d'éléments identiques.

Du fait qu'il utilise une cellule hôte pour se développer et se reproduire, le virus est difficile à tuer et est en particulier insensible aux antibiotiques. Sensible aux rayonnements et aux agents chimiques, il peut disparaître, mais il peut également muter très facilement. De plus, il est difficile de l'attaquer sans détruire aussi les cellules de l'organisme infecté. La seule méthode pour prévenir une infection virale est d'utiliser un vaccin, qui stimule les mécanismes immunitaires à produire des anticorps qui protégeront la cellule.



Bactériophage T4 du streptocoque
[Image MEB, x 240 000]



E.coli infectée par des bactériophages T4
[Image MEB, x 75 000]

Figure 4. 7 : Images MEB [CUL] du bactériophage T4 seul et infectant une bactérie *E.coli*.

2.3 Autres espèces cibles et données récapitulatives

D'autres molécules ou macromolécules peuvent faire l'objet d'applications intéressantes en tant qu'espèces cibles, en particulier un grand nombre de petites molécules chimiques (pesticides, phyto-œstrogènes) ou biochimiques (hormones protéiques, toxines d'origine bactérienne), des protéines d'intérêt médical. Elles ne sont pas détaillées ici dans la mesure où elles présentent *a priori* une complexité moins grande, du point de vue de leur détection, que les organismes comme les bactéries ou les virus, si ce n'est que, du fait de leur petite taille, elles nécessitent des sensibilités très élevées.

Le tableau ci-après regroupe les paramètres géométriques (dimensions, masses) d'un panel d'espèces cibles, des très petites molécules aux bactéries de grande taille. Les valeurs indiquées sont des valeurs approximatives rencontrées dans la littérature.

Tableau 4. 1 : Dimensions et masses d'espèces biologiques d'intérêt.

Nom	Dimensions (nm)	Masse Molaire (g/mol)*	Masse (Da - kg)	Masse relative (Masse IgG = 1)
Phyto-œstrogènes (ex. isoflavone)		~100 (238)	~100 - ~1,7.10 ⁻²⁵ (238 - 4.10 ⁻²⁵)	~0,7.10 ⁻³ (1,6.10 ⁻³)
Toxines		<i>100 à qqs 10⁴</i>	100 à qqs 10 k - ~10 ⁻²⁵ à 10 ⁻²²	~10 ⁻³ à 1
Allergènes alimentaires		<i>qqs 10.10³</i>	~10 k à 70 k - qqs 10 ⁻²³	qqs 10 ⁻¹
Peroxydase (marqueur)		<i>44.10³</i>	44 k - 7,3.10 ⁻²³	0,29
Ovalbumine		<i>45.10³</i>	45 k - 7,5.10 ⁻²³	0,3
Albumine de Sérum (protéine BSA, HSA)		<i>67.10³</i>	67 k - 1,1.10 ⁻²²	0,45
Anticorps IgG	Ø5x10	<i>150.10³</i>	150 k - 2,5.10 ⁻²²	1
IgM		<i>935.10³</i>	935 k - 1,6.10 ⁻²¹	6,2
Thyroglobuline		<i>400.10³</i>	400 k - 6,6.10 ⁻²²	2,7
Bactériophage M13	Ø9x900	NA**	NA** - 3.10 ⁻¹⁸	12.10 ³
<i>Escherichia coli</i>	Ø500x2000	NA**	NA** - 1.10 ⁻¹⁵ sec (30%) : 3.10 ⁻¹⁶	4.10 ⁶ sec : 1,2.10 ⁶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ø...x3000	NA**		
<i>Bacillus anthracis</i>	Ø1000x3000	NA**		
Bacille tétanique	Ø400x3000	NA**		
Spore	Ø800x1600			
Toxine tétanique			140 k - 2,3.10 ⁻²²	0,9

* La masse de protéines ou ensembles de protéines est généralement exprimée en Da, une masse molaire équivalente est toutefois indiquée ici, en italique dans ce cas, pour comparer les masses respectives des espèces entre elles.

**NA : Non Applicable ou sans intérêt.

3 Le modèle biologique couche sensible - espèce cible

3.1 Interactions antigènes - anticorps

Le système immunitaire constitue un moyen de lutte des différentes espèces animales contre des agressions infectieuses et parasitaires. Bien que la plupart de ces agressions soient stoppées par la peau, beaucoup d'agents pathogènes pénètrent par les voies aériennes, digestives ou urogénitales.

Les défenses immunitaires doivent donc être spécifiquement dirigées contre les substances étrangères (non soi), et ne pas attaquer les tissus propres de l'individu (soi). Les substances immunogènes, c'est-à-dire capables d'induire une réaction immunitaire (production d'anticorps spécifiques), sont les antigènes. Les antigènes réagissent aussi avec les anticorps qu'ils ont fait apparaître dans l'organisme vivant. Notons que de petites molécules organiques, appelées haptènes, ne sont pas immunogènes, mais peuvent aussi réagir avec des anticorps déjà formés.

Les anticorps, aussi appelés immunoglobulines, sont des glycoprotéines présentant une même structure de base, et sont différents au niveau de la région qui les lie à l'antigène (région variable). Un grand nombre d'antigènes peut être reconnu grâce à la grande diversité et la spécificité des anticorps. Il existe cinq classes d'immunoglobulines différenciées par leurs structures et leurs fonctions : IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, les IgG étant les plus courantes. La figure suivante représente la structure d'une immunoglobuline G, avec le fragment

cristallisable F_c composé de deux chaînes lourdes (environ 450 acides aminés), et les deux fragments F_{ab} constitués chacun d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. L'ensemble représente une masse molaire de 150 kDa et un volume de l'ordre de $15 \times (5 \text{ à } 10) \times 5 \text{ nm}^3$, ces dimensions pouvant varier du fait de la flexibilité de la région charnière. On retrouve aussi les groupements NH_2 et COOH aux extrémités des chaînes protéiques (cf annexe « Eléments de Biochimie »).

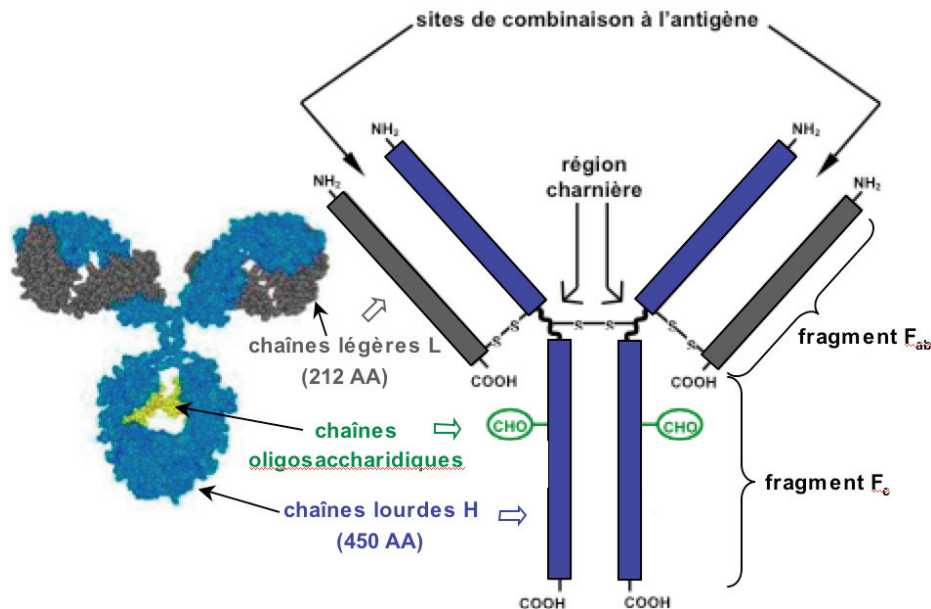


Figure 4. 8 : Structure d'un anticorps, ici une immunoglobuline G (d'après [MAI04]).

Antigènes et anticorps s'agglutinent. Les forces mises en jeu lors des interactions antigènes – anticorps sont des liaisons chimiques faibles. Ces différentes liaisons sont :

- les liaisons hydrogènes : liaison entre un atome d'hydrogène d'une molécule et un doublet libre d'un atome très électronégatif (par exemple, l'oxygène d'une autre molécule)
- les forces électrostatiques : attraction de deux groupes ioniques de charges opposées
- les forces de Van der Waals : interactions entre deux dipôles électrostatiques
- les liaisons hydrophobes, association de groupements non polaires hydrophobes d'où les molécules d'eau sont exclues.

La cohésion est assurée également par la pression hydrostatique exercée par les molécules d'eau voisines. Ces différentes liaisons, bien que faibles, assurent par leur grand nombre une énergie de liaison assez élevée. Comme nous le verrons par la suite, les énergies de liaison mises en jeu nous permettront de déstabiliser la liaison anticorps-antigène, dans un but de dénombrement et de régénération du capteur en gardant la même couche sensible.

3.2 Choix de modèle biologique

Dans le cadre de nos premières études de faisabilité de détection en milieu liquide, une IgG anti M13 (noté AM13) de souris, et un bactériophage M13, représenté ci-dessous, ont été utilisés. Nous mentionnerons en particulier la différence de masse entre le phage et l'anticorps : le M13 ($3 \cdot 10^{-18}$ kg) est environ 10000 fois plus « lourd » que le AM13 (150 kDa, soit $2,5 \cdot 10^{-22}$ kg).

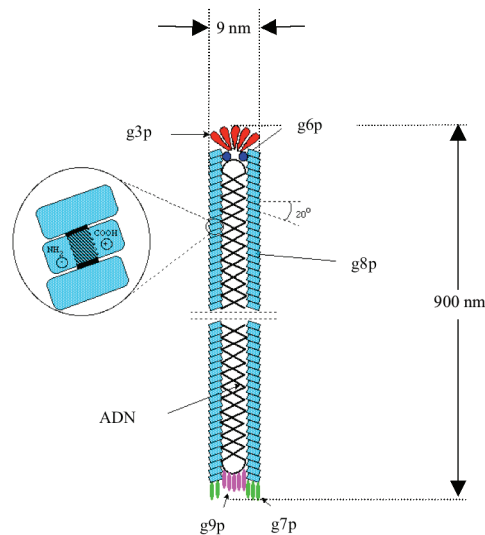


Figure 4. 9 : Représentation du bactériophage M13 [LEI].

Plusieurs propriétés ont motivé le choix du bactériophage M13, virus infectieux de bactéries, comme cible « modèle » :

- tout d'abord, la numération des bactériophages M13 est facilitée par leur propriété d'infecter spécifiquement des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) mâles et de former des plages de lyse sur un tapis bactérien ;
- ensuite l'anticorps monoclonal de souris reconnaît de façon spécifique la protéine g8p présente à de nombreux exemplaires à la surface du bactériophage M13 (cf. figure ci-dessus) ;
- de plus, la grande taille du M13 est comparable à celle de nombreux virus pathogènes, et sa masse assez élevée permettra d'avoir un « fort » effet de masse lors de l'immobilisation, ce qui sera intéressant pour les premiers tests de faisabilité.

Pour un bactériophage présentant la forme allongée du M13, le signal acoustique dépendra de la façon dont seront effectivement immobilisés les M13 (cf. figure suivante). En position « couchée », un M13 occupera une surface d'environ $8 \cdot 10^3 \text{ nm}^2$, soit la surface d'environ quatre-vingt anticorps, le AM13 présentant une surface d'immobilisation spécifique de l'ordre de 100 nm^2 . En position « debout » il n'occupera qu'un anticorps. Cependant, l'anticorps étant dirigé contre la protéine g8p, qui est absente des extrémités du phage, la position debout ne devrait pouvoir se produire qu'en présence d'une très grande quantité de phages.

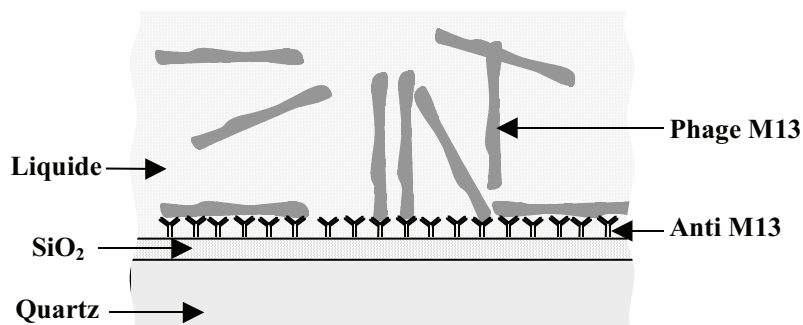


Figure 4. 10 : Immobilisations possibles entre les phages et les anticorps.

4 La membrane biologique sensible

La première étape qui permet d'avoir une ligne à retard en configuration capteur consiste à déposer une membrane d'anticorps AM13 à la surface du SiO₂, compatible avec la propagation des ondes de Love, et conservant ses propriétés d'immobilisation sélective vis-à-vis du bactériophage cible. Après une première étude de faisabilité qui fait l'objet des deux premiers paragraphes, une voie d'amélioration du greffage par modification chimique est en cours d'étude et les premiers résultats font l'objet du troisième paragraphe.

4.1 Greffage des anticorps sur la ligne à retard

4.1.1 Protocole de greffage

L'immobilisation de cette couche sensible s'effectue en milieu liquide tamponné (PBS : Phosphate Buffered Saline), à une température de 37°C en général, ou à température ambiante. La cellule utilisée pour ces premiers travaux sur le greffage des anticorps est celle décrite dans le chapitre précédent, avec une cellule et un joint en téflon, résistant aux produits tels que l'acide sulfurique et l'acétone, utilisés lors de la procédure de nettoyage de la surface de la ligne à retard, et présentant peu d'affinités vis-à-vis des protéines utilisées (anticorps et bactériophages).

Afin de promouvoir l'immobilisation des AM13, une étape préliminaire de préparation de la surface du SiO₂ est mise en œuvre. Une molécule de DTSP [3,3' dithio-bis (propionic acid N-hydroxysuccinimide ester)] est utilisée, elle se fixe à la surface du SiO₂, puis l'anticorps peut s'accrocher sur la partie libre de cette molécule.

Enfin les sites non spécifiques sont saturés avec une solution de BSA (Bovine Serum Albumin). Ainsi, le M13 (le polluant) s'accrochera uniquement sur l'anticorps spécifique.

Les différentes solutions utilisées ont les propriétés suivantes :

- H₂SO₄ : acide sulfurique (4N).
- H₂O : eau distillée.
- Ethanol : Solution d'éthanol à 95 %.
- Acétone
- PBS : solution saline tamponnée
(NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,45 mM).
- DTSP/DMSO : DTSP à 0,4 % dans du DMSO (dimethylsulfoxyde).
- Anticorps AM13 : anti M13-gP8 monoclonal (Amersham-Pharmacia Biotech)
solution finale : 250 µg.ml⁻¹ (pour cette étape de faisabilité),
la concentration sera ensuite diminuée en phase d'amélioration.
- Anticorps secondaire pour test ELISA : GAM-PO
anticorps de chèvre anti-IgG de souris (« Goat Anti Mouse »)
marqué avec une enzyme (peroxydase)
- PBS/BSA : BSA (Bovine Serum Albumin) à 0,1 % dans du PBS.

Le protocole détaillé est décrit dans le tableau ci-après. Notons que, dans une phase d'amélioration mettant en œuvre ou non de nouveaux agents de couplage (cf. §4.3), l'étape de nettoyage sera modifiée en remplaçant le bain d'acide sulfurique par une insolation UV-ozone, ne nécessitant pas de rinçage délicat et moins agressif pour la surface du capteur.





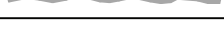








Étape	Action	Représentation schématique	Durée
Nettoyage de la surface du SiO₂.	500 μ L d'une solution d'acide sulfurique (H ₂ SO ₄ 4N).		10 minutes
	500 μ L d'eau (3 fois).		10 minutes
	500 μ L d'éthanol (2 fois).		10 minutes
	500 μ L d'acétone (2 fois).		10 minutes
	Rinçage au PBS (3 fois).		
Préparation du greffage.	500 μ L d'une solution de DTSP dans du DMSO à 0,4 %.		75 minutes
	Rinçage au PBS (2 fois).		
Greffage de l'anticorps.	400 μ L de PBS.		10 minutes
	+ 100 μ L d'anticorps.		180 minutes
	Rinçage au PBS (2 fois).		
Saturation.	500 μ L d'une solution de PBS BSA à 0,1 %.		75 minutes
	Rinçage au PBS (2 fois).		
Stockage.	500 μ L de PBS.		

Figure 4. 11 : Protocole de greffage de l'anticorps anti M13 sur la surface de la ligne à retard.

4.1.2 Validation immunologique du greffage

Afin de vérifier le greffage de la couche sensible, et l'accessibilité des sites actifs, une technique immunologique (la méthode ELISA) a été utilisée. La méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), consiste à révéler la présence d'anticorps quand l'antigène correspondant est fixé sur un support. La présence de l'anticorps est révélée par une réaction enzymatique colorée.

La présence du AM13 de souris sur la surface de la ligne à retard (SiO₂) a été vérifiée à l'aide d'un anticorps de chèvre anti-IgG de souris (« Goat Anti Mouse ») marqué avec une enzyme (peroxydase), que l'on note GAM-PO. Cette biomolécule s'accroche sur toutes les immunoglobulines IgG de souris donc sur le AM13 de souris. Puis une solution d'OPD (orthophénylènediamine) et H₂O₂ (eau oxygénée) est ajoutée. Cette solution incolore réagit avec la peroxydase donnant une réaction colorée quantifiable grâce à un colorimètre ELISA.

La présence de l'anticorps immobilisé a aussi été vérifiée sur un autre type de biomolécule, toujours en utilisant la méthode ELISA. Ce test a également permis de valider la fonctionnalité de l'anticorps en mesurant la possibilité d'un anticorps anti salmonelle de se lier à son antigène (une bactérie salmonelle) après greffage sur la surface de la ligne à retard. Pour cela, une solution contenant la bactérie est placée en incubation sur le capteur revêtu de la couche d'anticorps. Puis la liaison bactérie – anticorps est rompue par une élution à faible pH (Glycine 0,1 M, pH 2,2). Après neutralisation du pH, les bactéries éluées sont déposées sur un milieu spécifique dans une boîte de Pétri, et après une nuit d'incubation à 37°C, les

colonies formées sont comptées. Leur présence effective valide le protocole de dépôt et de fonctionnalité de la couche sensible d'anticorps.

4.2 Réponse temps réel du capteur au greffage des anticorps

La ligne à retard utilisée pour ces expériences de détection est identique à celle utilisée pour la caractérisation physique des milieux liquides (cf. chapitre 3). La ligne à retard est montée en oscillateur, les manipulations biologiques sont effectuées sous hotte P₂ (Protégée), et le système est thermorégulé à une température de 37°C. Les mesures en fréquence et en température sont effectuées toutes les 10 secondes.

Sur la figure suivante est représentée une acquisition en fréquence pendant le protocole de dépôt du AM13 sur le capteur.

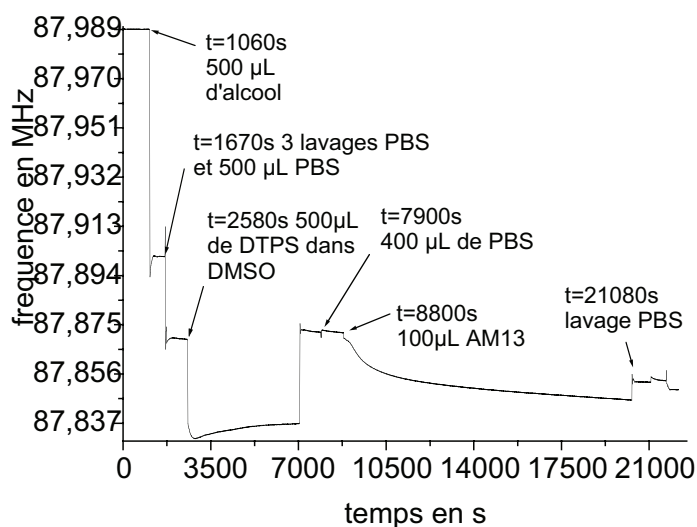


Figure 4. 12 : Réponse en fréquence du capteur lors du protocole de dépôt de la couche sensible.

Notons que, à chaque étape du protocole, la réponse en fréquence du capteur est quasi instantanée. Lors de l'ajout d'un liquide, la fréquence d'oscillation du capteur se stabilise au voisinage d'une fréquence d'équilibre (fonction des propriétés du liquide) dans un temps très court (quelques dizaines de secondes) correspondant à la stabilisation de l'environnement du capteur (homogénéisation du liquide en cas de mélange, stabilisation de la température).

La réponse de la ligne à retard peut s'expliquer durant tout le protocole si nous tenons compte des viscosités des différentes solutions ($\eta_{\text{DTSP/DMSO}} > \eta_{\text{PBS}} > \eta_{\text{éthanol}}$), avec une sensibilité du dispositif évaluée expérimentalement à 627 ppm/cP^{0,5}, de la variation de température, avec une sensibilité de la fréquence d'environ + 40 ppm/°C, soit +3,6 kHz/°C, et de l'immobilisation progressive des AM13.

Nous avons représenté à la figure ci-après un zoom de l'acquisition en fréquence et en température correspondant à l'étape de dépôt de l'anti M13.

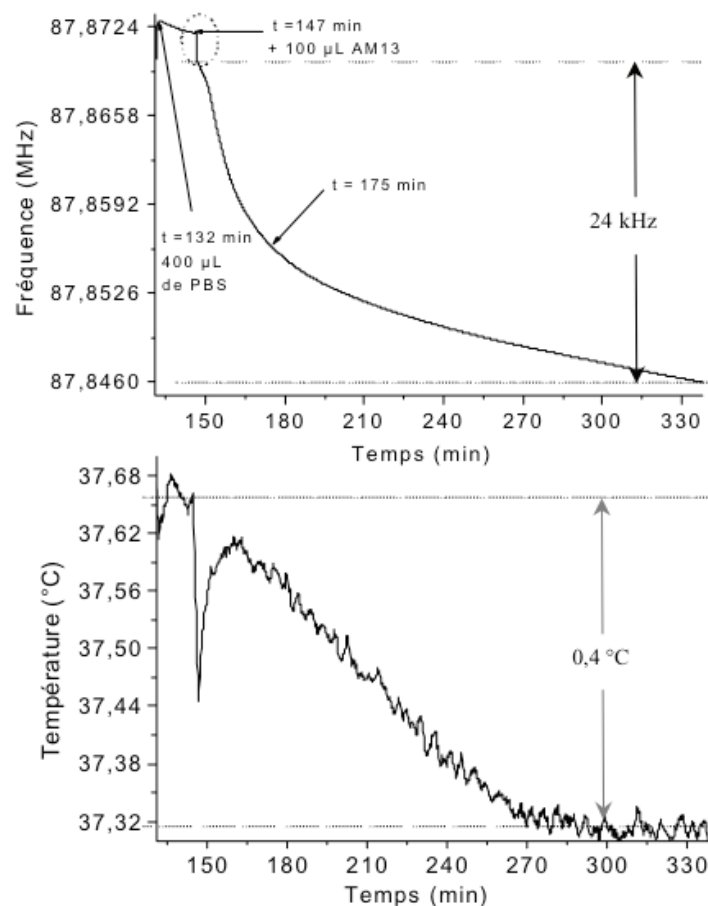


Figure 4. 13 : Réponse en fréquence de la ligne à retard (en haut) et température (en bas) du système lors du dépôt de la couche sensible.

Nous pouvons distinguer sur ces courbes les deux étapes de l'introduction des AM13 dans la cellule de test. Tout d'abord, à $t = 132$ min, une solution de 400 μ L de PBS est injectée dans la cellule afin de se placer dans des conditions de liquide semi-infini. Après stabilisation de la fréquence ($\approx 1 \text{ Hz}\cdot\text{s}^{-1}$ durant 30 s) 100 μ L de la solution d'anticorps est introduite. Nous distinguons alors trois domaines distincts qui dépendent de la cinétique du dépôt de la couche.

- Tout d'abord juste après l'ajout de la solution d'anticorps, nous observons une diminution très rapide de la fréquence d'oscillation du capteur due à la modification des propriétés physiques du liquide (mise en évidence par une zone encadrée sur la figure précédente en haut).
- Ensuite, pendant environ 30 minutes, nous constatons une diminution très significative du signal qui témoigne du fait que les anticorps se greffent en grand nombre sur la surface libre du capteur.
- Enfin, il apparaît une saturation progressive du signal qui s'explique par le fait que la plus grande partie de la surface du capteur est déjà occupée par les anticorps, ce qui ralentit la suite du greffage.

Ainsi la variation de fréquence que l'on peut attribuer au greffage de la couche sensible est estimée à -24 kHz après trois heures d'incubation. La variation de température observée durant cette immobilisation est de $-0,4^{\circ}\text{C}$, qui correspond à une variation de fréquence de $-1,5 \text{ kHz}$, avec une précision estimée à $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$, intégrant la résolution du

capteur et les variations rapides de température en début d'étape. Cela ramènerait à $-22,5 \pm 0,7$ kHz la variation de fréquence corrigée correspondant au greffage, en considérant l'influence de la température sur le dispositif et sans tenir compte de celle sur les paramètres physiques des liquides. Trois dépôts suivant le même protocole, réalisés sur deux dispositifs identiques, ont donné des variations de fréquence relativement voisines, de $-23,9$ à $-25,6$ kHz ($-22,4$ à $-24,1$ kHz après correction en température).

Ce greffage a ainsi permis de montrer la faisabilité du biocapteur à ondes acoustiques, comme cela est présenté plus loin (paragraphe 5), et a également mis en évidence la possibilité de suivre en temps réel le greffage des anticorps, sans avoir recours aux méthodes biochimiques, comme la méthode ELISA, l'une des plus utilisées en biologie, qui nécessitent des manipulations supplémentaires, longues et destructrices.

4.3 Amélioration du greffage des anticorps

Néanmoins, d'un point de vue reproductibilité et contrôle du greffage obtenu, en fonction de l'état de surface présenté par le capteur, il est apparu nécessaire d'étudier de nouveaux protocoles, permettant notamment un greffage covalent [KUS03]. Ainsi, des agents de couplage silylés donnant des monocouches autoassemblées denses, validés lors de l'élaboration de puces à ADN [BEN01a, BEN01b], seront utilisés [NAV01, MAR05a]. Parallèlement, de nouveaux agents de couplage silylés seront recherchés afin d'éviter une étape supplémentaire, pas toujours bien contrôlée, de modification de surface par des « cross-linkers » classiquement utilisés en biologie pour fixer les anticorps. Ces améliorations, en cours d'étude en collaboration avec le LCOO, font l'objet du paragraphe suivant et les premiers résultats ont fait l'objet d'une communication [MOL05].

4.3.1 GPTS

En effet, le DTSP est un agent de couplage typiquement utilisé sur des surfaces d'or pour fixer des protéines et des groupements amines d'enzymes [DAR99], mais il n'assure pas une liaison covalente sur le SiO_2 . Les réponses de différents capteurs ainsi que des tests immunologiques ont permis de vérifier une mauvaise reproductibilité de la liaison (cf. figure ci-après, à gauche), en particulier sur des surfaces rugueuses, parfois obtenues du fait de contraintes technologiques fortes lors de la réalisation du dépôt du SiO_2 .

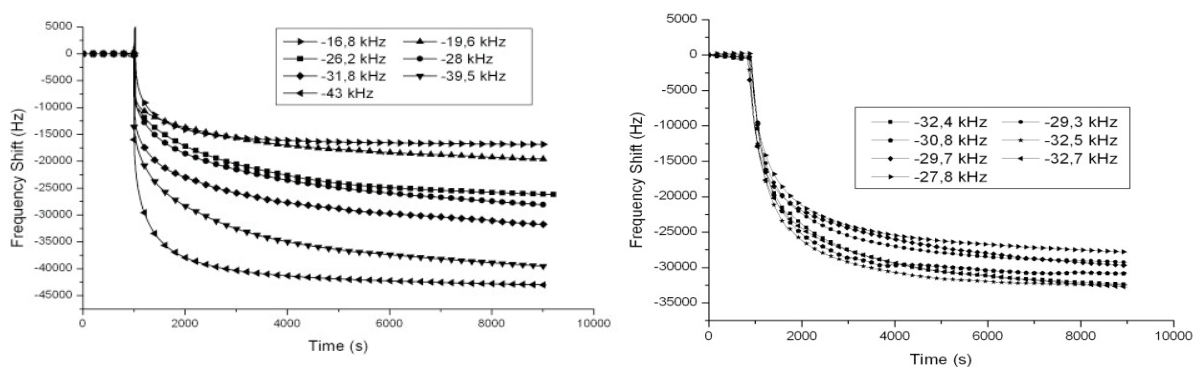


Figure 4. 14 : Réponses de capteurs au greffage d'anticorps monoclonaux anti *E. coli* en concentration $200 \mu\text{g/mL}$ sur DTSP (à gauche) et d'anticorps anti-souris à $50 \mu\text{g/mL}$ sur GPTS (à droite).

Le GPTS ((3-Glycidoxypropyl)triméthoxysilane), représenté ci-dessous à gauche, est un agent de couplage silylé pouvant être lié de façon covalente sur des substrats de SiO_2 par réaction entre les groupements silanols de la surface et les parties alkoxy-silanes du GPTS (cf.

figure suivante, à droite). Ensuite, les anticorps sont liés de façon covalente avec la surface ainsi modifiée, par réaction entre le groupement époxy du GPTS et le groupement amine des anticorps [KUS03].

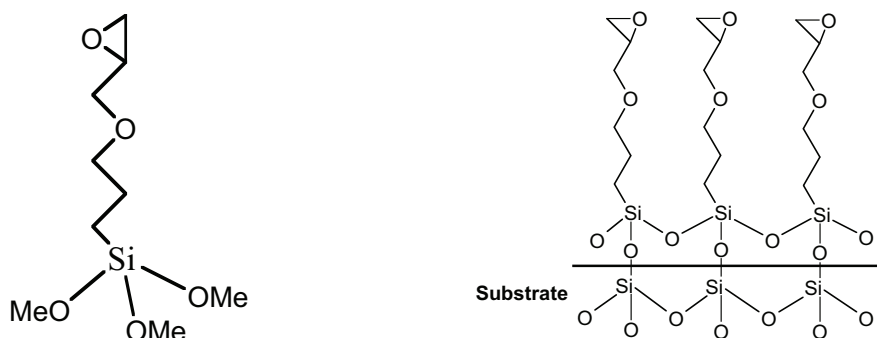


Figure 4. 15 : Représentation symbolique du GPTS ((3-Glycidoxypropyl)triméthoxysilane) (à droite) et de la surface Si/SiO₂ silanisée avec du GPTS.

Pour fonctionnaliser le capteur, le GPTS (1% dans le toluène) est incubé en présence d'un catalyseur (acide acétique), le capteur est ensuite rincé, nettoyé aux ultra-sons et séché sous un flux d'azote. La suite du protocole de greffage des anticorps et de saturation est ensuite identique, avec toutefois des concentrations réduites des solutions d'anticorps.

Les réponses typiques des capteurs au greffage des anticorps après modification par le GPTS ont montré une meilleure reproductibilité (cf. figure XXX à droite). La réponse (cf. figure ci-après à gauche) au greffage d'anticorps monoclonaux à une concentration de 50 µg/mL montre une variation de fréquence proche de 28 kHz, et une variation de fréquence supplémentaire due à la saturation à la BSA de seulement 2 kHz. Cette faible valeur est liée à un bon recouvrement de la surface par les anticorps, laissant peu de sites silanols libres. Ce recouvrement plus uniforme qu'avec le DTSP a été confirmé par des tests immunologiques.

Du point de vue de l'orientation des anticorps, les acides aminés par centaines dont ils sont composés [WU70] offrent des groupements amines aussi bien sur la région fixe que sur la région variable et notamment les sites antigéniques. Aussi, comme le DTSP, le GPTS est supposé immobiliser les anticorps sans imposer leur orientation.

4.3.2 Protéine G

La protéine G est utilisée pour ses propriétés de lier spécifiquement la molécule d'immunoglobuline par sa région fixe, sans interagir avec son site antigénique [AKE85]. Avec la protéine G, le greffage n'est pas covalent mais il est fort du fait de la grande affinité entre la protéine et l'anticorps. Cependant, la réponse du capteur au greffage de la protéine est faible (figure ci-après à droite), ce faible taux d'accrochage a été confirmé par des tests immunologiques, et est en accord avec la forte réponse du capteur à la saturation par la BSA, du fait d'un grand nombre de sites silanols restés libres après incubation de la protéine G.

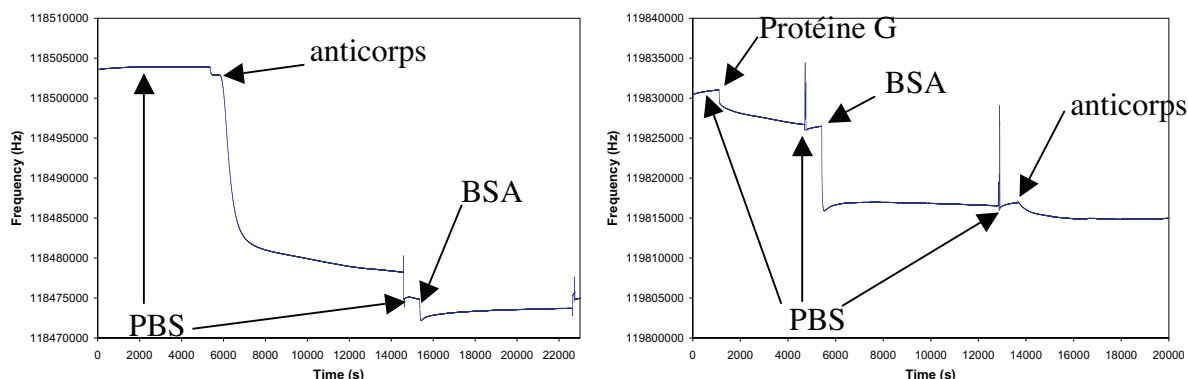


Figure 4. 16 : Réponses du capteur au greffage des anticorps et saturation sur une surface de SiO_2 modifiée par le GPTS (à gauche) et la protéine G (à droite).

Ainsi, les anticorps résultants sont *a priori* bien orientés, mais ils sont greffés de façon beaucoup moins dense sur la surface du capteur, par rapport à la fonctionnalisation avec le GPTS, comme le montrent les parties des deux courbes illustrant la réponse au greffage des anticorps : environ -28 kHz avec le GPTS, seulement -3 kHz avec la protéine G. Ces efforts visant à développer des surfaces adaptées à l'immunodétection se poursuivent actuellement.

5 Détection du bactériophage

Nous décrivons dans cette partie des résultats obtenus principalement sur les dispositifs de première génération, dans le cadre des travaux de thèse de O. Tamarin [TAM02]. En particulier les éléments concernant les protocoles d'immobilisation et de sa validation biologique sont ceux utilisés pour ces expérimentations. Quelques résultats récents à l'aide des nouveaux dispositifs (cellules de test, modifications de surface) seront donnés plus loin et sont susceptibles d'avoir été réalisés en suivant des protocoles légèrement différents, ne remettant toutefois pas en cause l'approche globale.

5.1 Immobilisation sur le capteur

L'immobilisation de l'espèce cible sur le capteur comportera typiquement les étapes suivantes : nettoyage, solution de référence, ajout de solution identique contenant l'espèce cible, incubation, rinçage.

5.1.1 Protocole d'immobilisation





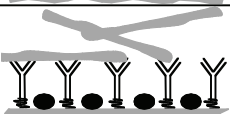
Pour les différentes expériences, une solution de bactériophages est titrée selon la méthode décrite au paragraphe suivant. Ainsi nous disposons d'une solution à partir de laquelle nous pouvons préparer des échantillons de test à la concentration souhaitée.

La longue durée du protocole du greffage de l'anticorps (environ sept heures) nécessite de réaliser les expériences de greffage de la couche sensible et d'immobilisation du phage sur deux jours. Entre les deux expériences, le capteur est stocké dans une solution de PBS à 4°C durant toute une nuit.

Au début de la seconde étape, nous imposons et attendons la stabilisation de la température du système au voisinage de 37°C.

Puis l'immobilisation du bactériophage est réalisée suivant le protocole décrit dans le tableau suivant. Le principe de l'introduction de la solution de bactériophages dans la cellule de mesure est identique à celui de l'introduction de l'anticorps. Tout d'abord une solution

initiale de PBS est placée dans la cellule de manière à assurer un milieu semi-infini. Puis après la stabilisation de la fréquence d'oscillation du capteur, une solution de bactériophages est injectée.

Etape	Action	Représentation	Durée
Nettoyage du capteur.	Rinçage au PBS (2 fois).		10 minutes
	500 μL d'une solution PBS (2 fois).		
	500 μL d'une solution d'eau pure		
Immobilisation du bactériophage	500 μL d'une solution PBS		2 heures
	+ XX μL d'une solution de bactériophages*		

* Le volume et la concentration en pfu.mL⁻¹ de la solution de bactériophages sont choisis en fonction de l'application souhaitée. Le pfu, pour Plaque-Forming Unit, est le nombre de plages de lyse comptabilisées sur une boîte de Pétri après infection de bactéries E. coli par les bactériophages M13.

Figure 4. 17 : Protocole d'immobilisation du bactériophage M13 sur la surface du capteur.

5.1.2 Validation biologique de l'immobilisation : élution et titrage

Comme dans le cas du greffage de la couche sensible, il est possible de vérifier par des méthodes immunologiques l'immobilisation du bactériophage sur le capteur, ainsi que d'estimer la quantité effectivement immobilisée. Cette quantification s'appelle le « titrage » (souvent appelé « titration » qui est le terme anglo-saxon). Elle est possible après « élution » des bactériophages accrochés en surface.

L'élution consiste à « décrocher » les bactériophages immobilisés sur la surface du capteur, elle s'effectue juste après les deux heures de détection. Dans un premier temps, la solution présente dans la cellule (PBS + phages non accrochés) est prélevée et stockée dans un premier tube à essais. Puis, 10 rinçages successifs avec une solution de TBS/Tween (Tris : 25mM, NaCl : 136 mM, KCl : 20,7 mM et 0,1% Tween 20) sont destinés à enlever les bactériophages restant non accrochés dans la cellule. Enfin, l'élution des bactériophages immobilisés se fait avec 500 μL d'une solution de glycine (0.1 M, pH 2.2) pendant 10 minutes, cette dernière est tamponnée avec du TrisHCl (1 M, pH 9). Les bactériophages ainsi élués et présents dans la solution glycine / TrisHCL sont stockés dans un second tube à essais.

Deux titrages complémentaires sont réalisés. Les bactériophages dénombrés dans le second tube à essais correspondent à ceux qui ont été effectivement immobilisés puis élués. Les bactériophages non immobilisés, dénombrés dans le premier tube à essais, permettent de confirmer les résultats obtenus avec plus ou moins de précision selon les quantités relatives de phages immobilisés et non immobilisés.

La procédure de titrage consiste dans un premier temps à diluer plusieurs fois la solution de bactériophages. Un volume de 100 μL de chacune des dilutions est mis en

incubation avec 200 μL de cellules *E. coli* durant 30 minutes afin de permettre l'infection des bactéries indicatrices par les bactériophages.

Puis l'ensemble bactériophages + bactéries indicatrices est mélangé à 3 mL de gélose molle maintenue à 56°C. L'ensemble est rapidement étalé en deuxième couche dans une boîte de Pétri contenant 30 mL de gélose dure LB (10 g.L⁻¹ Bacto-Tryptone, 5 g.L⁻¹ Yeast extract, 10 g.L⁻¹ NaCl, et 15 g.L⁻¹ d'Agar pour la dureté).

Enfin, après une nuit d'incubation à 37 °C, les plages formées sont comptées, et le nombre de phages en pfu.mL⁻¹ est ainsi déterminé.

5.2 Réponse temps réel du capteur

5.2.1 Réponse typique

Notons que les courbes présentées dans ce paragraphe et le suivant ont fait l'objet d'une correction en température. Sur la figure suivante est représenté un exemple typique de la réponse du capteur lors de la détection du bactériophage. Elle est constituée au début de la ligne de base réalisée avec 500 μL de PBS, jusqu'à atteindre la stabilisation du signal à environ 1 Hz.s⁻¹. Puis 100 μL d'une solution de bactériophages à 10¹² pfu.mL⁻¹ est injectée dans la cellule.

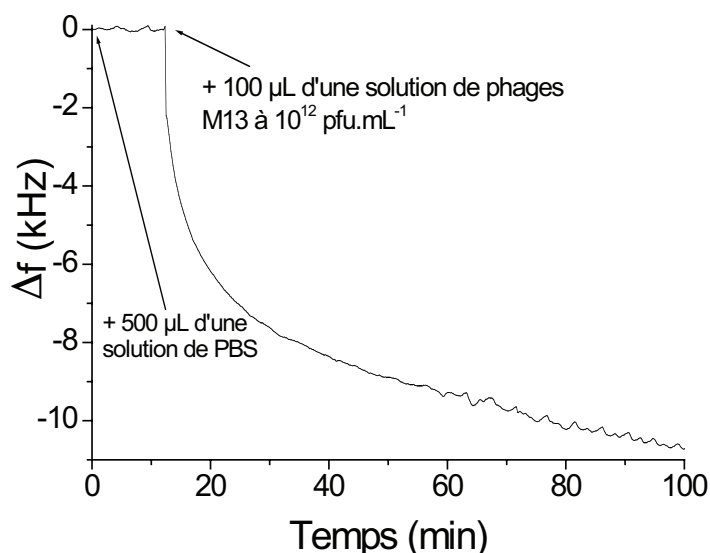


Figure 4. 18 : Réponse typique d'un capteur à la détection de bactériophages M13.

Cette réponse présente les trois domaines communs à ce type d'expérience à partir de l'introduction de la solution de bactériophages, qui dépendent de la cinétique de la réaction :

- Tout d'abord, comme pour le greffage du AM13, nous observons une diminution très rapide de la fréquence (environ 10 secondes), liée à la variation des propriétés physiques de l'échantillon dans la cellule.
- Puis durant 15 minutes environ, la fréquence varie rapidement (environ -10 Hz.s⁻¹), du fait de l'accrochage rapide des bactériophages sur les multiples sites AM13 accessibles et fonctionnels. L'accumulation de masse est importante durant ces premières minutes.
- Enfin, à partir de la quinzième minute environ, apparaît une saturation progressive du signal (≈ -2 Hz.s⁻¹), de nombreux sites étant déjà occupés par les bactériophages. L'accumulation de masse est moins rapide qu'au début.

Par ailleurs, une deuxième utilisation de la couche sensible d'anticorps, après élimination des phages, afin d'effectuer une détection supplémentaire a été tentée sans succès. En effet nous n'observons pas de signal acoustique significatif pour des quantités de phages injectés similaires aux expériences précédentes.

Dans la plupart des applications biocapteur, les dispositifs sont utilisés pour une mesure unique, aussi nous n'avons pas poussé plus loin à ce stade les investigations permettant de réaliser un capteur réutilisable.

5.2.2 Influence de la concentration de bactériophages

Afin de pouvoir comparer la réponse du capteur en fonction de différentes concentrations de bactériophages, nous nous intéressons au signal correspondant à l'accumulation de masse, soit aux second et troisième domaines de la réponse du capteur. Ainsi nous ne tenons pas compte des effets des propriétés physiques des échantillons de solutions de bactériophages sur le signal (ces propriétés différant légèrement selon les dilutions considérées).

Sur la figure suivante sont superposées les réponses du capteur pour différentes concentrations de bactériophages dans la cellule (en tenant compte du volume total de liquide), avec en particulier un zoom sur les 15 premières minutes de détection.

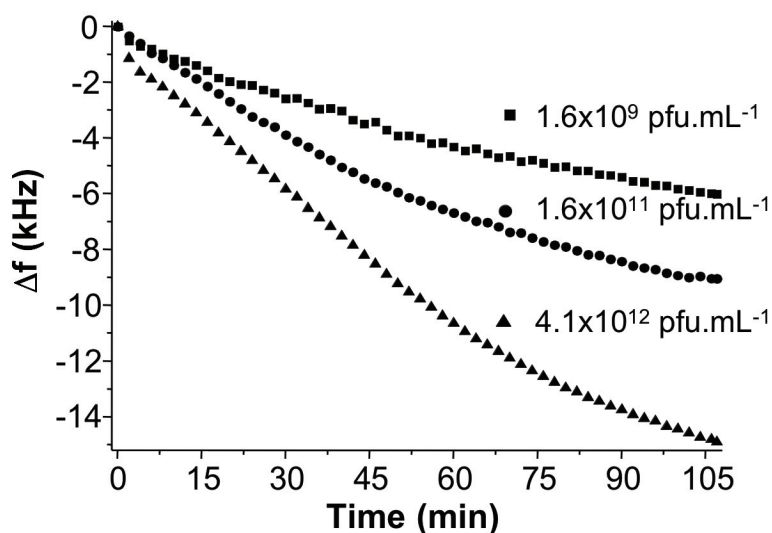


Figure 4. 19 : Réponse du capteur en fonction de la concentration de phages.

Les résultats obtenus montrent une réponse du capteur qui augmente avec la concentration de bactériophages, comme l'on pouvait s'y attendre.

5.2.3 Comparaison avec la réponse de microbalances à quartz (QCM)

Nous pouvons comparer ces résultats avec des travaux similaires réalisés en 2001 par Uttenthaler *et al.* [UTT01] qui utilisent des microbalances à quartz ou QCM. Ces derniers détectent des bactériophages M13, en analysant le signal obtenu après 10 min en fonction de la concentration injectée dans la cellule. Les meilleures performances obtenues sont celles utilisant un dispositif QCM très haute fréquence (70 MHz) : ils obtiennent ainsi une variation de fréquence -410 Hz en 10 minutes (-7 ppm en variation relative de fréquence) pour une concentration de bactériophages M13 de 10^9 pfu.mL⁻¹.

Sur la figure précédente, pour la plus petite concentration de phage injectée ($1,6 \cdot 10^9$ pfu.mL⁻¹), nous observons avec le dispositif à ondes de Love une variation de la fréquence d'oscillation du capteur de $-1,15$ kHz environ après 10 minutes et -6 kHz après deux heures (ce qui correspond respectivement à une variation de fréquence relative de -14 ppm, et de -69 ppm).

Ainsi les premiers essais de détection avec le dispositif à ondes de Love montrent une variation relative de fréquence supérieure au bout de 10 minutes à celle obtenue avec ce dispositif à ondes de volume haute fréquence. De plus, le dispositif à ondes de Love est loin de la saturation au bout de 10 min, contrairement aux QCM. Un temps d'intégration plus long, ou un traitement du signal adapté pour prendre en compte la dynamique de la réponse, permettront d'améliorer considérablement ce résultat.

Enfin, l'optimisation de plusieurs paramètres (fréquence de fonctionnement, matériaux utilisés...) permettront d'améliorer la sensibilité actuelle pour des études futures. De même, ces améliorations, ainsi que celles du banc de test, permettront d'augmenter les performances du capteur.

5.3 Analyse de la sensibilité du capteur

5.3.1 Réponse du capteur à l'accumulation de masse

Afin d'analyser les performances du capteur en terme d'effet de masse, nous présentons sur la figure suivante la variation de fréquence obtenue pour les deux derniers domaines d'une réponse à la détection en fonction de la masse de bactériophage estimée après élution et titration. Pour les calculs, nous considérons qu'un pfu titré représente un phage.

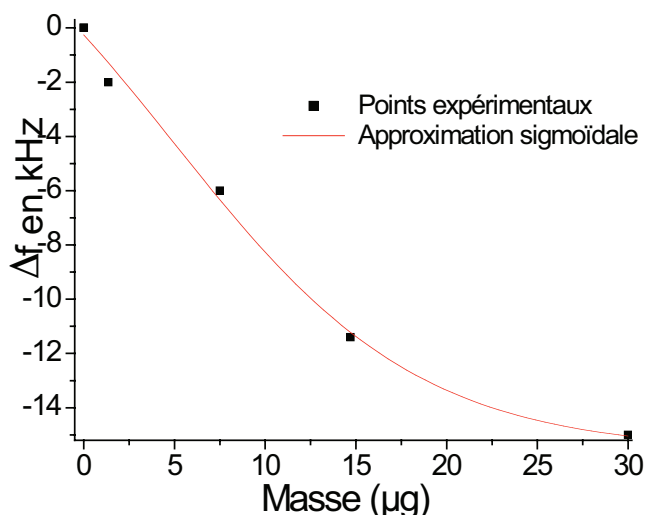


Figure 4. 20 : Variation de fréquence du capteur en fonction de la masse de bactériophages titrés (1 pfu = 1 phage).

Sur cette figure, une approximation sigmoïdale permet d'estimer la réponse du capteur sur une gamme de masse accumulée allant de 0 à 30 μg . Nous observons une réponse quasi linéaire pour les masses allant de 0 à 15 μg environ, compatible avec la prise en compte d'un effet de masse pur. De 15 μg à 30 μg une saturation du signal apparaît, qui peut être liée à une saturation des sites disponibles du biocapteur, et/ou, comme cela semble se produire dans le cas des détections en milieu gazeux, à des effets venant se superposer de façon non négligeable à l'effet de masse pur, par exemple une modification du caractère visqueux de la

couche sensible. A ce stade, il est difficile d'aller plus avant dans la vérification de ces hypothèses.

5.3.2 Estimation de la sensibilité du capteur

Nous nous proposons dans ce paragraphe d'utiliser la partie linéaire de la courbe précédente pour estimer la sensibilité expérimentale. Cela permettra par la suite d'estimer le seuil de détection de notre dispositif.

La sensibilité gravimétrique du capteur s'exprime en fonction de la variation de vitesse relative, elle-même pouvant être reliée à la variation de fréquence relative mesurée expérimentalement, suivant les équations :

$$S_{mf} = \frac{A}{\Delta m} \frac{\Delta f}{f} \quad \text{et} \quad S_{mf} = \frac{V_g}{V_p} S_{mv}$$

Les phages titrés étant immobilisés sur toute la surface de la cellule soit environ 121 mm^2 , nous pouvons estimer la densité de masse accumulée comprise entre $11 \text{ ng} \cdot \text{mm}^{-2}$ pour le plus petit signal observé (-2 kHz), et $250 \text{ ng} \cdot \text{mm}^{-2}$ pour la plus grande variation de fréquence (-15 kHz).

En utilisant la relation précédente nous estimons une sensibilité de la vitesse à l'effet de masse expérimentale de l'ordre de $1 \text{ m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$. Cette valeur peut être comparée avec une valeur théorique de $18 \text{ m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$, calculée en considérant une couche sensible homogène de polymère et en supposant un effet de masse pur, modélisé par une augmentation de la masse volumique de la couche sensible.

La différence observée peut être liée à plusieurs phénomènes. Tout d'abord, il est clair que la couche sensible d'anticorps n'est pas organisée comme une couche solide homogène. Selon l'entraînement effectif de ces anticorps au passage de l'onde, les paramètres considérés devront au moins être adaptés, voire le modèle lui-même remis en cause.

De plus la modélisation de l'effet de masse utilisée lors de l'absorption de gaz par un polymère reflète moins bien l'accrochage du bactériophage M13, qui se superpose sur la couche sensible, comme une couche supplémentaire en surface du dispositif.

De nombreuses études théoriques et expérimentales, confrontées à des études sur la morphologie des couches déposées, sont nécessaires afin d'adapter le modèle théorique utilisé en milieu gazeux au cas des milieux liquides. Cela permettrait de déterminer des paramètres physiques équivalents de la couche sensible d'anticorps (masse volumique, module de rigidité transverse, épaisseur, etc...), puis éventuellement de la couche de bactériophages, à moins de devoir adapter le modèle lui-même, si ces dépôts ne peuvent être considérés comme homogènes vis-à-vis de l'onde acoustique.

5.3.3 Estimation du seuil de détection du dispositif

A partir de la sensibilité expérimentale du dispositif, nous pouvons estimer son seuil de détection.

Compte tenu des conditions de manipulation, la résolution du capteur est essentiellement limitée par les perturbations dues aux différences entre les paramètres physiques du solvant et ceux de la solution contenant l'espèce cible, ainsi qu'aux variations de température à court terme dues à l'injection du polluant, et à plus long terme sur la durée de l'immobilisation du bactériophage.

Ainsi nous estimons de l'ordre de 1,5 kHz la variation minimale de fréquence mesurable attribuable à l'accumulation de masse. La plus petite densité de masse détectable serait alors de l'ordre de la dizaine de $\text{ng}\cdot\text{mm}^{-2}$.

En améliorant les conditions de manipulation nous pouvons envisager de descendre à une variation minimale de fréquence significative inférieure à 100 Hz. Avec le dispositif de test, cela permettrait d'obtenir un seuil de détection en densité surfacique de masse proche de $1\text{ ng}\cdot\text{mm}^{-2}$, encore nettement améliorable en augmentant la sensibilité du capteur. De plus, la meilleure reproductibilité obtenue grâce à la fonctionnalisation chimique de la surface du capteur par le GPTS ou plus tard par de nouvelles voies de fonctionnalisation des surfaces, va également dans le sens d'un meilleur seuil de détection. Enfin, il sera important de mettre en œuvre un système avec injection en circulation (cf. chapitre 3 §1.4) pour améliorer la reproductibilité et ainsi limiter les effets de manipulation manuelle à la micropipette directement au-dessus du capteur, en prenant soin que les liquides de référence et de test aient des caractéristiques physiques les plus proches possibles.

Notons enfin que les limites indiquées ici correspondent à des limites réalistes pour un fonctionnement en milieu liquide. De nombreux auteurs se basent plutôt, comme on pourrait le faire en milieu gazeux où la stabilité de la ligne de base est déterminée par le bruit de l'oscillateur et peu dégradée par l'injection du polluant, sur une limite de détection égale à 3 fois le bruit à court terme de l'oscillateur. Avec ce type de calcul, nous parviendrions à une limite de détection de $30\text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$ pour une sensibilité de $1\text{ m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$, et seulement $1,7\text{ pg}\cdot\text{mm}^{-2}$ pour une sensibilité de $18\text{ m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$, valeurs tout à fait compatibles avec des résultats de la littérature [JOS05].

6 Détection de bactéries

Les premiers essais de détection de bactéries ont rapidement révélé une grande difficulté à obtenir une réponse du capteur. Cette difficulté semble confirmée indirectement par le faible nombre de publications traitant de ce sujet, alors que de nombreuses études portent sur la détection de plus petites molécules, du type protéines ou hormones, notamment avec les techniques à ondes évanescentes [MAI04]. De plus, parmi les études appliquées à la détection de bactéries [DEI04], une part importante concerne la détection de séquences d'oligonucléotides spécifiques, ou plus généralement ne permettent pas la détection de bactéries entières vivantes. Cela limite les champs d'application potentiels des biocapteurs. En effet, si la présence de bactéries spécifiques, vivantes ou non, est signe d'infection bactérienne anormale dans certains environnements, seule la présence de bactéries vivantes est signe de risque ou de contamination avérée dans d'autres milieux. Ainsi, la présence de bactéries pathogènes cliniques dans un réseau d'eau en milieu hospitalier, ou celle de bactéries recensées comme agents de guerre bactériologique dans un réseau d'eau potable, sont anormales, que ces bactéries soient mortes ou vivantes. En revanche, seule la présence de salmonelles vivantes dans un réseau d'air conditionné, ou de *E. coli* vivantes en sortie de station d'épuration, sont d'intérêt en terme de détection, des bactéries mortes étant le signe d'une contamination traitée efficacement. Aussi, nous attacherons une importance particulière à la détection de bactéries vivantes.

Le premier paragraphe fait le bilan des principales conclusions obtenues suite à de nombreuses investigations préliminaires sur la détection de bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*), choisies comme cible modèle. Le paragraphe suivant présente une approche immunologique qui a permis récemment la détection de cette espèce.

6.1 Investigations préliminaires

6.1.1 Antigènes internes et de surface

Une bactérie *E. coli* non pathogène (XL1 Blue, dérivée du type 12) a été choisie dans un premier temps comme bactérie cible modèle, associée à un anticorps monoclonal commercial (fournisseur : Euromedex). Malgré de premières réponses de capteurs encourageantes, à très forte concentration de bactéries en milieu de culture, à plus faible concentration et dans le PBS, les capteurs ne répondaient pas, voire répondaient par une augmentation de fréquence, de façon non reproductible. Les titrages des bactéries vivantes après élution donnaient un nombre aléatoire et souvent faible, inférieur au seuil de détection des capteurs. Des investigations plus poussées ont permis de mettre en évidence que les réponses positives obtenues avec des bactéries étaient vraisemblablement liées à des interactions non spécifiques. En effet, le capteur détectait parfaitement les mêmes bactéries, si celles-ci avaient été préalablement « lysées », c'est-à-dire tuées et cassées en les soumettant à des ultrasons, y compris en greffant des anticorps non spécifiques des bactéries *E. coli* (anticorps anti-TNF α humain) ou même en omettant les anticorps. L'expérience, reproduite en mode circulation de liquide, avec le capteur en position verticale pour éliminer toute possibilité de sédimentation, a donné des résultats comparables. Les premiers résultats encourageants étaient donc liés à la présence de bactéries mortes, associées aux bactéries vivantes en fin de phase exponentielle ou en phase stationnaire, stade de croissance permettant une forte concentration de bactéries.

L'une des conclusions des essais menés sur les bactéries *E. coli* XL1 blue était que les anticorps utilisés n'étaient pas dirigés contre l'enveloppe extérieure des bactéries mais contre des antigènes internes. La collaboration avec la DGA, dans le cadre des travaux de thèse de N. Moll, a permis la fourniture d'un couple spécifique *E. coli* (MRE162) et anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes présents à l'extérieur des bactéries, ainsi que d'anticorps polyclonaux moins spécifiques et pouvant reconnaître un plus grand nombre d'antigènes. Malgré une bonne affinité du couple, les capteurs n'ont pas donné de réponse aux bactéries vivantes, mais répondent aux mêmes bactéries lysées. Les publications relatives à la détection de bactéries, notamment par capteur à ondes acoustiques, sont donc à analyser en considérant cette difficulté dans la manipulation du matériel vivant et dans l'analyse des résultats obtenus [DEO05].

6.1.2 Rugosité de surface du capteur

Une hypothèse concernant le masquage éventuel de la réponse du capteur à l'effet de masse (diminution de fréquence) par une augmentation de la viscosité au voisinage de la surface (augmentation de fréquence) a été écartée dans un premier temps, seule l'absence de variation de viscosité dans le volume ayant pu être vérifiée. Cette possibilité, envisagée aussi récemment par une équipe allemande [GLA04], sera éventuellement à reconsidérer avec des moyens de test à imaginer.

Parallèlement, une autre hypothèse a été retenue comme limitant assurément le bon fonctionnement du capteur. En effet, une différence importante entre les bactéries vivantes, non détectables, et toutes les autres espèces cibles qui ont permis d'obtenir des réponses (notamment des anticorps, des protéines de saturation, des bactéries lysées et le bactériophage), est relative à la différence de taille des espèces. Dans le cas de biocapteurs à SPR, la taille importante des bactéries place leur volume en dehors du champ évanescent, expliquant en partie la sensibilité moindre [JOS05, PER00]. Ce phénomène ne devrait pas intervenir avec les dispositifs à ondes acoustiques, sensibles à l'effet de masse. Mais la taille des bactéries, dans notre cas, est à comparer à la rugosité de la couche guidante de SiO₂ à la

surface du capteur, dont les mesures ont montré qu'elle était importante, de plusieurs nanomètres, soit du même ordre de grandeur que les anticorps. Cela pourrait en partie expliquer la difficulté à recouvrir la surface par le liant (DTPS, protéine G, GPTS), ainsi que par la protéine de saturation, et à obtenir une couche sensible homogène tout en limitant les réactions secondaires non spécifiques. Dans ces conditions, la faible accessibilité des anticorps pourrait rendre difficile l'interaction avec l'antigène recherché et ce, de manière d'autant plus importante que la taille de ce dernier est grande, comme dans le cas des bactéries. De ce point de vue, l'utilisation de polymères commerciaux (notamment polystyrène et polyimide [BRA04], SU8 et PMMA [DU98, GIZ03, HAR97, JOS01], Parylène C [LAN03]) ou développés spécifiquement, comme dans le cadre de notre collaboration avec le LCOO, pourraient non seulement améliorer la sensibilité intrinsèque du capteur (cf. chapitre 2, §3.2 et §4), mais aussi conduire à un meilleur état de surface [SU02, TAT03, WAN97]. Ces matériaux peuvent être envisagés en remplacement du guide d'onde, ou pour ragréer la surface de la silice à l'échelle du nanomètre. Notre collaboration avec le LCOO vise par ailleurs à développer des modifications de surface permettant de limiter cette rugosité, y compris sur les surfaces actuelles de SiO₂, dont les contraintes technologiques au niveau du procédé de réalisation ne permettent pas d'améliorer directement le résultat obtenu.

6.1.3 Amplification par anticorps secondaires

Parallèlement, nous avons pu vérifier la possibilité d'appliquer la technique « sandwich » pour détecter de manière indirecte les bactéries immobilisées en surface en nombre inférieur au seuil de détection du capteur. Cette méthode est utilisée en ELISA pour amplifier et révéler l'immobilisation d'espèces cibles, en ajoutant un anticorps dit « secondaire », typiquement marqué par un marqueur fluorescent ou un chromogène. Le capteur répond effectivement à l'immobilisation de ces anticorps sur les bactéries, alors qu'aucune réponse n'était visible à l'immobilisation des bactéries. Une forte augmentation de sensibilité a également été obtenue ainsi avec des capteurs à plasmons de surface [HOM03, WEI03]. Par exemple, comme illustré sur la figure suivante, l'injection d'anticorps secondaires a permis une amplification de la réponse d'un facteur 10 environ, par rapport à la détection initiale directe d'entérotoxines B de staphylocoque, avec une limite de détection de 0,5 ng.mL⁻¹ [HOM02]. Cette méthode a permis aussi la détection d'espèces de grande taille, comme des *E. coli* 0157:H7 avec une limite de 5.10⁷ cfu.mL⁻¹ [FRA98] et par capteurs à ondes acoustiques avec une limite de 4.10⁵ cellules par mL [HOW00, PYU98].

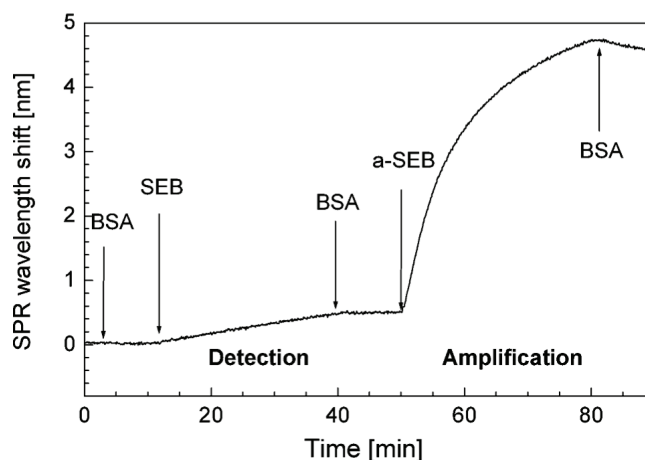


Figure 4. 21 : Détection d'entérotoxine B de staphylocoque (SEB) par une technique SPR (détection directe et amplification par anticorps secondaire) [HOM02].

Dans le cas de capteurs SPR ou à ondes acoustiques, afin d'augmenter encore la réponse globale, les anticorps secondaires pourront avantageusement être liés eux-mêmes par leur région fixe à d'autres éléments, par exemple des particules de latex [SEV93] ou d'or [LEU94], ou encore des agents contrastants [JOS05].

Néanmoins, cette méthode d'amplification allonge de façon importante le temps total d'analyse d'un échantillon, et nécessite du matériel biologique supplémentaire. Aussi elle ne dispense pas de la recherche d'une meilleure sensibilité intrinsèque du capteur. De plus, l'amélioration de la sensibilité avec les capteurs à ondes acoustiques dans le cas de la détection des bactéries n'est pas encore expliquée. En effet, la masse d'un anticorps (taille nanométrique) est très largement inférieure à celle d'une bactérie (taille micronique), et l'immobilisation d'anticorps en plus grand nombre ne suffit pas à justifier l'augmentation importante de réponse obtenue si l'on considère un effet de masse pur. Une hypothèse liée à la morphologie de la bactérie vivante est avancée pour justifier la difficulté de détection directe : une enveloppe extérieure relativement souple et un intérieur équivalent à un liquide pourraient conférer à l'organisme un comportement apparent proche de celui du liquide environnant vis-à-vis des ondes acoustiques [HOW00]. Mais comment les anticorps secondaires seraient-ils alors détectables par le capteur, alors qu'ils sont immobilisés sur la bactérie : sont-ils susceptibles de rigidifier la structure, malgré leur différence de taille ?

6.2 Bilan et nouvelle approche immunologique

En bilan succinct de l'ensemble des tests de détection précédents, nous pouvons dégager les deux approches principales retenues et les résultats obtenus [PAS05].

La première approche a consisté en un greffage direct des anticorps de l'espèce cible sur la surface (cf. Figure 4. 22 à gauche). Seules des espèces antigéniques de petite taille ont pu être détectées. Des difficultés liées à la rugosité de surface, et de ce fait à la densité et l'accessibilité des anticorps, ainsi que la reproductibilité des résultats, ont été rencontrées.

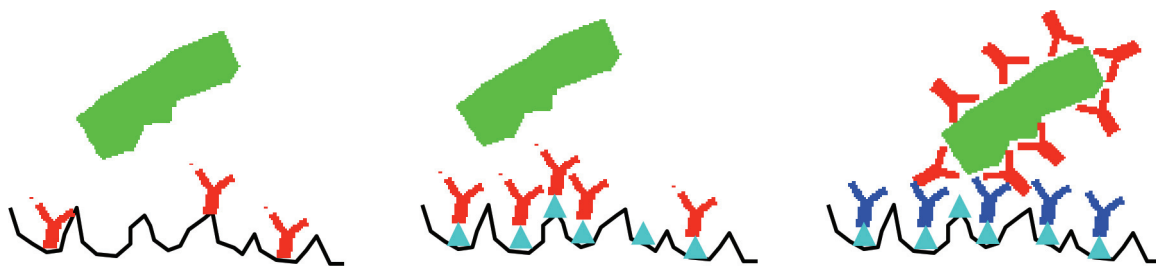






Figure 4. 22 : Approches retenues pour l'immobilisation et la détection de bactéries.

- Légende :
-  : Bactérie,
 -  : Anticorps anti bactérie (anti *E. coli*),
 -  : Bras chimique,
 -  : Anticorps anti anticorps (GAM-PO)

La seconde approche a consisté à greffer les anticorps par l'intermédiaire d'un bras chimique, afin d'assurer un greffage covalent, à la fois sur le capteur et avec les anticorps (cf. Figure 4. 22 au centre). Une modification des surfaces par le GPTS a permis un meilleur recouvrement par les anticorps, et la détection d'antigènes de petite taille avec une meilleure

reproductibilité. Mais la détection de bactéries *E. coli* n'a toujours pas été possible. Des études sont en cours pour allonger ce bras chimique et tenter ainsi d'améliorer l'état de surface apparent.

A partir des conclusions des tests précédents, une troisième approche a été envisagée et permet d'aboutir à un résultat intéressant concernant la détection de bactéries. Elle consiste à faire incuber les anticorps avec la bactérie préalablement au contact avec le capteur, puis à détecter cet ensemble. Si cette combinaison n'est pas détectable directement, du fait de la rugosité du capteur, en revanche, une réponse en temps réel du capteur a pu être obtenue en greffant en surface un anticorps dirigé contre l'anticorps anti *E. coli*, noté GAM-PO pour « Goat Anti Mouse » (chèvre anti souris) marqué à la peroxydase (cf. Figure 4. 22 à droite).

La figure suivante représente une réponse typique obtenue grâce à cette nouvelle stratégie immunologique, avec une diminution de fréquence de l'ordre de 20 kHz, de forme très similaire aux courbes de détection d'autres espèces. Un test de contrôle a été réalisé en injectant une solution d'anticorps anti *E. coli* seuls, qui se sont normalement accrochés aussi, mais avec une réponse de référence plus faible, de l'ordre de 4 kHz, du fait de leur plus faible masse, même s'ils ont pu s'accrocher plus nombreux pour des raisons d'accessibilité spatiale par rapport à ceux liés aux bactéries.

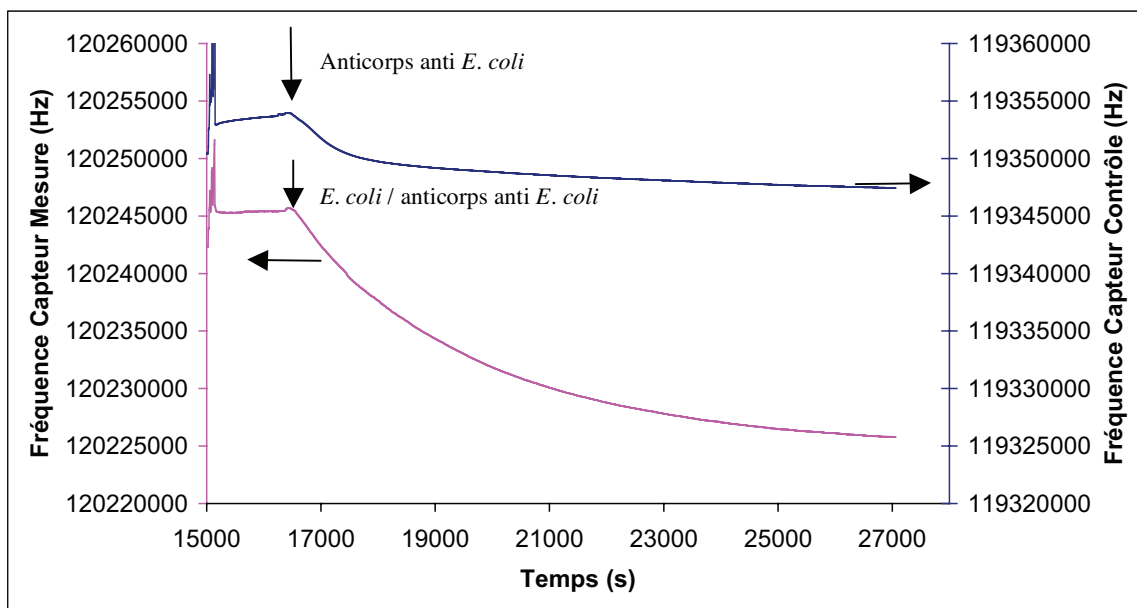


Figure 4. 23 : Réponses temps réel du capteur,
capteur de mesure : détection de bactéries *E. coli* vivantes incubées avec anticorps,
capteur de contrôle : anticorps seul
(37°C, GPTS, GAM-PO 40 µg/mL, Ac anti *E. coli* 5 µg/mL, incubation 2h, DO *E. coli* 0,5).

Ces réponses ont montré une bonne reproductibilité et une spécificité « normale » (faible détection de bactéries *pseudomonas*). Le temps d'incubation peut être limité à 30 min, durée compatible avec un système de détection rapide. Un intérêt de cette technique est qu'elle utilise une faible quantité d'anticorps par rapport au capteur dans sa configuration actuelle, notamment du fait d'une surface de cellule de test très supérieure à la surface active effective du capteur, élément qui limite à ce jour l'utilisation en circulation de fluide, et qui sera à prendre en compte lors d'une nouvelle conception de cette cellule.

Ces derniers résultats sont donc très encourageants, même si de nombreux tests et améliorations sont encore nécessaires pour aboutir à un résultat, notamment en terme de seuil de détection, intéressant pour certaines applications nécessitant la détection de très faible concentrations, par exemple des concentrations de 2000 bactéries fécales pour 100 mL considérées comme seuil de risque pour les eaux de baignade.

7 Conclusion et perspectives

En conclusion, la faisabilité d'un immunocapteur à onde de Love a été démontrée. A partir d'une première étape validant la détection d'un bactériophage et autres espèces de petite taille (protéines, anticorps, bactéries lysées), un important travail de fond associant très étroitement électroniciens, chimistes et immunologistes a finalement permis aussi la détection de bactéries entières, vivantes.

Les essais les plus récents ont bénéficié d'avancées significatives, dont certaines proposées dans les perspectives de thèse d'O. Tamarin, comme des transducteurs interdigués en or pour éviter la corrosion, de nouvelles cellules de test, un oscillateur et un banc de test multicapteur avec une possibilité de circulation fluïdique, éléments présentés dans le chapitre précédent.

Des verrous technologiques ont cependant été mis en évidence, notamment la rugosité de surface du capteur, sa sensibilité insuffisante pour certaines applications. Des études sont en cours actuellement pour proposer des solutions satisfaisantes, principalement dans le cadre d'une thèse, démarrée par nos collègues chimistes du LCOO, en co-tutelle avec l'IXL. Elle vise la synthèse de nouveaux matériaux polymères organosiliciés et leur mise en œuvre, avec une attention particulière aux états de surface obtenus vis-à-vis du greffage des anticorps, pour l'élaboration d'un microsysteme de détection rapide de biomolécules.

La mise au point de matériaux à porosité contrôlée pourrait aussi constituer une voie de recherche intéressante, qui pourrait permettre d'augmenter la sensibilité et le seuil de détection du capteur par augmentation de la surface active apparente, *a priori* principalement pour les espèces cibles de petite taille, inférieure à la taille des pores. Quelques développements ont ainsi porté sur l'utilisation de silicium nanostructuré [CHA01] ou de façon voisine sur l'utilisation d'un réseau de microsphères [EPS02] avec une détection optique. Des études récentes ont également permis de vérifier cette amélioration dans le cas d'un détecteur à micropoutre présentant une surface comportant des micro-cavités [PAT05], et ont de plus mis en évidence une propriété de réversibilité inattendue et encore inexplicée.

Enfin, toujours en vue d'améliorer la sensibilité, il serait intéressant d'avoir une meilleure connaissance des phénomènes de diffusion des cellules bactériennes à proximité de la surface du capteur [PER00, MAI04], pour éventuellement favoriser les interactions entre ces espèces vivantes et le capteur en adaptant la géométrie de la cellule de test et les conditions d'injection.

Indépendamment de la sensibilité intrinsèque du capteur, une amélioration de la sensibilité globale, et ainsi du seuil de détection, peut aussi être obtenue en utilisant des techniques permettant d'augmenter la masse des espèces cibles, de manière directe ou indirecte, par analogie avec des méthodes utilisées pour les tests ELISA. De manière directe, des espèces cibles de petite taille ($PM < 1\ 000$) peuvent être liées à des molécules plus lourdes préalablement à l'injection dans la cellule de test : nous avons pu vérifier la possibilité de détecter ainsi des isoflavones (haptènes, environ 200 Da) liées par un bras chimique à une thyroglobuline (400 kDa). Pour les espèces de petite taille, une méthode classiquement utilisée en ELISA est un test par inhibition : les espèces cibles sont mises en présence d'anticorps libres en concentration connue, puis l'échantillon est injecté sur le capteur, équipé

d'une couche d'espèces proches de l'espèce cible, sur lesquelles vont s'immobiliser les anticorps restés libres. De manière indirecte, le test « sandwich », utilisé en ELISA, permet d'amplifier et révéler des espèces cibles de moyennes et grandes tailles préalablement immobilisées, en ajoutant par la suite un anticorps, typiquement marqué par un marqueur fluorescent ou un chromogène (test ELISA), ou par une particule lourde (capteur).

8 Références bibliographiques

1. [AKE85] B. Akerstrom, T. Brodin, K. Reis, L. Bjorck
Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies
The Journal of Immunology, 135 :4 (1985) 2589-2592.
2. [BEN01a] B. Bennetau, J. Bousbaa, F. Choplin
Composés Organosiliciés : Leur Procédé de Préparation et Leurs Utilisations.
Brevet WO0153523 (2001) CNRS.
3. [BEN01b] B. Bennetau, J. Bousbaa, F. Choplin, J.P. Cloarec, J.R. Martin, E. Souteyrand
Procédés de Synthèse et d'Immobilisation d'Acides Nucléiques sur un Support Silanisé.
Brevet WO0153303 (2001) CNRS.
4. [BRA04] D.W. Branch, S.M. Brozik
Low-level detection of a *Bacillus anthracis* simulant using Love-wave biosensors on 36°YX LiTaO₃.
Biosensors and Bioelectronics 19 (2004) 849–859.
5. [BSI] BSIP
<http://www.bsip.com/fr/>
6. [CHA01] S. Chan, S.R. Horner, P.M. Fauchet, B.L. Miller
Identification of Gram negative bacteria using nanoscale silicon microcavities.
J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 11797-11798.
7. [CUL] <http://www.cu.lu/labext/rcms/cpppe/index.html>
Cours de biologie cellulaire, Cycle préparatoire Polytechnique, Centre Universitaire du Luxembourg.
8. [DAR99] M. Darder, K. Takada, F. Pariente, F. Lorenzo, H.D. Abruna
Dithiobissuccinimidyl propionate as an anchor for assembling peroxidases at electrodes surfaces and its application in a H₂O₂ biosensor.
Anal Chem. 1999 Dec 15;71(24):5530-7.
9. [DEI04] A.K. Deisingh, M. Thompson.
Revue : Biosensors for the detection of bacteria.
Canadian Journal of Microbiology 50 (2004) 69-77.
10. [DEO05] D.D. Deobagkar, V. Limaye, S. Sinha, R.D.S. Yadava
Acoustic wave immunosensing of *Escherichia coli* in water.
Sensors and Actuators B 104 (2005) 85-89.

11. [DU98] J. Du, G.L. Harding
A Multilayer Structure for Love-Mode Acoustic Sensors.
Sensors and Actuators A 65 (1998) 152-159.
12. [EPS02] J.R. Epstein, M. Lee, D.R. Walt
High-density fibre-optic genosensor microsphere array capable of zeptomole detection limits.
Anal. Chem. 74 (2002) 1836-1840.
13. [FRA98] P.M. Fratamico, T.P. Strobaugh, M.B. Medina, A.G. Gehring
Detection of *Escherichia coli* O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor.
Biotechnology Techniques 12 :7 (1998) 571-576.
14. [GIZ03] E. Gizeli, F. Bender, A. Rasmusson, K. Saha, F. Josse, R. Cernosek
Sensitivity of the acoustic waveguide biosensor to protein binding as a function of the waveguide properties.
Biosensors and Bioelectronics, 18 (2003) 1399-1406.
15. [GLA04] S. Glass, T. Gronewold, M. Schlensog, D. Pfeifle, M. Tewes, M. Löhndorf, E. Quandt
Influence of viscosity on real-time studies during the formation of biological layers on SAW sensors
Biosensors, Granada-Spain, BS254, 24-26 May 2004.
16. [HAR97] G.L. Harding and J. Du
Design and properties of quartz-based Love wave acoustic sensors incorporating silicon dioxide and PMMA guiding layers.
Smart Mater. Struct. 6 (1997) 716-720.
17. [HOM02] J. Homola, J. Dostálek, S. Chen, A. Rasooly, S. Jiang, S. Yee
Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in mil.
Int. J. Food Microbiol. 75 (2002) 61-69.
18. [HOM03] J. Homola
Revue : Present and future of surface plasmon resonance biosensors.
Anal. Bioanal. Chem. 377 (2003) 528-539.
19. [HOW00] E. Howe, G. Harding
A comparison of protocols for the optimisation of detection of bacteria using a surface acoustic wave (SAW) biosensor.
Biosensors and Bioelectronics 15 (2000) 641-649.
20. [JOS01] F. Josse, F. Bender, R.W. Cernosek
Guided Shear Horizontal Surface Acoustic Wave Sensors for Chemical and Biochemical Detection in Liquids.
Anal. Chem. 73 (24), (2001) 5937-5944.

21. [JOS05] S. Joseph, T.M.A. Gronewold, M.D. Schlensog, C. Olbrich, E. Quandt, M. Famulok, M. Schirner
Specific targeting of ultrasound contrast agent (USCA) for diagnostic application: an in vitro feasibility study based on SAW biosensor.
Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 1829-1835.
22. [KUN] D. Kunkel Microscopy, Inc., <http://www.denniskunkel.com/>
23. [KUS03] W. Kusnezow, A. Jacob, A. Waljew, F. Diehl, J. Hoheisel
Antibody microarrays: An evaluation of production parameters.
Proteomics, 3 (2003) 254–264.
24. [LAN03] K. Länge, F. Bender, A. Voigt, H. Gao, M. Rapp
A Surface Acoustic Wave Biosensor Concept with Low Flow Cell Volumes for Label-Free Detection.
Anal. Chem. 75 (2003) 5561-5566.
25. [LEI] Cours de microbiologie en ligne de l'université de Leicester
<http://www-micro.msb.le.ac.uk>
26. [LEU94] P.T. Leung, D. Pollard-Knight, G.P. Malan, M.F. Finlan
Modelling of particle-enhanced sensitivity of the surface-plasmon-resonance biosensor.
Sensors and Actuators B22 (1994) 175-180.
27. [LOM] Document « L'origine de la vie », chapitre V « Les parasites de cellules »
<http://www.astrosurf.com/lombry/bioastro-originevie5.htm>
28. [MAI04] E. Maillart
Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel.
Thèse de Doctorat, Université Paris XI Orsay, 30 juin 2004.
29. [MAR05] P. Martin, S. Marsaudon, L. Thomas, B. Desbat, J.P. Aime, B. Bennetau
Liquid Mechanical behaviour of Mixed Monolayers of Amino- and Alkyl Silanes for DNA Deposition.
Langmuir, 2005, sous presse.
30. [MOL05] N. Moll, E. Pascal, C. Déjous, J.P. Pillot, B. Bennetau, D.H. Dinh, C. Zimmermann, D. Rebière, D. Moynet, Y. Mas, J. Pistré
Comparison of different methods to bind antibodies for biological detection using Love Wave sensors.
Euroensors XIX, Barcelone - E, 11-14 sept. 2005.
31. [NAV01] S. Navarre, F. Choplin, J. Bousbaa, B. Bennetau, L. Nony, J.P. Aimé
Structural Characterization of Self-Assembled Monolayers of Organosilanes Chemically Bonded onto Silica Wafers by Dynamical Force Microscopy.
Langmuir 2001, 17, 4844.

32. [PAS05] E. Pascal
Etude d'un immunocapteur à ondes de Love pour la détection en temps réel de micro-organismes dans les eaux de baignade.
Mémoire de Diplôme de Recherche Technologique GEII, n°26, 30 sept. 2005.
33. [PAT05] P. Dutta, J. Sanseverino, P.G. Datskos, M.J. Sepaniak
Detection of Cytokine Using a Microcantilever Biosensor.
Soumis à publication.
34. [PER00] E.A. Perkins, D.J. Squirrell
Development of instrumentation to allow the detection of microorganisms using light scattering in combination with surface plasmon resonance.
Biosensors and Bioelectronics 14 (2000) 853-859.
35. [PYU98] J.C. Pyun, H. Beutel, J.U. Meyer, H.H. Ruf
Development of a biosensor for E. coli based on a flexural plate wave (FPW) transducer.
Biosensors & Bioelectronics 13 (1998) 839-845.
36. [SEV93] A.H. Severs, R.B.M. Schasfoort
Enhanced surface plasmon resonance inhibition test (ESPRIT) using latex particles.
Biosensors and Bioelectronics 8 (1993) 365-370.
37. [SU02] R.Q. Su, T.E. Müller, J. Prochazka, J.A. Lercher
A New Type of Low-k Dielectric Film Based on Polysilsesquioxanes.
Adv. Mat. 2002, 14, 1369-1373.
38. [TAT03] T. Tätte, K. Saal, I. Kink, A. Kurg, R. Lõmus, U. Mäeorg, M. Rahi, A. Rinke, A. Lõmus
Preparation of Smooth Siloxane Surfaces for AFM Visualization of immobilized Biomolecules.
Surf. Sci. 532-535 (2003)1085-1091.
39. [TOU04] C. Tourbe
Qu'est-ce qui distingue un virus d'une bactérie ?
Science & Vie, 1038 (mars 2004) 116-119.
40. [UTT01] E. Uttenthaler, M. Schräml, J. Mandel, S. Drost
Ultrasensitive quartz crystal microbalance sensors for detection of M13-Phages in liquids.
Biosensors and Bioelectronics 16 (2001) 735-743.
41. [VIR] The Big Picture Book of Viruses
http://www.tulane.edu/~dmsander/Big_Virology/BVHomePage.html
42. [WAN97] Y.L. Wang, C. Liu, S.T. Chang, M.S. Tsai, M.S. Feng, W.T. Tseng
Chemical-Mechanical Polishing of Low-Dielectric-Constant Spin-on-Glasses: Film Chemistries, Slurry Formulation and polish Selectivity.
Thin Solid Films 308-309 (1997) 550-554.

43. [WEI03] J. Wei, Y. Mu, D. Song, X. Fang, X. Liu, L. Bu, H. Zhang, G. Zhang, J. Ding, W. Wang, Q. Jin, G. Luo
A novel sandwich immunosensing method for measuring cardiac troponin I in sera.
Analytical Biochemistry 321 (2003) 209-216.
44. [WU70] T.T. Wu, E.A. Kabat
An analysis of the sequences of the variable regions of bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity.
Journal Of Experimental Medecine 132, (Aug 1970), 211 – 250.

Conclusions et perspectives

Dans ce mémoire, sont présentés nos travaux sur les biocapteurs à ondes acoustiques, opération de recherche dont j'assure plus spécifiquement l'animation au sein de l'équipe Capteurs et Microsystèmes du Laboratoire IXL. A partir de résultats montrant l'intérêt de ces dispositifs pour la détection rapide de composés en milieu gazeux en très faible concentration (détection sub-ppm de composés toxiques dans le cadre de programmes de recherche avec la DGA en partenariat avec le Centre d'Etudes du Bouchet), nous avons progressivement mis en place les éléments indispensables en vue d'applications à la détection d'espèces biologiques en milieu liquide.

Nous avons ainsi présenté dans un premier temps, une problématique du biocapteur, afin de situer les dispositifs à ondes acoustiques parmi d'autres technologies de transduction, et ainsi mettre en évidence leurs intérêts potentiels, notamment en termes de sensibilité, sélectivité, rapidité, intégrabilité, adaptabilité. Une revue des biorécepteurs utilisés ainsi que des différentes techniques d'immobilisation mises en œuvre, d'un point de vue des interactions physico-chimiques mises en jeu et des techniques de dépôt, est également proposée. L'importance de cette étape d'immobilisation est capitale pour un bon fonctionnement du capteur.

Nos travaux théoriques et notre cheminement de recherche, des ondes de Rayleigh (communément désignées par ondes acoustiques de surface ou SAW) aux ondes de Love, en passant par les ondes de plaque transverses horizontales ayant fait l'objet de mes travaux de thèse, sont ensuite exposés. Ces modélisations, qui constituent une base commune à l'ensemble de nos travaux sur les dispositifs à ondes acoustiques, nous ont permis de mettre en évidence des structures à ondes de Love adaptées à la détection en particulier en milieu liquide. De nouvelles voies de recherche, visant à l'étude de dispositifs unidirectionnels, ainsi qu'à l'étude et la caractérisation de matériaux innovants, ont ainsi été ouvertes, en vue d'améliorer les performances des dispositifs actuels et atteindre les seuils de détection extrêmement bas parfois nécessaires.

La réalisation de dispositifs et d'une plate-forme de test multicapteur adaptés à un fonctionnement en milieu liquide est ensuite présentée, jusqu'à un prototype de système multicapteur associant un système de millifluidique en vue d'une automatisation complète du système à terme. Des tests de caractérisation sont menés et confrontés aux résultats théoriques. Ils ouvrent sur la dernière partie, consacrée à l'application à la biodétection et à l'évocation d'autres projets de recherche menés parallèlement et relatifs à un fonctionnement en milieu liquide : caractérisation de liquide pour des applications en chimie haut-débit, intégration d'une cellule microfluidique sur le capteur comportant de nombreux avantages potentiels, détection de métaux lourds.

Nos travaux sur l'application à la biodétection sont amenés par une présentation des éléments biologiques mis en jeu. Notre approche de recherche et les principaux résultats obtenus à ce jour sont ensuite exposés. Ils portent sur la membrane biologique bioréceptrice et son immobilisation, la détection de virus (bactériophages) et autres organismes de petite taille, puis la recherche d'une nouvelle stratégie immunologique permettant la détection rapide de micro-organismes vivants de grande taille comme des bactéries. Commencer à relever ce

dernier défi, après avoir mis en évidence des difficultés spécifiques, a nécessité une synergie particulièrement étroite et soutenue depuis un an environ entre les partenaires, le Laboratoire d'Immunologie et Parasitologie (UB2 Victor Segalen, EA3677), le Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique (UB1, CNRS UMR 5802) et le Laboratoire IXL (ENSEIRB, CNRS UMR 5818, UB1).

De nombreuses améliorations sont encore nécessaires en vue de parvenir à un dispositif satisfaisant pour des applications de détection à très faible concentration. En plus des voies d'améliorations citées plus haut, l'étude de matériaux nanostructurés, avec une attention particulière aux phénomènes d'interface à l'échelle nanométrique, fait l'objet d'une collaboration avec le LCOO en vue d'augmenter la sensibilité des capteurs. Une recherche d'amélioration de la stratégie immunologique est également nécessaire (Laboratoire d'Immunologie). Des compétences en microbiologie, par l'intermédiaire d'une collaboration à venir avec le Laboratoire de Microbiologie (UB2, EA525, IFR66), seraient complémentaires afin d'avoir une meilleure connaissance des espèces cibles, notamment des cellules bactériennes, et de leurs interactions avec les autres éléments du capteur, avec un souci de modélisation de ces interactions aux interfaces matière-vivant, dans un objectif de simulation des capteurs.

Enfin, l'étude d'un système complet passe par la prise en compte, non seulement du capteur et de son environnement de test, mais également de la préparation des échantillons à analyser, leur présentation au capteur, l'établissement de protocoles de test, ainsi que le conditionnement, l'acquisition et le traitement des informations, par réseau neuronal par exemple, dans le cadre d'un système multicapteur. Un certain nombre parmi ces différents points ont déjà fait l'objet d'études au sein de notre équipe.

Seules des avancées significatives dans chacun de ces domaines de compétences, et aux interfaces entre ces domaines, permettront de proposer une solution de biodétection rapide sur site innovante, susceptible de constituer une alternative intéressante aux méthodes de détection ou d'analyse actuelles.

Ainsi, nos actions de recherche, dans le domaine des biocapteurs, et de façon plus générale dans le domaine des capteurs à microstructures résonantes, ondes acoustiques, mais également microstructures comme les micropoutres ou micromembranes, qui constituent le cœur des travaux de recherche de notre collègue et amie Isabelle DUFOUR, Chargée de Recherches, comprennent deux volets principaux. Le premier consiste à développer nos propres compétences dans le domaine de ces transducteurs et des systèmes les mettant en œuvre, avec une complémentarité et des allers et retours permanents entre modélisation des structures et des interactions, simulation, conception, assemblage et test de dispositifs expérimentaux, dans le cadre d'applications variées. Le second volet consiste à créer et entretenir des synergies entre des équipes d'horizons très différents et complémentaires, au travers de projets de recherche communs, voire d'actions d'enseignement intégrant cette diversité. Cette activité nécessite des échanges permanents, entre les personnes identifiées travaillant autour des projets, ou au sein de communautés scientifiques pluridisciplinaires comme le Club Microcapteurs Chimiques (CMC2) en particulier, qui organise régulièrement des journées de rencontres thématiques et de formation autour des microcapteurs et des microsystèmes.

Cet environnement de travail est particulièrement enrichissant et motivant, tant sur le plan humain que scientifique. Dans ce cadre, notre programme de recherche dépasse largement les applications à la biodétection et s'articule autour des axes suivants :

- La poursuite de nos travaux sur l'étude de microcapteurs à ondes élastiques appliqués à la détection en milieux gazeux et liquides.
- L'étude de microstructures adaptées à la caractérisation en haute fréquence de liquides ou de matériaux déposés en couches minces.
- La conception de plateformes à architecture parallèle.
- L'intégration, et le développement de systèmes embarqués.

Ces travaux visent globalement le développement de nouvelles méthodologies d'analyse rapide, en laboratoire ou sur site, avec un enjeu sociétal majeur dans de nombreux domaines.

De tels systèmes permettraient par exemple, dans le domaine des sciences du vivant, d'étudier, en statique et d'un point de vue de leur cinétique, des réactions entre cellules et molécules actives (recherche pharmaceutique) ou de détecter des traces de composés biologiques ou chimiques (agro-alimentaire, environnement, etc). L'ensemble des applications potentielles intéresse également fortement le domaine de la chimie haut-débit, qu'il s'agisse de suivre, du point de vue des propriétés physico-chimiques, des cinétiques de polymérisation, d'évaporation, de réactions chimiques multiples, avec toujours de faibles volumes d'échantillon d'analyse.

De nombreux et importants projets de recherche sont ainsi initiés, souvent en liaison avec le monde industriel, qui recherche des réponses technologiques à ces demandes en termes de suivi, contrôle, traçabilité dans les champs d'application comme l'environnement, l'agro-alimentaire ou le médical par exemple.

Enfin, conscients des mutations profondes qu'entraîne l'engouement actuel pour les bio-nano-sciences, et les enjeux économiques mondiaux associés, il nous apparaît primordial d'aborder ces aspects pluridisciplinaires au sein de nos formations Universitaires. Une évolution dans ce sens de nos enseignements, en particulier sur les microsystèmes, représente à mes yeux un axe d'ouverture à privilégier pour l'électronique de demain.

Annexe : Eléments de biochimie

Les éléments constituant cette partie, nécessaires pour une meilleure compréhension des bioéléments et des interactions biochimiques mises en jeu au niveau de nos biocapteurs, sont pour la plupart directement issus ou réalisés à partir de [KOO04].

1 Principales catégories de liaisons entre biomolécules

La plupart des biomolécules dérivent de composés simples non métalliques contenant de l'oxygène O (H_2O), de l'azote N (NH_3), du soufre S (H_2S) et du phosphore P (acide phosphorique H_3PO_4).

Si l'on remplace de façon formelle dans les hydrures non métalliques un ou plusieurs hydrogènes par d'autres groupes R, par exemple par un résidu alkyl, on obtient successivement des liaisons de type $R-XH_{n-1}$, $R-XH_{n-3}-R'$, etc. C'est ainsi, par exemple, que sont formés à partir de l'eau (H_2O), des **alcools** ($R-OH$) ou des **éthers** ($R-O-R'$). A partir de l'ammoniac (NH_3), on obtiendra des **amines** primaires ($R-NH_2$), secondaires ($R-NH-R'$) ou tertiaires ($R-N-R'-R''$), et à partir de H_2S on obtient les **thiols** ($R-SH$) et des thioesters ($R-S-R'$). Les groupes tels que $-OH$ ou $-NH_2$ sont des substituants fréquents dans de nombreux composés organiques. Comme ils sont nettement plus réactifs que les structures d'hydrocarbures auxquelles ils sont liés, on les désignera comme des **groupements fonctionnels**.

Par oxydation de composés déjà mentionnés, peuvent se former de nouveaux groupements fonctionnels, comme illustré sur la figure suivante. Les **acides carboxyliques** et leurs dérivés, que l'on peut obtenir par échange du groupe hydroxyle OH avec d'autres groupes, sont particulièrement importants. Notons en particulier la **liaison amide** ($R-NH-CO-R'$), formée à partir d'acides carboxyliques et d'amines primaires. Comme les acides aminés (AA), éléments constitutifs des peptides et des protéines, sont reliés par des liaisons amides, on appelle également ce type de liaison, liaison peptidique.

De nombreuses biomolécules sont construites de façon modulaire par l'assemblage d'unités plus petites qu'elles peuvent redonner après dissociation. La formation de ces biomolécules s'effectue la plupart du temps par des réactions de condensation avec élimination d'eau. Inversement, leur dégradation est une réaction d'hydrolyse avec capture d'une molécule d'eau.

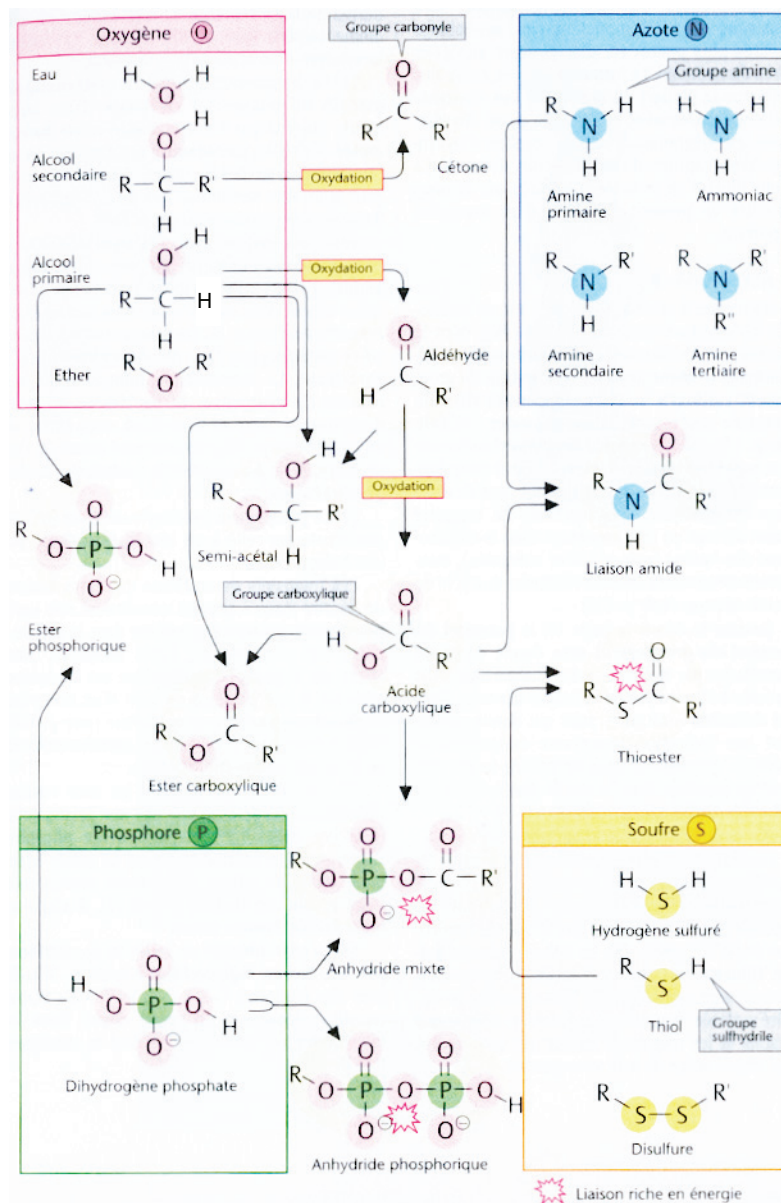


Figure A. 1 : Principales catégories de liaisons chimiques mises en jeu dans le biomolécules.

2 Des acides aminés aux protéines

Les acides aminés (acides 2-aminocarboxyliques, abréviation AA) remplissent dans l'organisme différentes fonctions. Ils servent avant tout d'éléments constitutifs des peptides et des protéines. Seuls les 20 acides aminés protéinogènes sont pris en compte dans le code génétique et vont donc être incorporés de façon habituelle dans les protéines. Certains de ces acides aminés seront modifiés après leur introduction dans les protéines. Les acides aminés et leurs dérivés entrent aussi dans la composition des lipides. Certains acides aminés sont eux-mêmes des neurotransmetteurs, d'autres sont les précurseurs de neurotransmetteurs, de médiateurs ou d'hormones. Parmi les fonctions des acides aminés, mentionnons encore qu'ils constituent des composants importants de l'alimentation ; certains sont qualifiés d'essentiels, lorsque l'homme ne peut pas les synthétiser lui-même.

Les acides aminés naturels sont principalement des acides α -aminés, qui portent sur le C-2 (C- α) quatre substituants différents. Tous les acides aminés possèdent au moins 2 groupements ionisables, leur charge dépend de la valeur du pH. En plus des groupements

COOH (acides) et amines (basiques), les acides aminés comportent aussi sur leur chaîne latérale des groupements ionisables, représentés sur le tableau suivant. La charge électrique des peptides et des protéines dépendra presque exclusivement de ces groupes car la majeure partie des groupements α -carboxyliques et α -aminés sont associés par des liaisons amides. Plus la proportion de groupements fonctionnels polaires sera élevée, plus la molécule sera soluble dans l'eau (hydrophile).




Aliphatique					Contenant du soufre	
Glycine (Gly, G)	Alanine (Ala, A)	Valine (Val, V)	Leucine (Leu, L)	Isoleucine (Ile, I)	Cystéine (Cys, C)	Méthionine (Met, M)
H	CH ₃	H ₃ C-CH CH ₃	CH ₂ H ₃ C-CH CH ₃	H ₃ C-CH CH ₂ CH ₃	CH ₂ SH 8.3 Valeur du pK _a	CH ₂ CH ₂ S CH ₃
-2.4	-1.9	-2.0	-2.3	-2.2	-1.2	-1.5
Aromatique			Cyclique	Neutre		
Phénylalanine (Phe, F)	Tyrosine (Tyr, Y)	Tryptophane (Trp, W)	Proline (Pro, P)	Sérine (Ser, S)	Thréonine (Thr, T)	
CH ₂ 	CH ₂  OH 10.1	CH ₂  Noyau indol	COO ⁻ CH HN H ₂ C-CH ₂ Noyau pyrrolidine	CH ₂ OH	H ₃ C-CH OH	
+0.8	+6.1	+5.9	+6.0	+5.1	+4.9	
★ Acides aminés essentiels				□ Centre chiral		
Neutres		Acides		Basiques		
Asparagine (Asn, N)	Glutamine (Gln, Q)	Aspartate (Asp, D)	Glutamate (Glu, E)	Histidine (His, H)	Lysine (Lys, K)	Arginine (Arg, R)
CH ₂ CONH ₂	CH ₂ CH ₂ CONH ₂	CH ₂ COO ⁻ 4.0	CH ₂ CH ₂ COO ⁻ 4.3	CH ₂ HN HC=N 6.0 Noyau imidazole	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺ 10.8	CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH C H ₂ N NH ₂ 12.5
+9.7	+9.4	+11.0	+10.2	+10.3	+15.0	+20.0

Figure A. 2 : Les acides aminés protéinogènes.

Le tableau précédent représente les chaînes latérales R des 20 acides aminés protéinogènes, classées par structure chimique et par polarité (électronégativité). Pour chaque acide aminé est donné :

- l'appartenance à une classe structurale ;
- le nom et l'abréviation, formés à partir des trois premières lettres du nom ;
- le symbole à une lettre, introduit pour gagner de la place lors du traitement informatique des séquences ;
- une valeur quantitative de la polarité (en bas à gauche) : plus cette valeur est positive, plus l'acide aminé est polaire.

Dans le cas des chaînes latérales ionisables, le tableau indique également les valeurs correspondantes du pK_a .

Si l'on relie des acides aminés ensemble par des liaisons amides entre les groupements α -carboxyliques et α -aminés, il se forme des chaînes linéaires que l'on désigne sous le nom de peptides (de l'ordre de 50 AA). Les chaînes peptidiques ont un sens : l'extrémité N-terminale d'un peptide comporte un groupement ammonium libre ($-\text{NH}_3^+$), l'extrémité C-terminale correspond au groupe carboxyle ($-\text{COO}^-$) du dernier acide aminé. La séquence d'un peptide correspond à la suite des abréviations à 3 ou 1 lettre des acides aminés, en commençant par l'extrémité C-terminale.

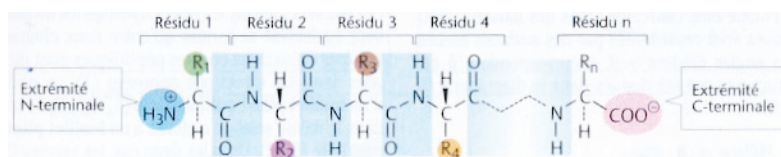


Figure A. 3 : Nomenclature des peptides.

L'association de peptides par des ponts disulfure constituent des polypeptides. Les protéines sont des polypeptides présentant des fonctions distinctes dans l'organisme : formation et maintien des structures, transport (ex. hémoglobine pour l'oxygène et le dioxyde de carbone, les canaux ioniques et autres protéines membranaires), défense et protection (ex. immunoglobine G), contrôle et régulation (en particulier hormones et leurs récepteurs), catalyse (enzymes), mouvement, stockage. Chaque organisme contient des milliers de protéines différentes.

3 Références bibliographiques

45. [KOO04] J. Koolman, K.H. Röhm
Atlas de Biochimie
3^{ème} édition, Flammarion, 2004, ISBN 2-257-13114-2

Annexe : Techniques immunologiques

1 Le test immuno-enzymatique ELISA

1.1 Principe de la technique ELISA

Le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) consiste en plusieurs étapes résumées sur la figure suivante :

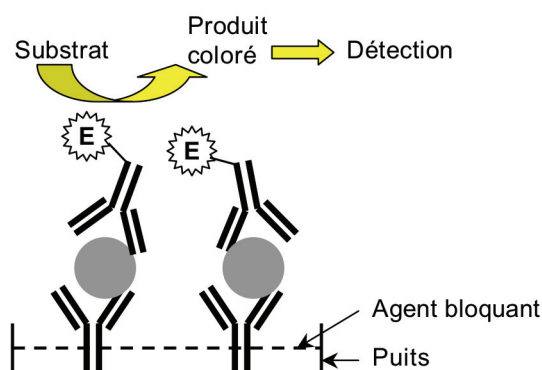


Figure A. 4 : Principe du test immuno-enzymatique ELISA (d'après [MAI04]).

Un test immuno-enzymatique de type ELISA est réalisé sur des microplaques standard comportant 96 puits (en plastique de type polypropylène, polycarbonate notamment), présentant des propriétés d'adsorption spécifique, compatible avec les protéines étudiées. Chaque puits peut contenir environ 200 μ L de liquide. Des ligands primaires sont adsorbés, c'est-à-dire fixés de manière non covalente, à une phase solide dans le fond de chaque puits. Un agent bloquant est ajouté pour éviter la fixation non-spécifique du composé étudié, et limiter ainsi le bruit de fond. Puis la solution de test est injectée dans les puits pour que le composé se fixe spécifiquement sur l'anticorps primaire. On peut aussi mettre dans le milieu de test un agent de surface, comme le Tween 20, qui inhibe l'adsorption additionnelle de molécules, sans détacher celles déjà adsorbées. Après un temps d'incubation, par exemple 30 minutes, ces puits sont rincés pour éliminer toutes les protéines non liées.

D'autres étapes sont alors nécessaires pour permettre de vérifier la présence ou non du composé lié. Un anticorps secondaire conjugué à une enzyme réactive (typiquement une peroxydase) est ajouté dans les puits qui sont ensuite à nouveau rincés pour éliminer l'excédent de réactif. Puis est ajouté le substrat S spécifique de l'enzyme ainsi qu'un chromogène C, destiné à réagir sur le produit de la réaction. L'enzyme fixée va transformer un grand nombre de molécules S en espèces P, qui vont réagir avec C et former une solution colorée. On arrête la réaction après un temps assez court en ajoutant un acide fort qui détruit l'enzyme.

Il reste à procéder à la lecture du test avec un colorimètre, pour remonter à la concentration de composé cible à travers une mesure d'absorbance suivant la loi de Beer-Lambert, grâce à un spectrophotomètre :

$$DO = \varepsilon \cdot L \cdot c$$

avec DO la densité optique, ε l'absorbance (m^{-1}), L l'épaisseur du milieu coloré (m) et c la concentration (%). Un autre jeu d'appellation et d'unités sont aussi utilisées : le coefficient d'extinction molaire pour ε ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l'épaisseur de la solution (cm) et la concentration c ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

1.2 Variantes de la technique ELISA

La méthode précédente est couramment désignée par la dénomination de méthode (ou système) indirecte, ou encore méthode « sandwich », l'espèce cible étant entre l'anticorps primaire de capture et l'anticorps marqué de détection. Dans l'exemple précédent et schématisé sur la figure ci-dessous en haut, le second anticorps primaire est marqué et permet la quantification. L'anticorps de détection peut aussi ne pas être marqué, et être lui-même quantifié par un anticorps secondaire marqué, comme représenté sur la figure ci-dessous, en bas.

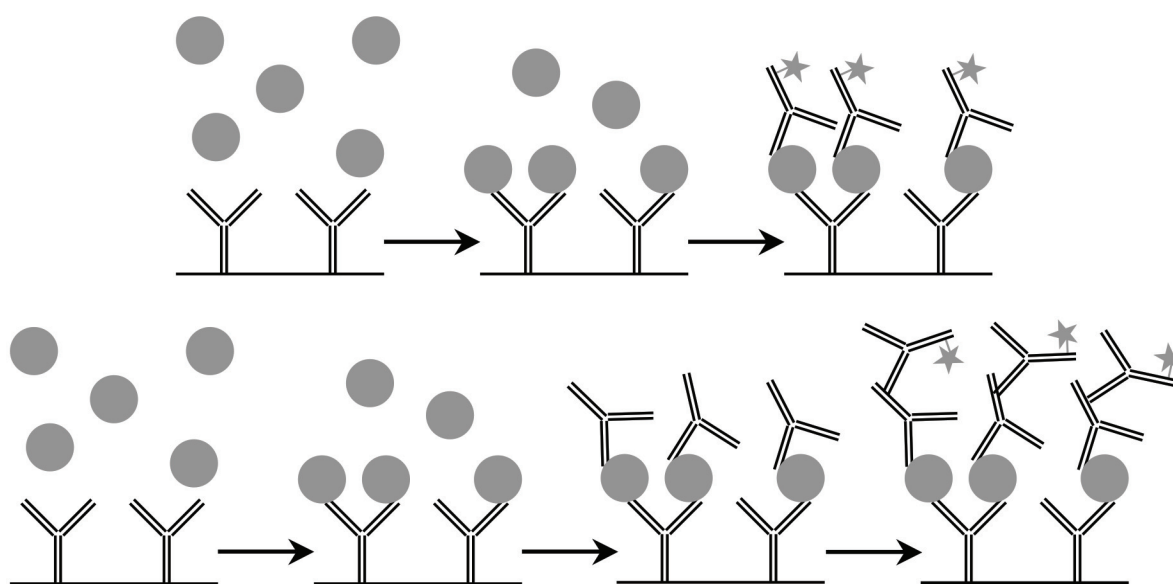


Figure A. 5 : Test indirect, ou test « sandwich » ; en haut, avec anticorps primaire marqué, en bas, avec un second anticorps primaire (anticorps de détection), quantifié par un anticorps secondaire marqué.



Figure A. 6 : Légende des schémas illustrant les variantes de la technique ELISA.

Une variante de cet immunodosage ELISA, appelée méthode directe, consiste à immobiliser l'espèce cible directement sur le puits, comme représenté sur la figure suivante.

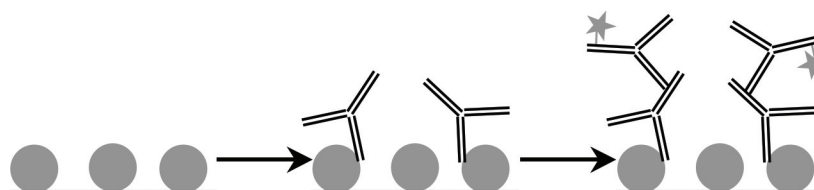


Figure A. 7 : Test direct.

Le test direct est efficace lorsque l'antigène cible est de petite dimension, ne comporte qu'un nombre restreint d'épitopes, et se lie facilement sur le puits. Le test indirect ou sandwich sera préféré si l'antigène cible s'adsorbe mal sur le puits. Il est cependant restreint à des antigènes suffisamment gros pour présenter de nombreux épitopes et ainsi permettre la fixation des deux anticorps, de capture et de détection.

1.3 Modes et techniques de détection

Dans les modes (ou types) non compétitifs qui viennent d'être présentés, le milieu ne contient que l'antigène (espèce cible) provenant de l'échantillon analysé. Le signal obtenu est donc proportionnel à la quantité d'espèces cibles. D'autres modes de détection sont également utilisés, en fonction de la taille et de la concentration des espèces cibles à détecter et quantifier. Tous nécessitent notamment l'utilisation d'un agent saturant après adsorption et d'un anticorps marqué, ainsi qu'une détection de fluorescence ou d'intensité colorimétrique.

Ainsi, dans le mode compétitif [ROU97], est injectée dans le puits sensibilisé avec la solution de test, une solution du composé cible (espèce modèle) déjà lié par covalence à une enzyme. Les deux formes du composé sont ainsi en concurrence pendant la durée de l'incubation pour se fixer sur les anticorps adsorbés sur le puits. De la même façon que précédemment, après rinçage, le substrat S de l'enzyme et le chromogène C sont introduits pour former une solution dont la coloration sera fonction de la concentration de composé marqué effectivement lié. Dans ce cas, moins il y aura de composés (libres) dans l'échantillon de test, plus il y aura de composés marqués, et donc d'enzymes, fixés, et plus la coloration sera forte, contrairement au cas précédent.

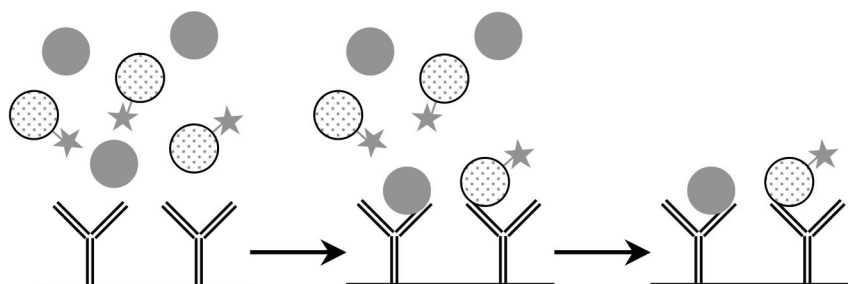


Figure A. 8 : Test avec compétition.

Une autre variante, utilisée pour les espèces de petite taille, est le test avec inhibition. Pour réaliser ce test, les espèces cibles dans l'échantillon de test sont préalablement mises en présence d'anticorps marqués, en concentration connue. Parallèlement, une solution d'espèces cibles modèles est placée dans le puits pour immobilisation sur les parois. Après rinçage, l'échantillon de test contenant des anticorps liés aux espèces cibles et les formes libres de ces deux composés, est placé dans le puits. Seuls les anticorps restés libres (non inhibés par l'espèce cible) vont pouvoir s'immobiliser sur les espèces modèles en surface du puits. Comme dans la méthode par compétition, pour une concentration donnée d'anticorps marqués introduits dans l'échantillon de test, plus la concentration initiale d'espèces cibles est faible, plus la concentration d'anticorps restés libres sera importante, et donc plus la coloration sera forte.

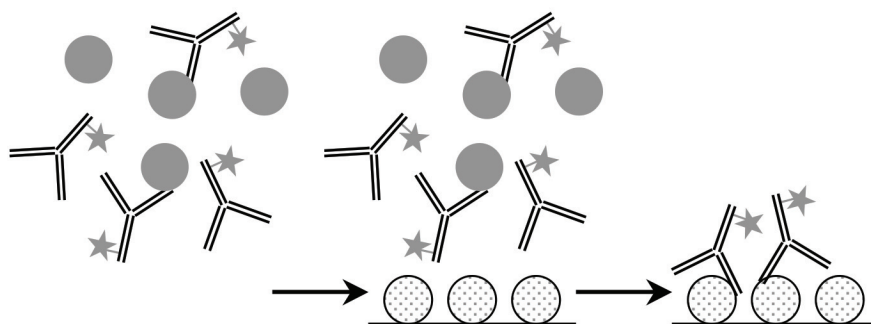


Figure A. 9 : Test avec inhibition.

Une technique utilisant des particules magnétiques d'environ 1 μm , sur lesquelles sont fixés de façon covalente les anticorps, a également été développée par la société Ohmicron. La figure représente cette technique appliquée dans le cas du test avec compétition. Après incubation et avant lavage, un champ magnétique permet d'attirer les anticorps par l'intermédiaire des billes magnétiques contre les parois du puits.

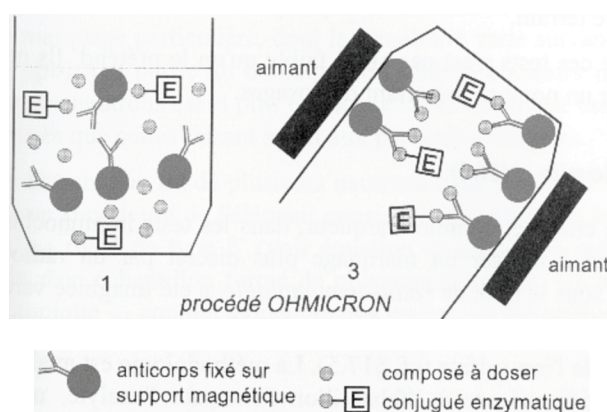


Figure A. 10 : Test avec compétition utilisant des particules magnétiques (procédé Ohmicron) [ROU97].

L'utilisation de billes magnétiques présente l'avantage de favoriser les interactions entre anticorps et antigènes qui mélangent mieux dans le volume du tube que fixés sur les parois. De plus, la quantité d'anticorps peut être plus importante puisqu'ils peuvent recouvrir la surface des billes magnétiques, ce qui permet d'amplifier la réponse globale.

1.4 Bilan

La technique ELISA apporte sensibilité (facteur d'amplification de l'enzyme) et spécificité (réaction immunologique). Elle nécessite peu d'optimisation, est facile à utiliser et ne requiert pas de maintenance. Elle permet d'analyser 96 échantillons par plaque simultanément, ce qui, malgré la durée importante d'un test (3 à 5 heures), donne un temps de mesure par échantillon assez court. Néanmoins, c'est une méthode de mesure indirecte, qui ne permet donc pas un suivi en temps réel des interactions. D'autres désavantages concernent le temps de développement des analyses, une dynamique linéaire assez faible pour les petites molécules (effet de l'échelle logarithmique pour les concentrations, nécessitant un ajustage de la dilution), de grandes quantités de substrat et de consommables non réutilisables. Enfin, la possibilité d'analyser des produits recombinants en développement est limitée et requiert l'achat de produits à coût élevé.

Un intérêt majeur du biocapteur, dans le cas d'une détection directe, réside dans la possibilité de suivre l'immobilisation des espèces cibles, sans marquage ni injection d'un second anticorps.

2 Titrage d'espèces vivantes

Nous prendrons l'exemple du titrage des bactériophages M13 utilisés dans ce document comme espèce cible modèle.

Dans un premier temps, la solution à titrer est diluée en série dans une gamme appropriée (1). Ensuite, des suspensions de bactéries compétentes sont inoculées et incubées avec chaque dilution afin de permettre l'infection des bactéries indicatrices par les bactériophages (environ 30 minutes), puis déposées sur du milieu de culture dans une boîte de Pétri (2). Enfin, la quantité de phages est estimée par comptage des plages de lyse obtenues sur le tapis bactérien (3). En tenant compte de la dilution, et en considérant que chaque plaque résulte de l'infection d'une bactérie par une unité phagique, la concentration de la solution titrée peut être exprimée en PFU (Plaque Forming Unit) par mL.

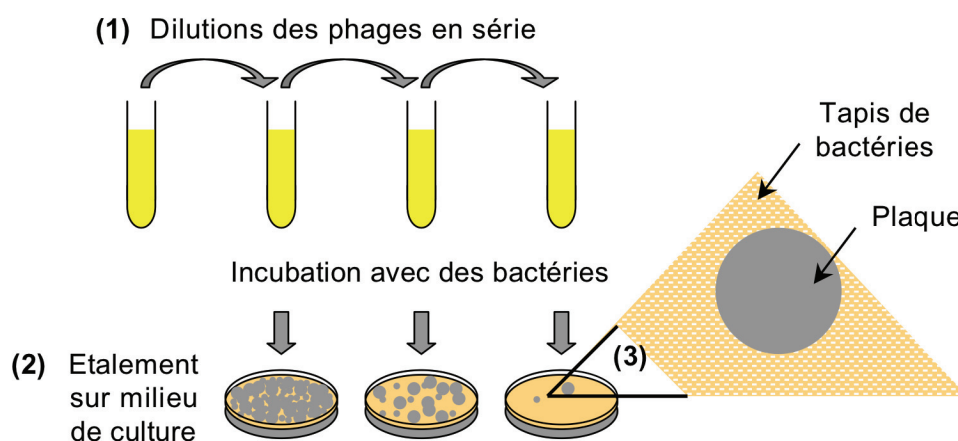


Figure A. 11 : Représentation schématique du procédé de titrage de bactériophages.

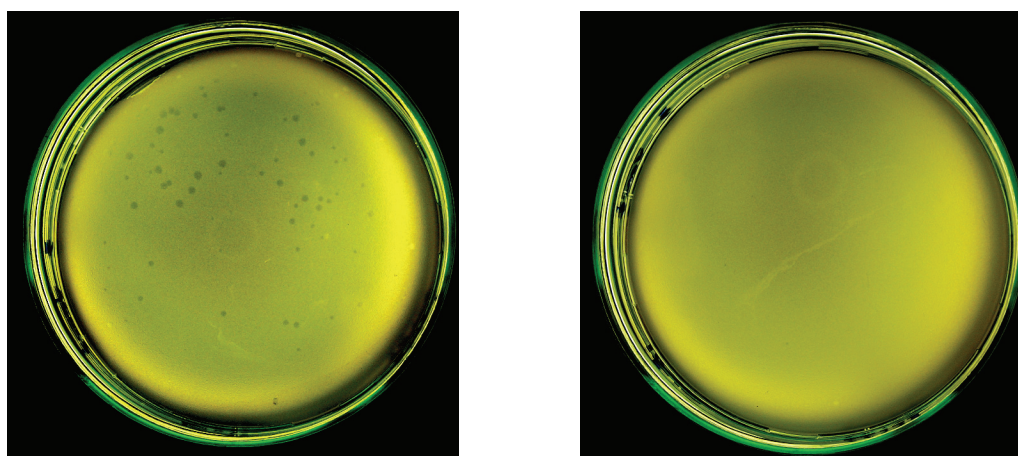


Figure A. 12 : Images de boîtes de Pétri, avec dilution de phages et plaques de lyse (à gauche), et témoin (à droite).

3 Production d'anticorps

La mise au point d'anticorps spécifiques est une phase difficile. Nous présentons seulement ici les grandes lignes d'un protocole classique pour la production d'anticorps polyclonaux, à partir de [ROU97], et monoclonaux, à partir de [KOO04].

3.1 Anticorps polyclonaux (Pab)

Pour cela, l'antigène est injecté de manière sous-cutanée ou intradermique à 5 ou 6 rats. Suite à cette primo-injection en plusieurs points, les animaux, même s'ils ont le même patrimoine génétique, ne réagissent pas de la même façon. Deux semaines après, une seconde injection est réalisée, avec 5 fois moins d'immunogène. Deux semaines plus tard, un prélèvement de sang est réalisé pour voir si l'anticorps est apparu. Ces injections sont répétées encore deux ou trois fois, pour créer une hyperimmunisation. Le sérum de ces animaux est alors devenu une source de l'anticorps cherché, de type polyclonal, ou Pab pour « Polyclonal antibody », puisqu'il contient des anticorps dirigés contre les différents épitopes de la substance immunogène.

Pour générer des anticorps dirigés contre des haptènes (petites molécules organiques présentant des propriétés antigéniques, mais non immunogènes), il faut coupler ces molécules par liaison covalente à des protéines porteuses (BSA ou HSA, « Bovine ou Human Serum Albumine »), ou à des polysaccharides. L'haptène doit donc avoir des groupements réactifs. Cette modification ne doit pas influencer sur la spécificité de l'anticorps produit. Typiquement, si une seule molécule d'haptène est liée à une protéine porteuse, l'anticorps qui va se former sera surtout dirigé contre des épitopes de la protéine. On cherchera donc à fixer le maximum de molécules d'haptène sur une même molécule de protéine (une cinquantaine par exemple). Ainsi, les anticorps seront majoritairement spécifiques de l'haptène. La primo-injection correspond à environ 100 µg de molécules d'haptène.

3.2 Anticorps monoclonaux (Mab)

Les anticorps monoclonaux, ou Mab pour « Monoclonal antibody », sont sécrétés par des cellules immunitaires qui descendent d'une seule cellule productrice d'anticorps (un seul clone cellulaire). Ils sont dirigés contre un épitope donné d'une substance immunogène, que l'on appelle le déterminant antigénique.

Pour obtenir des Mab, les lymphocytes de la rate d'une souris immunisée sont isolés et fusionnés avec des cellules tumorales murines (myélome). Cette opération est nécessaire car la durée de vie des lymphocytes produisant des anticorps n'est que de quelques semaines en culture. Par fusion avec une cellule tumorale apparaissent des cellules hybrides encore appelées hybridomes qui sont potentiellement immortelles.

La fusion de cellules est un événement rare dont la fréquence est augmentée par l'emploi de polyéthylène glycol (PEG). Pour ne récupérer que les cellules réellement fusionnées, la culture primaire est incubée pendant une durée assez importante avec un milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine), dans lequel seuls les hybridomes peuvent survivre, à l'exclusion des cellules de myélome et des cellules de rate.

Parmi les cellules fusionnées, seules quelques-unes sécrètent des anticorps, ces hybridomes doivent être isolés et multipliés par clonage. Après avoir testé chaque clone pour déterminer les anticorps produits, les cultures positives sont choisies et sélectionnées par un clonage supplémentaire. Le résultat aboutit à un hybridome qui forme des anticorps monoclonaux.

La production de ces Mab s'effectue finalement *in vitro* en utilisant un bioréacteur ou *in vivo* en générant chez une souris un liquide d'ascite.

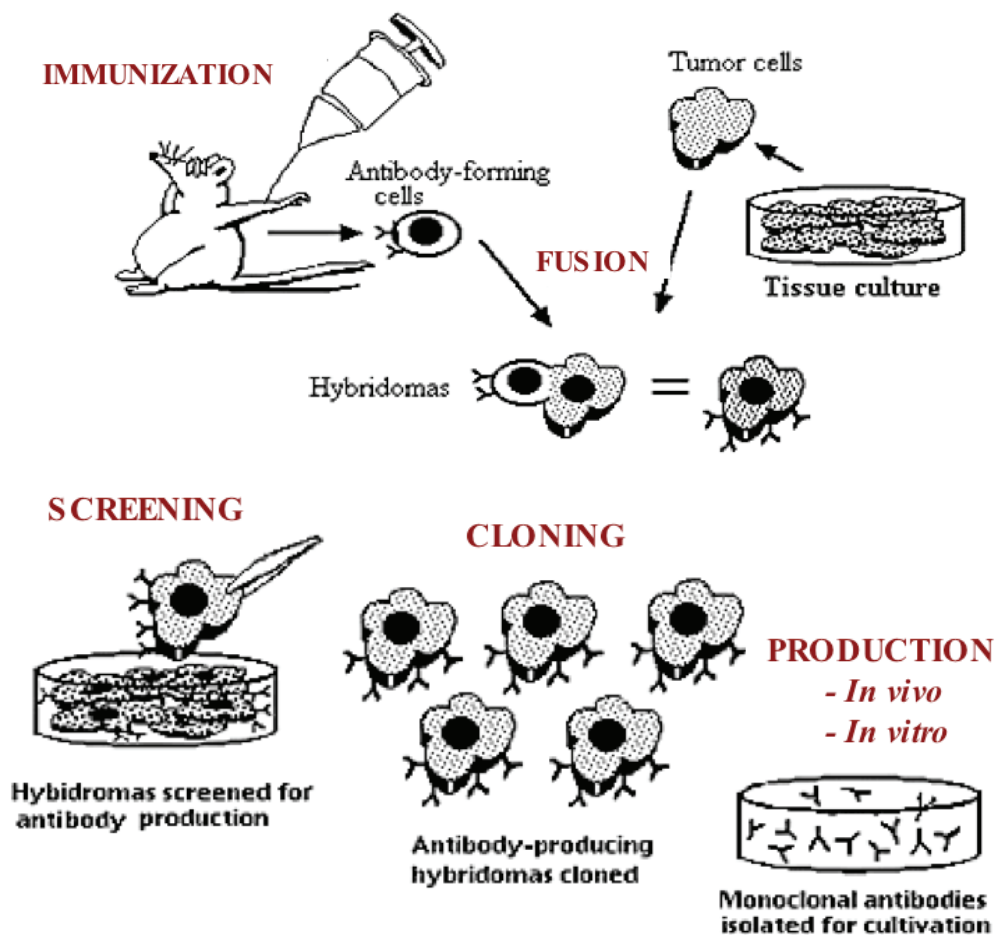


Figure A. 13 : Illustration des 5 étapes principales de la production d'anticorps monoclonaux (à partir de [GCH]).

4 Références bibliographiques

- [GCH] www.gch.ulaval.ca/agarnier/spharma3/
Fichier [Biotechnologie Pharmaceutique 050411.ppt](#)
Université Laval, département de génie chimique, Québec, Canada.
- [KOO04] J. Koolman, K.H. Röhm
Atlas de Biochimie.
3ème édition, Flammarion, 2004, ISBN 2-257-13114-2.
- [MAI04] E. Maillart
Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel.
Thèse de Doctorat, Université Paris XI Orsay, 30 juin 2004.
- [ROU97] F. Rouessac, A. Rouessac
Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes
3^e édition, Masson, Paris, 1997, ISBN 2-225-85445-9

Annexe : Glossaire

Acide aminé (ou Aminoacide)

Molécule organique portant un groupement chimique carboné COOH (fonction acide) et un groupement chimique azoté NH₂ (fonction amine). Les acides aminés sont les monomères constitutifs des protéines.

ADN (Acide DésoxyriboNucléique, DNA dans la terminologie anglo-saxonne)

Acide nucléique caractéristique des chromosomes, constitué de deux brins enroulés en double hélice et formés chacun d'une succession de nucléotides. Porteur de l'information génétique, l'ADN assure le contrôle de l'activité des cellules.

Affinité

Force de liaison d'un site moléculaire à son ligand. Dans le cas d'une interaction antigène-anticorps, c'est la constante d'association qui mesure la force et la stabilité de la liaison entre le paratope et l'épitope.

Albumine

Substance organique protéique, visqueuse à l'état pur, soluble dans l'eau, coagulable par la chaleur, contenue dans le blanc d'œuf, le plasma sanguin et le lait. Dans les analyses immunochimiques, l'albumine de sérum bovin (BSA) est utilisée à concentration élevée pour adhérer à tous les sites libres de la surface (saturation) et éviter la rétention non spécifique des anticorps et des ligands.

Amide

voir Liaison amide.

Analyte

Composé à analyser.

Anticorps (voir aussi immunoglobuline)

Substance protéique (immunoglobuline) synthétisée par les cellules du système immunitaire en réaction à l'introduction d'une substance étrangère, antigène, sur lequel elle se fixe spécifiquement pour en neutraliser l'effet toxique.

Anticorps monoclonal

Voir Monoclonal.

Antigène

Substance chimique isolée ou portée par une cellule ou un micro-organisme (molécule, hormone, virus, bactérie), qui, introduite dans l'organisme, est susceptible de provoquer une réaction spécifique du système immunitaire (production d'anticorps) visant à la détruire ou à la neutraliser. L'antigène est également capable de réagir avec l'anticorps qu'il a fait apparaître.

ARN (Acide RiboNucléique, RNA dans la terminologie anglo-saxonne)

Macromolécule biologique formée d'une seule chaîne de nucléotides, indispensable à la synthèse des protéines à partir du programme génétique porté par l'ADN.

Bacille

Bactérie de forme allongée dite en bâtonnet, dont de nombreuses espèces sont pathogènes : Bacille d'Eberth (typhoïde), Bacille de Koch (tuberculose), Bacille du charbon, Bacille intestinal (Colibacille, Nom scientifique : *Escherichia coli* ou *E. coli*).

Bactérie

Formées le plus souvent d'une cellule unique et ne comportant pas de noyau, les bactéries sont les plus petits organismes autonomes (de 1 à 5 micromètres), capables de se reproduire par division cellulaire. Elles peuvent vivre en saprophytes (se nourrissant de substances organiques en provoquant leur décomposition dans les sols, eaux ou organismes vivants) ou comme parasites de l'homme, des animaux et des plantes. *Bactérie de forme arrondie (-coque)*, *en forme de bâtonnet (Bacille)*, *spiralée (Spirille, spirochète)*.

Bactériophage

Virus infectant les bactéries. On dit aussi phage.

Biocapteur

Dispositif mettant en jeu des interactions biologiques couplées à un transducteur qui délivre, à partir de l'évènement de reconnaissance, un signal physique mesurable.

Biotine

Vitamine B8 ou H. Grâce à sa chaîne latérale lysine, la biotine est liée dans l'organisme de façon covalente aux résidus lysines d'enzymes qui catalysent des réactions de carboxylation. La biotine est associée avec une affinité élevée ($K_d = 10^{-15}$ M) et une grande spécificité à l'avidine, une protéine présente dans le blanc d'œuf.

BSA (Bovine Serum Albumin)

Albumine de sérum bovin habituellement utilisée dans les analyses immunologiques pour bloquer les sites non spécifiques de fixation des protéines (voir albumine).

Catalyse

Modification (surtout accélération) de la vitesse d'une réaction chimique sous l'effet d'une substance (catalyseur) qui intervient dans la réaction et qui est régénérée à la fin de celle-ci. (La catalyse abaisse la barrière d'énergie que doivent franchir les réactants). Les enzymes régissent les processus de catalyse.

Chromosome

Élément du noyau des cellules, formé d'une longue molécule d'ADN associée à des protéines.

Coenzyme

Petite molécule organique attachée à une enzyme, et qui la rend active. C'est une partie non protéique, constituée généralement d'un oligo-élément ou d'une vitamine, de poids moléculaire faible (ATP : 500 ; biotine : 185).

Couche sensible

Partie biosélective du biocapteur.

Dalton (Da)

Unité de masse égale au douzième de la masse d'un atome de carbone 12 (C^{12}), soit $1,6605 \cdot 10^{-27}$ kg. Le dalton est utilisé pour exprimer la masse des molécules protéiques. La masse molaire de l'élément est calculée en multipliant sa masse en daltons par la constante d'Avogadro, soit $6,02 \cdot 10^{23}$. Ainsi, un élément de 1 Da aura une masse molaire de $1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Densité optique (DO)

La densité optique, notée DO, correspond à une mesure d'absorption d'un milieu coloré à l'aide d'un spectrophotomètre émettant un faisceau d'ondes monochromatiques, qui permet de déterminer la concentration d'une substance grâce à la loi de Beer-Lambert : $DO = \varepsilon \cdot L \cdot C$, avec ε l'absorbance (m^{-1}), L l'épaisseur du milieu coloré (m) et C la concentration (%), ou bien ε le coefficient d'extinction molaire caractéristique de la substance étudiée à la longueur d'onde utilisée ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), L l'épaisseur de la solution (cm) et C la concentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Méthode immunologique d'analyse dans laquelle des antigènes ou des anticorps sont détectés, après liaison à une phase solide, à l'aide d'un ligand couplé à une enzyme. Cette enzyme de marquage, en présence de son substrat spécifique et d'un chromogène destiné à réagir sur le produit de la réaction, provoque la formation d'une espèce colorée dont la mesure de la densité optique (DO), ou absorbance, au bout d'un temps donné, donne une indication sur la quantité d'antigène fixé.

Elution

Séparation de corps adsorbés par lavage progressif.

Enzyme

Substance protéinique de l'organisme (suff. *-ase*), constituée d'une longue chaîne structurée à partir de 20 acides aminés différents, et qui accélère (catalyse) spécifiquement une réaction biochimique. Il y a six classes d'enzymes : les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases.

Epitope (ou déterminant antigénique)

Structure présente à la surface d'une molécule d'antigène, capable de se combiner à une seule molécule d'anticorps. Un antigène peut posséder différents épitopes et donc être reconnu par différents anticorps.

Escherichia coli (E. coli)

Colibacilles gram négative, anaérobies facultatifs, très répandus, vivant normalement dans l'intestin mais pouvant contaminer l'environnement. Ces bactéries, habituellement non pathogènes, sont parfois source d'infection (gastro-entérites, infections urinaires, etc.) et sont utilisées couramment par la recherche biologique et médicale.

FIA

Flow Injection Analysis. Il s'agit d'un système d'analyse en continu, constitué par la circulation d'un fluide (électrolyte, tampon, etc) dans lequel est injectée, à intervalle de temps régulier, une certaine quantité de la solution à analyser, ainsi véhiculée sur le capteur, ou une solution de lavage ou de régénération de la surface du capteur.

Gène

Segment d'ADN transmis héréditairement et participant à la synthèse d'une molécule fonctionnelle. Ce produit final du gène est généralement une protéine, correspondant à un caractère déterminé, produite par l'intermédiaire d'un ARN messenger. Mais les gènes peuvent aussi produire des ARN non messagers, ne véhiculant pas une information destinée à la production de protéines, mais fonctionnant en tant que molécules autonomes dans les cellules.

Globulines

Ensemble des protéines sériques (du plasma sanguin), à l'exception de l'albumine, de poids moléculaire élevé, qui comprend notamment les anticorps (immunoglobulines).

Glycine

Nom courant de l'acide aminoacétique, la glycine est un des 20 acides aminés entrant dans la composition des protéines.

Glycoprotéine

Protéine combinée à un glucide.

Glucide

Voir *sucre*.

Haptène

Petite molécule organique capable de réagir avec des anticorps déjà existants (caractère antigénique), mais non immunogène, c'est-à-dire incapable par elle-même de provoquer une synthèse d'anticorps, du fait de sa faible taille. La production

d'anticorps est réalisée en liant des molécules d'haptène, équipées d'un bras espaceur et d'une fonction chimique, à une protéine porteuse (cf. Annexe « Techniques immunologiques »).

Immunogène

Propriété d'une substance de pouvoir provoquer une réaction spécifique du système immunitaire (production d'anticorps).

Immunoglobulines

Terme générique désignant l'ensemble des globulines sériques (du plasma sanguin) constituant les anticorps. Elles sont réparties en cinq classes selon la structure de leurs chaînes lourdes : IgG (isotype gamma), IgA (isotype alpha), IgM (isotype mu), IgD (isotype delta) et IgE (isotype epsilon). Les plus étudiées et les plus simples, représentant 80% des anticorps, sont les immunoglobulines de type G (IgG), de masse molaire environ 150 kDa, formées de 4 chaînes protéiques (2 lourdes, notées H, de masse molaire $M = 50$ kDa, portant des résidus glucidiques, et 2 légères, notées L, $M = 25$ kDa), liées par des liaisons disulfures. Ces chaînes protéiques, repliées, confèrent à l'anticorps une forme globale ressemblant à un « Y », dont les extrémités des deux bras identiques, ou paratopes, sont les sites de combinaison spécifique à l'épitope de l'antigène cible. Ces deux bras sont reliés par une région charnière à une partie fixe. Une molécule d'IgG occupe un volume d'environ $15 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$ mais ces dimensions peuvent varier du fait de la flexibilité de la région charnière.

Immunocapteur

Biocapteur analysant des interactions immunochimiques entre un antigène et un anticorps.

Liaison amide (ou liaison peptidique)

Liaison covalente entre un groupement chimique carboné COOH (fonction acide carboxylique) et un groupement chimique azoté NH_2 (fonction amine primaire).

Liaison covalente

Liaison chimique de forte énergie, donc stable, dans laquelle chacun des atomes liés met en commun un ou plusieurs électrons de ses couches externes.

Liaison faible

Liaison chimique de basse énergie comme les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques, les forces de van der Waals et les interactions électrostatiques.

Lyse bactérienne

Destruction de la cellule bactérienne par un agent physique, chimique ou biologique.

Monoclonal (anticorps)

Anticorps issu d'un unique clone cellulaire et dirigé contre un seul déterminant antigénique.

Nucléotide

Nom courant donné aux constituants de l'ADN ou de l'ARN, formés d'une base azotée liée à un sucre (ribose pour l'ARN et désoxyribose pour l'ADN) et à groupement phosphate. Les nucléotides sont associés par leur extrémité phosphate, qui forme le squelette de la chaîne (ADN ou ARN).

Paratope

Partie variable de la molécule d'anticorps, constituant le site de la combinaison spécifique un déterminant antigénique (épitope). Un anticorps possède deux paratopes identiques (les extrémités des deux bras du « Y »).

PBS (Phosphate Buffer Saline)

Solution tamponnée à base phosphate, de NaCl et de KCl, dont la composition permet d'obtenir des conditions de pH et de pression osmotique proches des

conditions physiologiques (ex. : pH = 7,4 pour NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, tampon phosphate 0,01 M).

Peptide

Chaîne d'acides aminés reliés par des liaisons amides, ou liaisons peptidiques.

Phase exponentielle de croissance

Phase de la croissance bactérienne pendant laquelle le taux de croissance est maximum et la masse cellulaire représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

Physiosorption

Adsorption physique conservant l'identité de la molécule adsorbée. Première étape (et parfois la seule) de l'adsorption, elle met en jeu des interactions de type force de van der Waals, forces polaires et liaisons hydrogènes entre la surface du solide et les molécules adsorbées.

Polyclonal (anticorps)

Un anticorps polyclonal issu d'un organisme est obtenu en collectant les anticorps présents dans cet organisme.

Polypeptide

Association de peptides reliés par des ponts disulfures.

Polysaccharide

Voir *sucre*.

Protéine

Macromolécule constituée de longues chaînes d'acides aminés (polypeptide) qui se replient sur elles-mêmes et adoptent des conformations très spécifiques dans l'espace. Les protéines sont issues de la traduction du code génétique et assurent un grand nombre de fonctions dans la cellule (fonctions structurales, enzymatiques, signalisation cellulaire...).

Pseudomonas

Bacilles gram négatifs, aérobies strictes, dont certaines espèces sont pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes. Ces bactéries sont largement impliquées dans les infections nosocomiales, et souvent multi-résistantes aux antibiotiques.

Réticulation

Réaction chimique, se produisant lors d'une polymérisation, d'une polycondensation ou d'une polyaddition, et qui lie entre elles de manière permanente (par liaison covalente) les macromolécules qui constituent un polymère.

Sonication

Dispersion, déstructuration ou désactivation de matériel biologique, obtenue par traitement aux ultrasons.

Spécificité

Capacité d'un récepteur à distinguer son ligand des autres espèces présentes.

Spore bactérienne

Formation arrondie unicellulaire sous laquelle peuvent se présenter certaines bactéries et qui est plus résistante à des conditions défavorables. La germination d'une spore donne un nouvel individu (bactérie).

Streptocoques

Bactéries de forme arrondie (cocci), gram positifs, aérobies facultatifs, disposées par paires ou par chaînettes. Elles peuvent être commensaux ou parasites de l'homme (et des animaux) et plusieurs espèces peuvent développer un fort pouvoir pathogène à l'origine d'infections diverses (impétigo, angines, méningites, septicémies).

Sucre

Les sucres ou glucides (hydrates de carbone $C_n(H_2O)_m$) sont un groupe de substances naturelles comportant un groupement carbonyle (aldéhyde ou cétone) et plusieurs

groupes hydroxyles. Cette famille comprend les sucres simples (monosaccharides ou oses), ne comportant qu'une chaîne carbonée sans ramification, et leurs polymères, oligo- et polysaccharides, formés d'un très grand nombre d'oses, comme l'amidon, la cellulose, le glycogène. Notons également les dextrans, polysaccharides bactériens, qui forment en présence d'eau des mucilages visqueux ou des gels qui, après réticulation chimique, sont utilisés pour la séparation chromatographique des macromolécules.

Tampon

Système formé par une solution d'un sel d'acide fort avec une base faible, ou d'un sel d'acide faible avec une base forte, dont le pH varie peu lors de l'addition d'un produit basique ou acide.

Titration / Titration

Quantification des espèces présentes dans une suspension biologique.

Toxine

Substance toxique élaborée par un organisme vivant (bactérie, champignon vénéneux, insecte ou serpent venimeux) auquel elle confère son pouvoir pathogène, et agissant comme antigène (en provoquant la production d'anticorps).

Tween

Détergent, surfactant permettant d'améliorer la mouillabilité des surfaces.

Virus

Micro-organisme infectieux très petit, constitué essentiellement de protéines (enveloppe) et d'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN), ne pouvant se multiplier qu'en utilisant les fonctions enzymatiques et métaboliques de la cellule d'un autre organisme vivant (parasite obligatoire).