Étude et mise au point d'une plateforme de biodétection de micro-organismes couplant immunocapteur a ondes de love et dispositfs PDMS microfluidiques

Hakim Tarbague

▶ **To cite this version:**

Hakim Tarbague. Étude et mise au point d'une plateforme de biodétection de micro-organismes couplant immunocapteur a ondes de love et dispositfs PDMS microfluidiques. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2011. Français. NNT : . tel-00985746

HAL Id: tel-00985746

https://theses.hal.science/tel-00985746

Submitted on 30 Apr 2014

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

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

N° d'ordre :**4290**

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

Par **Hakim Tarbague**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ: ÉLECTRONIQUE

ÉTUDE ET MISE AU POINT D'UNE PLATEFORME DE BIODÉTECTION DE MICRO-ORGANISMES COUPLANT IMMUNOCAPTEUR A ONDES DE LOVE ET DISPOSITFS PDMS MICROFLUIDIQUES

Soutenue le 06 juillet 2011

Après avis des rapporteurs

M. Bertrand BOCQUET	Professeur	Rapporteur
M^{me} Anne-Marie GUE	Directeur de recherche, CNRS	Rapporteur

Devant la commission d'examen composée de :

M^{me} Corinne DEJOUS	Professeur, IPB/ENSEIRB-MATMECA	Directrice de thèse
M. Daniel MOYNET	Maître de conférences, LIMP Bordeaux	Invité
M. Vincent RAIMBAULT	Chargé de recherche, CNRS	Examinateur
M. Louis RENAUD	Maître de conférences, UCB Lyon 1	Rapporteur de soutenance
M. Dominique REBIERE	Professeur, Université Bordeaux 1/IUT GEII	Codirecteur de thèse
M Luc VELLUTINI	Maître de conférences, ISM Bordeaux 1	Invité

“Il est absolument possible,

Qu’au-delà de ce que perçoivent nos sens,

Se cachent des mondes insoupçonnés”

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement Corinne Dejous, Professeur à l'Institut Polytechnique de Bordeaux, qui a accepté de diriger ma thèse, pour son soutien, son écoute, sa disponibilité et la liberté qu'elle a accordé à mon travail de recherche.

Mes remerciements s'adressent aussi à Dominique REBIERE, Professeur à l'Université de Bordeaux 1, pour ses conseils, sa disponibilité et son investissement dans l'encadrement de cette thèse.

Je tiens à remercier Vincent Raimbault, Chargé de Recherche CNRS, pour ses relectures et sa participation à mon jury de thèse.

De vifs remerciements vont à Serge Destor, Technicien, pour sa grande disponibilité, ses précieux conseils et son investissement dans ce projet.

Mes remerciements vont aussi à Jeau-Luc Lachaud, Ingénieur d'études au Laboratoire IMS, pour ses compétences techniques et ses conseils.

Je remercie Bernard Bocquet, Professeur à l'Institut d'Electronique, de microélectronique et de Nanotechnologie de Villeneuve d'Ascq, ainsi qu'Anne-Marie Gue, Directeur de recherche au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes de Toulouse, d'avoir accepté d'être rapporteur de ces travaux de thèse.

J'aimerais remercier également toutes les personnes ayant contribué à l'avancement de mes travaux de thèse, et particulièrement :

Bernard BENNETAU, Directeur de recherche CNRS, Jean-Paul PILLOT, et Luc VELLUTINI, de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux, pour leur travaux en chimie organique et la réalisation de films minces.

Daniel Moynet, Djavad Mossalayi, Professeur, et Emilie Pascal, Ingénieur, du Laboratoire d'Immunologie Moléculaire et Parasitologie de Bordeaux, pour leur accueil au sein de leur laboratoire et pour m'avoir initié à la manipulation biologique.

Je tiens également à remercier tous les doctorants de l'équipe *Microsystèmes de détection acoustiques* ainsi que l'ensemble des doctorants du laboratoire IMS.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans le financement accordé par l'Agence Nationale de la Recherche à laquelle je tiens à exprimer ma gratitude.

Je remercie ma compagne et ma famille qui ont été chaque jour présentes dans cette aventure.

Tables des matières

Nomenclature des abréviations utilisées 13

Table des figures 17

Table des photos 25

Table des tableaux 27

Introduction 29

1. État de l'art 35

1.1. Généralités sur les biocapteurs : 35

1.2. Le biorécepteur 38

1.2.1. Une grande variété de biorécepteurs 39

1.2.1.1. L'acide désoxyribonucléique (ADN) 39

1.2.1.2. Anticorps : 39

1.2.1.3. Les enzymes : 40

1.2.1.4. Les micro-organismes, tissus biologiques : 40

1.2.2. Immobilisation du biorécepteur sur le transducteur 40

1.3. Plateformes de détection dédiées à la biologie 41

1.3.1. Plateformes électrochimiques 42

1.3.1.1. L'ampérométrie 42

1.3.1.2. La potentiométrie 43

1.3.1.3. L'impédancemétrie 43

1.3.2. Plateformes optiques 44

1.3.2.1. La photoluminescence 44

1.3.2.2. Les ondes évanescentes 45

1.3.2.3. Capteurs à ellipsométrie 47

1.3.2.4. Plateformes térahertz 48

1.3.3. Plateformes à ondes acoustiques 48

1.3.3.1. Capteurs à ondes de volume ou BAW (Bulk Acoustic Wave) 49

1.3.3.2. Capteurs à ondes de surface ou SAW 49
1.3.4. Tableaux récapitulatifs des principaux types de transduction et leurs applications pour la biodétection d'*E. Coli* 53
1.4. De l'intérêt de l'approche microfluidique 56
1.4.1. L'avènement de la microfluidique 56
1.4.2. Principe de la Microfabrication : "Softlithographie-PDMS" 57
1.4.3. Association systèmes microfluidiques - plateformes acoustiques 58
1.5. Conclusion 60

2. Dynamique des fluides 61
2.1. Continuité et propriétés physiques des fluides 61
2.1.1. Description du milieu continu 61
2.1.2. Viscosité 63
2.1.3. Conductivité thermique 67
2.1.4. Compressibilité et dilatation thermique 68
2.2. Description du mouvement et de l'énergie des fluides 70
2.2.1. Modèle général de Navier-Stokes 70
2.2.1.1. Conservation de la masse - équation de continuité 70
2.2.1.2. Bilan de quantité de mouvement - équation de la dynamique 71
2.2.1.3. Bilan de l'énergie 72
2.2.2. Formes adimensionnelles de l'équation de Navier-Stokes – Nombres caractéristiques des écoulements 75
2.2.2.1. Forme adimensionnelle pour la quantité de mouvement 76
2.2.2.2. Forme adimensionnelle pour l'énergie 77
2.2.2.3. Forme adimensionnée temporelle de Navier-Stokes - Échelles de temps pour la quantité de mouvement 78
2.2.2.4. Nombre de Reynolds 79
2.2.2.5. Nombre de Péclet 80
2.2.2.6. Nombre de Strouhal 81
2.3. Application à la conception de cellules microfluidiques 81
2.3.1. Ondes acoustiques en milieu liquide 81
2.3.2. Application des modèles de Navier-Stokes aux dispositifs de détection de bio-organismes 85
2.3.3. Dispositifs pour configuration statique 86

2.3.3.1. Principe du dispositif 86
2.3.3.2. Détermination des temps de diffusion et d'advection en configuration statique 87
2.3.3.3. Remarque sur la diffusion et le mélange 89
2.3.4. Dispositifs pour configuration dynamique millifluidique 89
2.3.4.1. Principe du dispositif 89
2.3.4.2. Circulation en « U », écoulement à vitesse constante 90
2.3.5. Dispositifs avec réseaux microfluidiques 93
2.3.5.1. Principe du dispositif 93
2.3.5.2. Avantages de la puce PHD2 à réseaux microfluidiques 94
2.3.5.3. Bilan de quantité de mouvement en microfluidique 95
2.3.5.4. Bilan thermique en microfluidique 99
2.4. Conclusion 101

3. Plateforme de détection à ondes de Love avec puces milli et microfluidiques 103

3.1. Introduction 103
3.2. Le capteur à ondes de Love 103
3.2.1. Géométrie du capteur à ondes de Love 103
3.2.2. Choix de la couche guidante 105
3.2.3. La chaîne électronique de conditionnement: configuration en oscillation 107
3.2.4. Sensibilité en fréquence 108
3.3. Développement d'architectures PDMS 109
3.3.1. Introduction 109
3.3.2. Cahier des charges des puces PDMS et prototypage 110
3.3.3. Les puces PDMS pour le protocole hydrostatique 111
3.3.3.1. Puces PDMS PHS1 pour le protocole hydrostatique de première génération 111
3.3.3.2. Puces PDMS PHS2 pour le protocole hydrostatique 115
3.3.3.3. Les puces PDMS pour le protocole hydrodynamique 121
3.3.3.4. Puces PDMS PHD1 pour le protocole hydrodynamique 122
3.3.3.5. Puces PDMS PHD2 avec réseaux microfluidiques pour le protocole hydrodynamique 125

3.4. Banc de mesure 133

3.4.1. Ensemble du dispositif expérimental 133

3.4.2. Développement d'une cellule de test adaptée aux puces PDMS PHD2 136

3.4.3. Système de contrôle en température, céramiques chauffantes 140

3.5. Conclusion 140

4. Application à la détection biologique 143

4.1. Préparation et utilisation des capteurs 143

4.1.1. Greffage de l'agent de liaison 143

4.1.2. Utilisation et stockage des capteurs 144

4.1.3. Phénomène de dérive 145

4.2. Greffage des anticorps 146

4.2.1. Nature des anticorps 146

4.2.2. Suivi par le capteur de l'immobilisation des anticorps en régime statique 147

4.2.3. Influence du protocole dynamique sur la cinétique de greffage des anticorps 149

4.3. Détection des bactéries *E. Coli* en régime statique 153

4.3.1. Introduction 153

4.3.2. Détection indirecte en régime statique 154

4.3.3. Nouvelle stratégie : utilisation de PEG (polyéthylène glycol) pour la détection directe et indirecte en régime statique 157

4.3.3.1. Réponses typiques obtenues avec le protocole $DRSI_{PEG}$ 161

4.3.3.2. Réponses typiques obtenues avec le protocole $DRSD_{PEG}$ 163

4.4. Détection des bactéries *E. Coli* en régime dynamique 165

4.4.1. Détection indirecte en régime dynamique avec puce PHD2 165

4.4.2. Détection directe en régime dynamique avec puces PHD1avec PEG 170

4.4.3. Détection directe en régime dynamique avec puces PHD2 174

4.4.4. Influence des géométries sur les cinétiques de réponse 177

4.5. Conclusion sur les détections de bactéries, perspectives 179

Conclusion générale 181

Annexe A : Démonstrations des équations 185

A 1 - Forme adimensionnelle pour la quantité de mouvement 185

A 2 - Forme adimensionnelle pour l'énergie 186

Annexe B : Matériel utilisé 189

B 1 - Composés chimiques 189

B 2 - Composés biologiques 191

B 3 - Matériel Salle blanche pour la lithographie douce. Appareils électroniques de mesure. Composants électriques 191

Annexe C : Protocoles de nettoyage des capteurs, de greffage des anticorps et de détection des bactéries 193

C 1 - Protocole de nettoyage des capteurs 193

Annexe D : Glossaire 195

Références 199

Nomenclature des abréviations utilisées

Nom	*Symbole*	*Unité*
Célérité de l'onde de pression traversant le fluide	c_e	$m.s^{-1}$
Coefficient de diffusion	D	$m^2.s^{-1}$
Coefficient de diffusion thermique	κ	$m^2.s^{-1}$
Coefficient de dilatation thermique	α	*sans*
Conductivité thermique	λ	$W.m^{-1}.K^{-1}$
Contrainte	$\vec{T}(P,\vec{n})$	N
Débit volumique	Q_V	$m^3.s^{-1}$
Densité de flux de chaleur	$\vec{q}$	$J.s^{-1}.m^{-2}$
Diffusivité thermique	a	$m^2.s^{-1}$
Distance de diffusion des espèces en solution	d_{Diff}	m
Échelle de Kolmogorov	η_K	m
Échelle de longueur du système	L_0	m
Échelle de pression	P_0	Pa
Échelle de température du système	Θ	K
Échelle de vitesse de l'écoulement	V_0	$m.s^{-1}$
Énergie cinétique	E_c	J
Énergie interne	E_i	J
Énergie interne par unité de masse	e	J
Flux de chaleur	Q	$J.s^{-1}$ *ou* W
Flux de chaleur	Φ_T	$J.s^{-1}$
Force	F	$kg.m.s^{-2}$
Force en volume par unité de masse	$\overrightarrow{F_m}$	$N.kg^{-1}$
Libre parcours moyen des molécules	λ_{lpm}	m

Nom	*Symbole*	*Unité*
Longueur de pénétration thermique	L_{ct}	*m*
Masse volumique	ρ	$kg.m^{-3}$
Module de rigidité transverse	G	*Pa*
Nombre d'Euler	E_u	*sans*
Nombre de Deborah	D_e	*sans*
Nombre de Froude	F_r	*sans*
Nombre de Knudsen	K_n	*sans*
Nombre de Mach	$\mathcal{M}$	*sans*
Nombre de Peclet	P_e	*sans*
Nombre de Prandtl	P_r	*sans*
Nombre de Reynolds	R_e	*sans*
Nombre de Strouhal	S_t	*sans*
Nombre d'Eckert	E_c	*sans*
Pertes de charge	$\zeta.$	*sans*
Plus grande dimension du système d'écoulement	L_0	*m*
Pression	P	*Pa*
Profondeur de pénétration de l'onde acoustique	δ_P	*m*
Puissance des forces visqueuses	Φ_M	$J.s^{-1}$
Puissance mécanique surfacique échangée avec l'extérieur	$\Pi_{ext}^{\mathcal{S}}$	$J.s^{-1}$
Puissance mécanique totale échangée avec l'extérieur	Π_{ext}^{W}	$J.s^{-1}$
Puissance mécanique volumique échangée avec l'extérieur	$\Pi_{ext}^{\mathcal{V}}$	$J.s^{-1}$
Puissance thermique totale échangée avec l'extérieur	Π_{ext}^{Q}	$J.s^{-1}$
Puissance totale échangée avec l'extérieur	Π_T	$J.s^{-1}$
Pulsation de l'onde de Love	ω	$rad.s^{-1}$
Sensibilité du capteur en vitesse à l'effet de masse	$S_m^{V_p}$	

Nom	*Symbole*	*Unité*
Sollicitation périodique du liquide	$h(t)$	m
Surface	A	m^2
Surface matérielle	$\mathcal{S}_m(t)$	m^2
Taux de cisaillement (fréquence de sollicitation du liquide)	γ	s^{-1}
Température	T	K
Tenseur des contraintes	τ_{ij}	Pa
Tenseur des vitesses de déformation	S_{ij}	Pa
Tenseur total des contraintes	σ_{ij}	Pa
Viscosité cinématique	υ	$m^2.s^{-1}$
Viscosité dynamique	μ	$kg.m^{-1}.s^{-1}$
Vitesse	$\vec{V}$	$m.s^{-1}$
Vitesse des particules dans le fluide	V_P	$m.s^{-1}$
Vitesses de propagation des ondes transverses de cisaillement	c_s	$m.s^{-1}$
Volume élémentaire	ε	m^3
Volume matériel	$\mathcal{V}_m(t)$	m^3

Table des figures

Chapitre 1 État de l'art

Figure 1-1 Synoptique d'un biocapteur 35

Figure 1-2 Principe du Biacore basé sur la variation d'angle du pic d'absorption (a) proportionnel à l'indice de réfraction du milieu, lui-même proportionnel à la concentration des analytes associés aux ligands (b) **[]** 46

Figure 1-3 Capteur à ondes BAW 49

Figure 1-4 Immonocapteur SAW réalisé par Saitakis et al. (2010) **[92]** 51

Figure 1-5 Capteur SAW à ondes de Love constitué de deux lignes à retard. 52

Chapitre 2 Dynamique des fluides

Figure 2-1 Domaine de continuité, homogénéité et inhomogénéité d'une grandeur physique $\mathcal{P}$ 62

Figure 2-2 Écoulement plan de Couette 63

Figure 2-3 Contraintes et composantes du tenseur des contraintes dans un repère tridimensionnel orthonormé 66

Figure 2-4 Comportements des fluides en fonction de la variation des contraintes par rapport au taux de cisaillement. 66

Figure 2-5 Transfert thermique entre deux plaques parallèles 67

Figure 2-6 du fait de la continuité du milieu, le volume A est égal au volume B 71

Figure 2-7 Profil de vitesse en fonction de la phase en proche paroi dû à l'oscillation engendrée par l'onde de Love. L'onde de Love cisaille le liquide parallèlement à la surface (sur x_2). Le profil des vitesses dépend de la phase de l'onde, δ_p est la profondeur de pénétration de l'onde dans le liquide. 82

Figure 2-8 Cellule PDMS PHS1 utilisée pour le protocole statique comportant deux réservoirs de 250µL et quatre cavités d'air protégeant les IDTs de chaque transducteur. 86

Figure 2-9 Cellule PDMS PHD1 utilisée pour le protocole statique comportant deux réservoirs de 5µL, avec les canaux d'arrivée et de sortie des liquides et quatre cavités d'air protégeant les IDTs de chaque transducteur. 89

Figure 2-10 Simulation des écoulements dans la cavité millifluidique de 3 mm de hauteur a : vue de face, b : vue de gauche, c :vue de dessus, d :vue isométrique Les vitesses sont indiquées en $m.s^{-1}$ 91

Figure 2-11 Simulation des écoulements dans une cavité microfluidique de 250µm de hauteur. 504254 mailles, ~6 heures de calcul 92

Figure 2-12 Puce PDMS PHD2 avec les deux réseaux microfluidiques 93

Figure 2-13 Simulation des écoulements dans une cavité microfluidique de 200µm de hauteur et 5 mm de largeur, coupe ne représentant que les vitesses comprises entre 1% de la vitesse maximale de l'écoulement et 100% de la vitesse maximale de l'écoulement. a : vue de dessus du dispositif sans élément de bifurcation b : vue de dessus du dispositif avec éléments de bifurcation 105541 mailles, ~2 heures de calcul 94

Figure 2-14 Élargissements successifs de la section d'écoulement 95

Figure 2-15 Configuration de l'écoulement microfluidique en canalisation 97

Figure 2-16 Variation de la fonction C(χ) en fonction du rapport $\chi = \frac{w}{b}$ **[164]** 97

Figure 2-17 Cellule de Hele-Shaw, de largeur W_{HS} et de hauteur b, avec un profil des vitesses de poiseuille dans la direction de l'écoulement, perpendiculaire à la direction de propagation de l'onde acoustique 98

Figure 2-18 Longueur de pénétration thermique 99

Figure 2-19 Simulation du gradient thermique obtenue dans le réseau microfluidique de 200µm de hauteur avec un écoulement à 25µL/min d'un liquide initialement à 298 K (25°C)

et avec une consigne à 310K (37°C) à la base du réseau microfluidique (a: vue d'ensemble du réseau, b: zoom sur l'entrée du réseau) 250701 mailles, ~4h de calcul..... 100

Chapitre 3 Plateforme de détection à ondes de Love avec puces milli et microfluidiques

Figure 3-1 Capteur à ondes de Love. Les doubles IDTs permettent d'éviter les réflexions de Bragg entre les transducteurs 104

Figure 3-2 Simulation de la sensibilité à l'effet de masse maximale de certains matériaux en fonction de la masse volumique et du module transverse de rigidité de la couche guidante, sans prise en compte des pertes de propagation (substrat de quartz, angles d'Euler (0°, 121.5°, 90), IDTs périodicité λ=40µm, couche guidante d'épaisseur h= 4µm) **[168]**..... 106

Figure 3 -3 Schéma du montage en oscillateur d'une ligne à retard 107

Figure 3-4 Puce PDMS PHS1 posée sur un capteur à ondes de Love 111

Figure 3-5 Comparatif des configurations des cellules de mesure (a) : Cellule de mesure métallique avec cavité unique utilisée lors des précédents travaux (b) : Cellule de mesure intégrant les nouvelles puces PHS1 avec cavités séparées 112

Figure 3-6 Vue du moule en aluminium pour la puce PHS1 113

Figure 3-7 Cellule de mesure initiale avec capot en aluminium et puce PDMS PHS1 113

Figure 3-8 : Pertes d'insertion |S21| du capteur Courbe 1 : sans puce PDMS, sous air Courbe 2 : avec puce PHS1 sous air Courbe 3 : avec puce PHS1 sous eau DI ou tampon salin PBS (ou TBS), on observe la dégradation en présence de PBS avec la première puce PDMS PHS1 . 114

Figure 3-9 Vue du moule à embase modifiée pour la réalisation de puces PHS2 115

Figure 3-10 Comparatif des configurations des cellules de mesure ; (a) : cellule de mesure avec puce PDMS PHS1 sans protection des IDTs ; (b) : cellule de mesure avec puce PHS2 intégrant des cavités d'air protégeant les IDTs des perturbations électromagnétiques..... 116

Figure 3-11 Structure des puces PDMS PHS2 avec le second moule 117

Figure 3-12 Puce PDMS PHS2 sur un capteur 117

Figure 3-13 Pertes d'insertion |S21| du capteur : bonne réponse en présence de PBS avec la nouvelle puce PDMS PHS2 (IDTs protégés) Courbe 1 : sans puce PDMS, sous air Courbe 2 : avec puce PHS2 sous air Courbe 3 : avec puce PHS2 sous eau DI ou tampon salin PBS (ou TBS) 118

Figure 3-14 Cellule de mesure pour le protocole hydrostatique avec base en téflon pour le chauffage intégré 119

Figure 3-15 Comparatif des pertes d'insertion |S21| du capteur avec base métallique et base en téflon, avec la puce PHS2, sous air, eau DI et tampon salin. 120

Figure 3-16 Réponse temporelle du capteur avec une Puce PDMS PHS2 et base en téflon . 121

Figure 3-17 Troisième moule pour la réalisation des puces PDMS PHD1 123

Figure 3-18 Puce PHD1, avec Pt100 intégré, sur un capteur et une céramique chauffante ... 123

Figure 3-19 Vue éclatée du quatrième moule en aluminium 126

Figure 3-20 « Wafer » de silicium (3 pouces de diamètre et 1000 µm d'épaisseur) avec motifs microfluidiques en SU8 127

Figure 3-21 a) Motifs des réseaux microfluidiques 129

Figure 3-22 Puce PDMS PHD2 avec réseaux microfluidique 131

Figure 3-23 Insertion des cônes et des tuyaux pour l'acheminement des liquides dans la chambre d'analyse 135

Figure 3-24 Nouvelle cellule de mesure en vue éclatée 136

Figure 3-25 Base aluminium de la cellule de mesures 137

Figure 3-26 Puce PDMS avec Pt100 intégrée 138

Figure 3-27 Céramiques chauffantes 138

Figure 3-28 Réceptacle téflon, en vue iso (a) et vues de dessus (b) conçu pour auto-aligner successivement la céramique chauffante, le capteur et la puce PDMS, respectivement à l'aide des surfaces numérotées 1, 2 et 3. 138

Figure 3-29 Ajusteur de la hauteur de la puce PDMS 139

Chapitre 4 Application à la détection biologique

Figure 4-1 (a) liaison du GPTS à la surface de silice par l'intermédiaire des groupements silanols de la surface et alkoxysilanes du GPTS (b) liaisons des anticorps au GPTS par l'intermédiaire des groupements amines des anticorps et des groupements époxy activés du GPTS (c) vue détaillée de la répartition des sites amines , reliés à l'anticorps via les lysines, en jaune (inspiré de **[]**) 144

Figure 4-2 Dérives des capteurs au cours des utilisations successives 145

Figure 4-3 Représentation d'un anticorps. **[]** 147

Figure 4-4 Protocole de dépôt des anticorps en statique avec la puce PHS2. 148

Figure 4-5 Variations de fréquences obtenues lors de l'immobilisation d'anticorps GAM-γ, en régime statique avec la puce PHS2, après fonctionnalisation de surface par le GPTS 149

Figure 4-6 Comparatif des réponses fréquentielles aux anticorps entre les deux protocoles, statique et dynamique 150

Figure 4-7 Réponses du capteur aux anticorps GAM-γ en régime dynamique avec une puce PDMS PHD2 (avec le motif n° 10) 151

Figure 4-8 Comparaison des différentes cinétiques d'accroche des anticorps Gamγ obtenues à l'aide des cellules PDMS 152

Figure 4-9 Représentation schématique de l'assemblage agent de liaison GPTS-anticorps de reconnaissance-saturant de surface SBBB 154

Figure 4-10 Réponse typique complète en temps réel des trois phases successives nécessaires à la détection des bactéries E. coli avec le protocole statique (puce PDMS PHS2) 156

Figure 4-11 Réponse typique en temps réel lors de l'immobilisation des bactéries E. coli avec le protocole statique (puce PDMS PHS2) 157

Figure 4-12 Variations expérimentales a) de pertes d'insertion b) de fréquence, avec le capteur à ondes de Love muni d'un microcanal de 2000 µm de large et de 50 µm de hauteur pour les solutions aqueuses de PEG, en fonction de $\sqrt{\mu_0 \rho}$ **[156]** 159

Figure 4-13 Variations de fréquences lors de détection de bactéries en régime statique en indirect avec solutions de PEG 6000 et 20000 à 10% et 35000 1% (puce PDMS PHS2) 161

Figure 4-14 Variations de fréquences lors de détection de bactéries en régime statique en indirect avec des solutions de PEG 35000 à 2% (puce PDMS PHS2) 162

Figure 4-15 Variations de fréquences successives dues au greffage des anticorps, à la saturation de la surface greffée et à la détection de bactérie. En régime statique en indirect avec des solutions de PEG 35000 à 2% (puce PDMS PHS2) 162

Figure 4-16 Variations de fréquences lors de détection de bactéries en régime statique en direct avec différentes solutions de PEG 6000, 20000, et 35000 (puce PDMS PHS2) 164

Figure 4-17Variations de fréquences lors de détection de bactéries en régime statique en direct avec des solutions de PEG 35000 à 2% (puce PDMS PHS2) 164

Figure 4-18 Variations de fréquences successives dues au greffage des anticorps, à la saturation de la surface greffée et à la détection de bactéries En régime statique en direct avec des solutions de PEG 35000 à 2% (puce PDMS PHS2) courbe n° 1 : ligne de contrôle, courbe n° 2: ligne de détection 165

Figure 4-19 Étape d'injection des anticorps GAMγ 168

Figure 4-20 Étape de saturation de la surface avec du SBBB 168

Figure 4-21 Étape de détection du complexe bactérien avec ligne de contrôle 168

Figure 4-22 Réponse en régime dynamique en indirect avec puce PHD2 Courbe 1 : contrôle ACM4 Courbe 2 : détection E. Coli 169

Figure 4-23 Détection indirecte de bactéries E. Coli, puce PHD2 169

Figure 4-24 Étape d'injection des anticorps ACM4..... 172

Figure 4-25 Étape de saturation de la surface avec du SBBB..... 172

Figure 4-26 Étape de détection du complexe bactérien avec ligne de contrôle, le tampon salin ainsi que la solution de bactéries contienent du PEG 35000 à 2% en concentration massique 172

Figure 4-27 Courbes d'accroche des anticorps ACM4 à 200µg/mL avec puce PHD1 173

Figure 4-28 Courbes de saturation avec SBBB avec puce PHD1..... 173

Figure 4-29 Courbes de détection des bactéries et du contrôle avec puce PHD1 en direct avec PEG 35000 à 2%, ... 173

Figure 4-30 Courbes complète de la détection des bactéries en direct avec PEG 35000 à 2% avec puce PHD1;courbe n° 1 : ligne de contrôle, courbe n° 2: ligne de détection 174

Figure 4-31 Courbes complète de détections des bactéries E. Coli Détection d'E. Coli à $C_0=10^7$ (courbe n° 1) et 5.10^6 (courbe n° 2) bactéries/mL..... 175

Figure 4-32 Réponses aux anticorps ACM4 (40 µg/m) avec puce PHD2 (débit de 25µL/min) 175

Figure 4-33 Réponses au SBBB avec puce PHD2 (débit de 25µL/min) 176

Figure 4-34 Réponses aux bactéries E. coli à C0 (courbe 2) et C0/2(courbe 1), C0=107 bactéries/mL, avec puce PHD2 (débit de 25µL/min)..... 176

Figure 4-35 Comparatif des temps caractéristiques de détection des bactéries E. Coli à 50% et 90% de la variation de fréquence maximale de saturation à un débit de 25µL/min 177

Table des photos

Chapitre 3 Plateforme de détection à ondes de Love avec puces milli et microfluidiques

Photo 3-1 Puce PDMS PHS2, comportant une sonde PT100 intégrée à la base de l'une des chambres d'analyse 118

Photo 3-2 Vue de dessous de la partie centrale d'une puce PHD1, on distingue les trois cavités et les murs de 250 µm (cavité d'analyse de 1250 µm)..... 124

Photo 3-3 Puce PHD1 sous écoulement, avec un débit de 5mL/min. 124

Photo 3-4 Zoom sur une cavité avec une Pt100: sous écoulement on peut distinguer les murs (entourés) et vérifier l'étanchéité. 124

Photo 3-5 Négatif SU8 d'un double réseau microfluidique PHD2..... 128

Photo 3-6 Zone de haute résolution des motifs microfluidiques d'une puce PDMS PHD2 128

Photo 3-7 Test de validation de l'écoulement à travers le réseau microfluidique. Puce PDMS PHD2, motif n° 7, collée sur lame de verre, circulation d'encre, débit de 10mL/min. 132

Photo 3-8 Écoulement à travers les réseaux de la puce PHD2 (motif n° 11)..... 133

Photo 3-9 Banc de mesures 134

Photo 3-11 Bloc de connexions et couvercle en plexiglass 139

Photo 3-12 Puce microfluidique PHD2 sur capteur SAW dans la cellule de test: on distingue par transparence les différentes parties de la puce et son bon positionnement sur le capteur 139

Chapitre 4 Application à la détection biologique

Photo 4-1 Bactérie E. coli vue au microscope. La bactérie est de forme cylindrique, des flagelles lui permettent de se mouvoir. Le très léger halo visible à la surface de la bactérie est le tapis de pilis (cils jouant un rôle dans les phénomènes de conjugaison et d'adhésions) ... 153

Photo 4-2 Photo du cône après ajout d'un liquide différent. On aperçoit très distinctement la limite entre les deux liquides. Plusieurs minutes après, une très légère diffusion du liquide peut être notée 166

Table des tableaux

Chapitre 1 État de l'art

Tableau 1- 1 Applications facilitées grâce aux biocapteurs 37

Tableau 1-2 Quelques avantages et inconvénients des principaux types de capteurs utilisés pour la biodétection 54

Tableau 1-3 Différents types de capteurs pour la détection d' E. Coli 55

Chapitre 2 Dynamique des fluides

Tableau 2-1 : Variables adimensionnées 76

Tableau 2-2 : Nombres adimensionnés relatifs à la quantité de mouvement du système 77

Tableau 2-3: Nombres adimensionnés relatifs à l'énergie du système 78

Tableau 2-4: Temps caractéristiques de diffusion de la quantité de mouvement (avec les échelles caractéristiques du Tableau 2-1) 78

Chapitre 4 Application à la détection biologique

Tableau 4-1 Configurations des mécanismes de transport et nombres de Péclet pour les puces PDMS : PHD1 et PHD2 178

Introduction

De nos jours, réaliser un système de biodétection nécessite une synergie entre différentes disciplines scientifiques pour une mise en commun des savoirs et des ressources afin d'appréhender toute la complexité des interactions nécessaires à l'élaboration de chaque étape entrant dans la mise au point de plateformes de détection biologique. Durant plusieurs décennies, les biocapteurs étaient limités aux diagnostics médicaux pour la mesure du taux de glucose dans le sang ou de la concentration en oxygène ou azote. Ces dernières années, les applications biocapteurs ont connu une considérable expansion. Cette formidable dynamique est portée par une approche pluridisciplinaire. Toutes les disciplines mises en jeu évoluant de concert, la moindre avancée dans l'une d'entre elles est aussitôt intégrée dans la conception d'un biocapteur. Parmi ces différents champs disciplinaires, on peut citer : la biologie, la chimie, la biochimie, et plus particulièrement la chimie des interactions de surface, l'électrochimie, l'électronique et la microélectronique, les nanotechnologies, la biophysique, l'optique et toutes les techniques optoélectroniques, la science des polymères, la microfluidique, la génétique et l'immunologie. Les domaines d'applications sont principalement la santé (diagnostic médical, analyses biologiques et génétiques), l'industrie pharmaceutique, la défense et la sécurité, l'industrie chimique, la chimie fine, l'environnement et l'agroalimentaire.

Notre projet de recherche s'inscrit dans le cadre du programme BIOALERT de l'ANR PRECODD (ANR-06-ECOT-004) et vise par une approche pluridisciplinaire le développement d'un immunocapteur à ondes de Love ultra-sensible pour la détection rapide de micro-organismes dans l'eau, visant la réalisation d'un dispositif d'alerte.

Les eaux de baignade peuvent être contaminées par des matières fécales de l'homme et de l'animal et contenir une grande variété de microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme. La recherche systématique de tous les germes entéro-pathogènes n'étant pas réalisable en pratique, le dénombrement de « bactéries indicatrices » est classiquement utilisé pour évaluer cette contamination fécale et les risques sanitaires qui y sont associés. Pendant de nombreuses années, les coliformes totaux et fécaux ont été largement utilisés comme indicateurs de contamination fécale. Plus récemment, les bactéries appartenant à l'espèce *Escherichia Coli* (*E. Coli)* ont été plus spécifiquement dénombrées car mieux corrélées à ce

risque sanitaire [1]. La recherche des entérocoques a également été incluse dans la nouvelle directive, concernant l'évaluation des risques microbiologiques, établie par le Parlement Européen (directive 2006/7/CE).

Les *E. coli* appartiennent à la famille des entérobactéries (Enterobacteriaceae, bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatives, oxydase négative et capables de fermenter le glucose et de réduire les nitrates en nitrites). Ils représentent près de 80% de la flore aéro-anaérobie facultative présente dans l'intestin de l'homme. Les *E. coli* sont des coliformes fécaux (capables de fermenter le lactose et de se multiplier à 44°C) qui sont en plus caractérisés par la production d'indole et la présence d'une activité ß-D-glucuronidase. Les *E. coli* peuvent être classés en fonction de leurs antigènes O (antigène somatique) et H (antigène flagellaire), et parfois aussi K (antigène capsulaire). Plus de 200 spécificités antigéniques O et H ont été définies chez cette espèce [2]. *E. coli* est un hôte normal de l'intestin, mais peut devenir pathogène opportuniste sous différentes conditions, en particulier chez des hôtes immunodéprimés. Par ailleurs, certaines souches *d'E. coli* sont des pathogènes obligatoires parmi lesquelles les souches entéro-hémorragiques productrices de toxines (ou EHEC), incluant le sérotype O157/H7 [3].

Les méthodes classiques pour dénombrer les bactéries *E. coli* sont basées sur la culture en milieu liquide (NPP, nombre le plus probable) ou en milieu solide (comptage du nombre de colonies ou UFC, unité formant colonie). Cependant, ces résultats ne sont obtenus qu'après un minimum de 18 à 24 heures d'incubation. Par ailleurs, il a été démontré que les bactéries d'origine fécale, quand elles sont rejetées dans l'environnement, peuvent perdre leur capacité à croître sur des milieux de culture, bien que leur viabilité soit préservée [4]. Le dénombrement de ces bactéries viables non cultivables (ou VBNC : Viable Bacteria Non-Culturable) est cependant important à comptabiliser d'un point de vue sanitaire selon certains auteurs **[4]**.

Depuis une dizaine d'année, des méthodes alternatives ont été mises au point ou sont en cours de développement, pour tenter de s'affranchir de la durée d'incubation et d'inclure la numération des VBNC (bactéries viables mais non cultivables) [5]. Ces mesures incluent des méthodes enzymatiques directes basées sur la recherche de ß-D-glucuronidase et ß-galactosidase [6-7], des méthodes immunologiques [8], des méthodes utilisant l'amplification par PCR (réaction par polymérisation de chaînes) en point final ou en temps réel [9-10-11], ou encore des méthodes d'hybridation in situ (FISH, pour fluorescent in situ hybridization) [12].

D'autres techniques, comme par exemple, le développement de puces à ADN (microarrays) **[13-14]**, ou encore la mesure de l'impédancemétrie directe sont aussi en voie de développement pour la détection des *E. coli.*

Dans le cadre de cette thèse, des systèmes utilisant des capteurs à ondes acoustiques de surface ou SAW (Surface Acoustic Waves), associés à un biorécepteur de type anticorps, sont étudiés en vue de détecter les bactéries dans les eaux de baignade. Le fonctionnement typique d'un tel immunocapteur est le suivant : en présence d'une espèce antigénique cible, immobilisée spécifiquement par le biorécepteur, la propagation de l'onde acoustique est modifiée, ce qui se traduit par une perturbation mesurable d'un signal électrique. L'enjeu de cette approche, en liaison avec la grande sensibilité gravimétrique intrinsèque aux dispositifs SAW, est la capacité à détecter des concentrations de bactéries en dessous du seuil imposé par la législation et ceci en un laps de temps court (une à trois heures), afin de déclencher une alerte précoce. Un tel système, évitant des étapes de manipulation, et notamment de culture cellulaire préalable, autoriserait une détection directe in situ, et un suivi quasi temps réel de la qualité des eaux de baignade.

Afin de réaliser cet objectif, une collaboration interdisciplinaire, regroupant quatre partenaires académiques et un industriel, a été mise en place et s'articule autour de quatre axes complémentaires et intimement liés :

1) Réalisation d'une plateforme de transduction compatible avec des traitements chimiques de surface visant notamment le greffage d'un biorécepteur.

2) Mise au point d'une modification chimique de surface assurant le rôle d'agent de liaison adapté d'une part avec la plateforme de transduction et d'autre part avec les espèces biologiques cibles et de plus favorisant les interactions aux interfaces.

3) Choix des organismes biologiques compatibles avec la surface modifiée et permettant une reconnaissance spécifique des espèces à détecter.

4) Mise au point d'une cellule de mesure et de puces d'analyses basées sur la recherche et l'optimisation de systèmes fluidiques et microfluidiques permettant différentes configurations d'écoulements dans le but d'améliorer et d'optimiser les interactions entre la surface du biocapteur et les espèces cibles.

Les plateformes de transduction associées à une électronique de conditionnement et de traitement ont été élaborées au sein du Laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système (IMS, UMR 5218 CNRS, IPB/ENSEIRB-MATMECA, Université Bordeaux 1) avec le soutien pour la réalisation des dispositifs SAW des moyens de fabrication du Réseau Technologique de Base - RTB LAAS CNRS Toulouse.

Les travaux sur la fonctionnalisation chimique des surfaces des plateformes de transduction ont été réalisés par l'équipe de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM, UMR 5255 CNRS, Université Bordeaux 1).

Les travaux impliquant le matériel biologique ont été réalisés en collaboration étroite avec le Laboratoire d'Immunologie Moléculaire et Parasitologie (LIP, Université Bordeaux 2 Victor Segalen, EA 3677) et le laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité (MFP, Université Bordeaux 2 Victor Segalen, UMR 5234)

Ces travaux de recherche s'intéressent tout particulièrement au quatrième axe : la mise au point d'une cellule de biodétection, et bien sûr les tests des plateformes ainsi réalisées. Notre démarche vise à améliorer sensiblement les capacités de détection tout en réduisant l'échelle du système par une approche purement microfluidique.

Nos travaux explorent ainsi l'objet de recherche à travers quatre chapitres. Dans le chapitre 1, nous exposons un état de l'art des diverses technologies et matériaux les plus répandus nécessaires à la réalisation des différentes structures composant les plateformes de détection biologique. Nous montrons, dans notre cas d'étude, l'intérêt d'associer ondes acoustiques et microfluidique. Le chapitre 2 apporte les éléments théoriques adaptés à notre système pour approcher une compréhension quantitative des phénomènes physiques mis en jeu afin d'obtenir une meilleure connaissance de leur impact sur la réponse de la plateforme de détection à ondes acoustiques, dans le but d'optimiser ensuite de manière efficace l'architecture du système microfluidique. Le chapitre 3 comprend une description des caractéristiques physiques et électriques des dispositifs à ondes acoustiques. Nous présentons la mise au point de circuits microfluidiques comprenant la conception, la fabrication et l'optimisation d'un nouveau type de puces originales en polymère PDMS (PolyDiméthyleSiloxane) calibrées et moulées avec des structures tridimensionnelles adaptées aux structures à ondes acoustiques pour la biodétection en milieu liquide. Puis nous détaillons la conception et la réalisation d'une nouvelle cellule de mesure modulaire adaptée aux nouvelles puces PDMS et permettant une plus grande maîtrise des paramètres physiques, des

protocoles de détection (température, débit, pression). Nous exposons les possibilités nouvelles, notamment de nouveaux protocoles rendus accessibles grâce à cette plateforme originale de détection biologique de microorganismes. Enfin nous présentons et analysons dans le chapitre 4 les résultats expérimentaux obtenus permettant de conclure sur la faisabilité du contrôle du greffage d'anticorps et de la détection de bactéries et tout particulièrement de la bactérie *E. coli*. Nous exposons les gains apportés par notre nouvelle architecture de cellule microfluidique sur les performances de détection. En particulier nous mettons en évidence non seulement une diminution remarquable du temps de détection, mais aussi la possibilité de détecter de manière directe des bactéries entières vivantes. Ainsi, nous démontrons l'impact significatif sur la détection des caractéristiques intrinsèques des fluides et l'effet déterminant de la configuration des tests en régime hydrostatique ou hydrodynamique sur la dynamique de la réponse (amplitude et temporel).

1. État de l’art

1.1. Généralités sur les biocapteurs :

Un dispositif biocapteur repose sur des réactions biochimiques spécifiques mettant en jeu des entités biologiques pour détecter des composés chimiques ou biologiques. L’espèce à détecter est typiquement en solution dans un analyte (composé à analyser), et ceci en présence éventuellement d’autres composés et d’interférents potentiels. Par un procédé de transduction approprié, il est possible d’obtenir une grandeur observable sous la forme d’un signal électrique. Ainsi, le biocapteur peut se décomposer en plusieurs briques élémentaires (Figure 1-1):

1) Un biorécepteur, capable d’interagir spécifiquement avec l’espèce à détecter: anticorps, enzymes isolées, organites, peptides, acides nucléiques, lipides, micro-organismes, tissus cellulaires.

2) Un transducteur, couplé au biorécepteur et choisi de telle sorte que l’interaction du biorécepteur et de l’espèce cible engendre des effets physico-chimiques mesurables, basés sur divers principes (électriques, mécaniques, thermiques, chimiques, magnétiques, optiques, radiatifs).

3) Un système de conditionnement et de traitement de l’information associé à la plateforme de transduction à même d’exploiter les signaux délivrés par le transducteur.

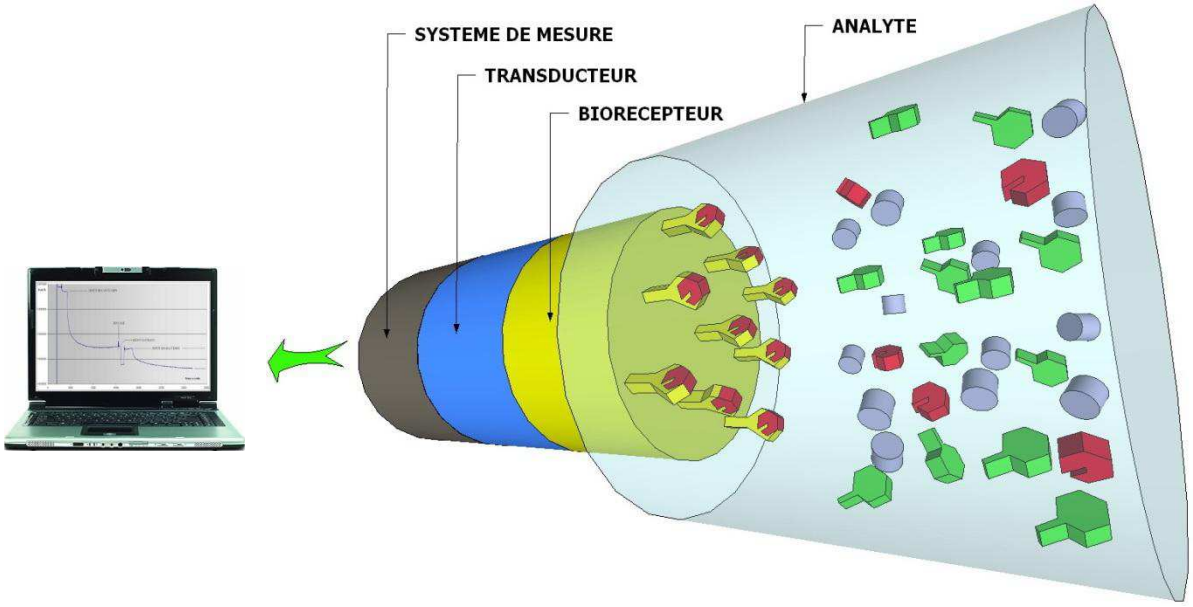


Figure 1-1 Synoptique d’un biocapteur

Les caractéristiques recherchées pour un biocapteur sont :

- ***Sélectivité :*** aptitude du biocapteur à détecter spécifiquement l'espèce cible dans le milieu.
- ***Sensibilité*** : amplitude du signal de sortie pour une variation du signal d'entrée, la sensibilité d'un biocapteur correspond au produit des sensibilités partielles propres à chacune des briques élémentaires décrites précédemment.
- ***Résolution*** : plus petite variation du signal d'entrée mesurable, la résolution d'un biocapteur dépend de sa sensibilité et du bruit de mesure.
- ***Stabilité*** : capacité du capteur à maintenir ses performances sans dérive significative sur la plage de mesure ; nous distinguerons dans notre cas la stabilité à court-terme, inhérente au bruit de mesure intrinsèque au système ou lié à des perturbations extérieures (notamment injection de fluides), de la stabilité, moyen ou long terme (dérive due au vieillissement). La stabilité à court–terme joue un rôle prépondérant sur la résolution du capteur.
- ***Rapidité*** : capacité à délivrer une réponse fiable (détection ou concentration) en un temps réduit compatible avec l'application.
- ***Biocompatibilité*** : capacité à altérer le moins possible les systèmes vivants au contact desquels le capteur est placé.
- ***Robustesse et simplicité d'utilisation :*** en vue d'une commercialisation, ces paramètres sont importants à considérer dès les premières étapes de conception.

Historiquement, le premier biocapteur a été mis au point par Clark en 1953 **[15]** afin de mesurer la concentration en oxygène dissout dans le sang. La première version de ce biocapteur disponible commercialement apparaît en 1973 (Yellow Springs Instrument Company, États-Unis), pour mesurer le taux de glucose par une détection ampérométrique de peroxyde d'hydrogène. Depuis, les capteurs n'ont cessé d'évoluer pour être utilisés aujourd'hui dans des domaines très variés: médecine, biologie, agro-alimentaire, agriculture, industries, défense, microbiologie.

Depuis quelques années les biocapteurs font aussi leur apparition dans des nouveaux domaines, tels que la domotique **[16]**, pour le suivi de la pollution et la sécurité des édifices publics (détection d'éléments toxiques **[17-18]**; gaz, explosif, lutte contre le bioterrorisme **[19-20-21]**), ou la télésurveillance de patients**[22]**.

Tableau 1- 1 Applications facilitées grâce aux biocapteurs

Champs	Applications
Santé	● Détection de marqueurs de maladies comme les cancers ● Suivi de l'administration de médicaments ● Diagnostics de maladies infectieuses ● Analyse de paramètres physiologiques
Environnement	● Détection de substances toxiques (pesticides, métaux lourds…) ● Analyses des sols et de l'eau ● Contrôle des rejets industriels
Agriculture	● Suivi des traitements chimiques et des maladies
Agroalimentaire - Contrôle/Qualité	● Contrôle de la chaîne du froid ● Maturité des fruits (mesure du taux de sucre) ● Dosage de certaines molécules (cholestérol…) ● Détection d'éléments pathogènes (*E. coli*, salmonelles ...) ● Dosage du glucose dans les viandes, pommes de terre, chocolat, produits laitiers ● Poissons : dosage de l'hypoxanthine ● Vin : dosage du lactate
Microbiologie	● Analyses bactériologiques et virales

En biologie et en médecine, la mise au point de systèmes de mesure et de détection fiables et adaptés revêt un caractère central dès lors qu'il s'agit d'expliciter de manière qualitative et quantitative les phénomènes biologiques à petites échelles. Pour sonder les propriétés mécaniques et/ou physico-chimiques d'un système biologique ou d'un microorganisme, il est nécessaire de mettre au point des systèmes biocompatibles adaptés à l'échelle du système étudié. De ce fait, la réalisation de microsystèmes, permettant une compréhension de plus en plus fine des mécanismes liés au vivant, a connu un fort développement ces dernières années. L'avènement des techniques et des procédés de microfabrication a rendu possible l'émergence des BioMEMS (Bio-Micro-Electro-Mechanical-Systems), microsystèmes adaptés à l'étude des structures biologiques (ensembles de cellules, cellules uniques, protéines, virus, neurones, anticorps).

Les plateformes de détection sont basées sur différents principes tant sur le plan de la reconnaissance chimique, que sur le plan de la transduction : optiques, électriques, chimiques,

électrochimiques, électromagnétiques, mécaniques, thermiques, piézoélectriques. L'objectif final est la mise au point de systèmes miniaturisés, portatifs, autonomes et communicants, simples à utiliser: les µTAS (micro Total Analysis System), ou microsystèmes d'analyse total. De plus, il est dorénavant possible de coupler plusieurs de ces modules MEMS pour mettre au point de véritables laboratoires miniaturisés, les laboratoires sur puce ou LOC (Lab. On a Chip). L'étude des systèmes biologiques se faisant généralement en milieu liquide, il est nécessaire d'avoir une compréhension de la physique des fluides à très petites échelles; pour cette raison, depuis quelques décennies, et notamment grâce à des précurseurs comme Whitesides G. (The Whitesides Research Group **[23]**), une nouvelle mécanique des fluides a vu le jour, la microfluidique. Cette science, apparue au début des années quatre-vingts, permet de mieux comprendre l'hydrodynamique complexe des systèmes vivants. Le développement soutenu de la technologie microfluidique a permis la mise au point de nombreuses plateformes de détection. Parmi les procédés de réalisation des BioMEMS, il en est un très important, la lithographie douce ou *softlithography*, élaborée par l'équipe de Whitesides et basée sur différents procédés de moulage du PDMS. La lithographie douce a permis des avancées majeures dans la réalisation de systèmes hautement biocompatibles, capables de mimer de manière efficace les architectures du vivant.

1.2. Le biorécepteur

Comme nous l'avons préalablement mentionné (§ 1.1), le biorécepteur est un élément très important des plateformes de détection, il assure l'interface entre analyte et transducteur. En effet, dans la grande majorité des cas, exception faite de certaines plateformes nanostructurées avec des matériaux du type oxydes métalliques **[24-25-26-27]** capables d'interagir de manière directe avec des gaz réduits, le transducteur ne peut pas interagir directement de manière efficace (sensibilité et spécificité) avec le milieu de détection et doit de fait subir, une fonctionnalisation permettant au transducteur d'acquérir des propriétés de reconnaissance indirectes. Le rôle du biorécepteur, fonctionnalisation physique ou chimique, est ainsi double : son affinité avec les espèces à détecter va d'une part, déterminer la sélectivité du capteur et d'autre part, jouer un rôle d'amplification participant à la sensibilité globale de la plateforme. Le biorécepteur est typiquement constitué de plusieurs sortes de protéines ou de micro-organismes et va interagir avec les analytes selon différents principes biochimiques.

1.2.1. Une grande variété de biorécepteurs

De nombreux types de biorécepteurs sont utilisés, ils peuvent être regroupés par catégories, les principales étant décrites succinctement ici.

1.2.1.1. L'acide désoxyribonucléique (ADN)

Des monobrins d'ADN peuvent être utilisés comme biorécepteurs ou "sondes" sous la forme de brins spécifiques (séquences déterminées) de souches précises de virus ou de bactéries. La reconnaissance se fait par une réaction d'hybridation des séquences complémentaires d'ADN extraites préalablement de l'échantillon de test. La détection de cette hybridation suppose classiquement un phénomène de fluorescence ou de phosphorescence à l'aide d'un marquage préalable de l'ADN cible **[28]**. Si les opérations de préparation des échantillons (extraction d'ADN, marquage) comportent des risques de contamination, ces biorécepteurs sont néanmoins couramment utilisés pour réaliser des biopuces afin d'établir des cartographies génétiques (cf. §1.3.2.1).

1.2.1.2. Anticorps :

Un anticorps est une protéine, utilisée par le système immunitaire pour la détection et la neutralisation d'antigènes spécifiques de certains virus et bactéries. Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines et sont constitués de plusieurs chaînes moléculaires. Ils sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes type B, les plasmocytes, et sont largement utilisés comme agent de capture en biologie, en particulier dans les tests ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Notamment, leur structure générique leur confère des avantages certains en tant que biorécepteur. En effet de nombreuses espèces cibles pourront être adressées, en conservant le même protocole d'immobilisation de l'anticorps récepteur sur le transducteur. Cette détection, fondée sur une réaction immunologique hautement spécifique ne nécessitera pas de préparation lourde de l'échantillon. Le principal inconvénient de ce type de biorécepteur réside sans doute dans la difficulté d'obtention d'un anticorps adapté pour une cible identifiée, induisant un coût élevé. Des études récentes impliquant les aptamères, oligomères parfois appelés « anticorps chimiques », du fait de leur caractère hautement fin et sélectif, visent à contourner ce problème d'approvisionnement dans certains cas **[29]**.

1.2.1.3. Les enzymes :

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques. Ils permettent de minimiser l'énergie d'activation d'une réaction et d'accélérer ainsi les mécanismes métaboliques. Les enzymes utilisés dans les biocapteurs se classent en plusieurs familles, chacune jouant un rôle spécifique dans : les hydrolyses en décomposant certaines molécules (hydrolases), la catalyse des restructurations intramoléculaires (isomérases), le transfert d'un groupe fonctionnel d'une molécule donneuse vers une molécule accepteuse (transférases), la catalyse de la rupture de liaisons chimiques (lyases), la catalyse de création de liaisons chimiques (ligases), la catalyse des réactions d'oxydoréduction par transfert d'ions H^+ et d'électrons (oxydoréductases).

1.2.1.4. Les micro-organismes, tissus biologiques :

Les biorécepteurs à base de micro-organismes, de cellules uniques ou de tissus organiques (pulpe de fruits, membranes cellulaires, bactéries, champignons, microalgues…), exploitent dans la majorité des cas des interactions enzymatiques plus stables (enzymes dans leur milieu naturel) avec les analytes. Ces biorécepteurs à cellules entières font l'objet d'un intérêt certain aujourd'hui, du fait de leur spécificité comme en témoignent des travaux récents pour la détection d'*E. coli* **[30]**, de virus **[31]**.

1.2.2. Immobilisation du biorécepteur sur le transducteur

Pour permettre au transducteur d'interpréter de manière efficace les interactions du biorécepteur avec le milieu d'étude, il est important de bien choisir le type de couplage mis en jeu pour immobiliser le biorécepteur, parmi notamment :

- **L'adsorption de surface :** représentative d'interactions de faible énergie, elle trouve son origine dans les affinités entre la surface du biorécepteur et les éléments biologiques, dues aux forces de Van Der Waals (hydrophobicité, hydrophilicité) et aux forces électrostatiques. Dans ces phénomènes d'adsorption issus d'une interaction physique, le faible niveau d'énergie mis en jeu conduit à un phénomène aisément réversible.

- **La réticulation:** par l'intermédiaire d'un agent réticulant il est possible de construire un réseau de biorécepteurs. Le caractère tridimensionnel de ces structures conditionne fortement l'accessibilité aux sites de reconnaissance. La littérature donne à ce titre un exemple de capteur enzymatique mettant en jeu des interactions des groupements amines de protéines

avec le glutaraldéhyde réticulant dans une matrice de capture en polymère (polyéthylènimine) **[32]**.

- **Liaisons chimiques:** le caractère covalent de cette interaction conduit à une faible portée et reste donc très localisée au niveau de l'interface biorécepteur/analyte. Ce couplage mettant en jeu des niveaux de forte énergie, il est de ce fait irréversible. Ce type de liaison entre la plateforme de transduction et le biorécepteur assure une stabilité de la structure. Dans certains cas de plateformes de transduction, il est nécessaire d'associer une couche intermédiaire dont la fonction principale sera de réaliser l'interaction covalente avec d'une part le biorécepteur et d'autre part le transducteur. Des couches auto assemblées, ou SAM (Self Assembled Monolayer,), sont typiquement utilisées à ce titre. La littérature fournit de nombreux exemples de biocapteurs utilisant des transducteurs en or fonctionnalisés avec des SAM permettant une interaction covalente pour l'immobilisation d'espèces cibles **[33-34]**. Citons *Wang et al* **[35]**, utilisant un QCM (Quartz Cristal Microbalance) fonctionnalisé pour la détection de carbohydrates. Toujours dans les capteurs à ondes acoustiques, dans notre étude, le biorécepteur est constitué d'un complexe SAM-anticorps lié de manière covalente avec la surface du transducteur **[36]**. La difficulté majeure d'un couplage covalent est de ne pas dénaturer l'activité cellulaire et/ou biologique afin de préserver non seulement son activité naturelle, mais aussi garantir l'accessibilité des sites actifs.

- **Couches de Langmuir Blodgett :** les couches de Langmuir-Blodgett sont des SAM obtenues par la technique du même nom déposées sur des surfaces solides. Les forces de Van der Waals sont à l'origine de cette structuration. Se basant sur les travaux de *A. Pockels* **[37]**, *I. Langmuir* et *B. Blodgett* mirent au point la technique de réalisation de ces structures. Ces films minces se forment lorsqu'une molécule polarisée amphophile (hydrophobe et hydrophile à la fois), de concentration inférieure à la concentration micellaire critique, se situe à une interface eau-air, les extrémités hydrophiles s'orientent alors vers l'eau et les extrémités hydrophobes vers l'extérieur. C'est avec l'avènement de la microélectronique dans les années 70 que cette technique s'est généralisée. Elle est en outre utilisée pour réaliser l'adsorption d'espèces biologiques par l'action d'un tensio-actif (adsorption par forces électrostatiques). Un avantage de cette technique est de ne pas dénaturer les activités enzymatiques des cellules.

1.3. Plateformes de détection dédiées à la biologie

Les plateformes de détection dédiées à des applications biologiques sont en grande partie caractérisées par :

- le biorécepteur choisi, dont va dépendre la nature de la reconnaissance,
- le transducteur associé, assurant la conversion en signal électrique du couplage entre le biorécepteur et les espèces à détecter, de manière directe ou indirecte (médiateur chimique).

Nous décrirons ici les principaux types de transducteurs et plateformes étudiés pour des applications de type biocapteur avec des références que nous limiterons, du fait de la richesse de la littérature, aux études pertinentes les plus récentes, notamment par rapport à notre application, et aux techniques commercialisées.

1.3.1. Plateformes électrochimiques

Les plateformes électrochimiques sont basées sur la modification des paramètres électriques d'une solution chimique de référence dans laquelle est réalisée la détection. Selon le type de transducteur, on distingue différents types de plateformes, décrites en suivant.

1.3.1.1. L'ampérométrie

Une détection ampérométrique est basée sur la mesure, à potentiel fixe, de l'évolution du courant traversant une solution chimique entre deux électrodes. La mesure est effectuée entre une électrode de référence et une électrode redox. Le courant électrique traversant le système est alors proportionnel aux concentrations chimiques des constituants de la solution. Le courant ainsi obtenu dépendra de plusieurs éléments: nature, état de surface et température des électrodes, potentiel de travail, nature de la solution. Les capteurs ampérométriques sont principalement utilisés pour détecter des enzymes à la surface d'électrodes métalliques (argent, graphite, platine, or). *Singh et al.* **[38]** ont mis au point un immunocapteur ampérométrique pour la détection de l'osteoproreogerine (OPG), un inhibiteur de l'ostéoporose, à base de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des anticorps anti-OPG interagissant avec un polymère conducteur (les interactions sont confirmées par XPS (X Photoelectronic Spectrometry ou spectrométrie photoélectronique X). De faibles concentrations de bactéries *E. coli* (11 bactéries par mL en 60 secondes) et d'ADN d'*E. coli* (0,01 ng/µL) ont pu être détectées de manière directe à l'aide d'un dispositif à voltamétrie cyclique utilisant une bioélectrode (constituée d'un complexe, formé d'avidine et de polyaniline modifiée, associé à de la biotine) déposée sur une électrode de platine, *Arora et al.* **[39]**. Il est à noter que la polyaniline est un matériau de transduction sur lequel se basent de nombreux biocapteurs, *Dhand et al.* **[40]**. Nous pouvons aussi citer les travaux de *Lin et al.*

[41] pour la mise au point d'un capteur ampérométrique permettant la détection indirecte de bactéries *E. coli* à l'aide de nanoparticules d'or et d'électrodes en carbones (10^2 à 10^7 CFU/mL), ou encore l'équipe *d'Abu-Rabeah et al.* **[42]** pour la mise au point d'un immunocapteur ampérométrique d'*E.coli* à l'aide d'un complexe [Polypyrrole-NH_2-anticorps anti-*E. coli*]. Citons aussi *Geng et al.* **[43]** pour leur biocapteur ampérométrique très sensible utilisant des billes magnétiques fonctionnalisées spécifiques pour la détection d'*E. coli*, ayant une limite de détection de 50 *E. coli*/ml.

1.3.1.2. La potentiométrie

Une détection potentiométrique repose sur la mesure de l'évolution de la différence de potentiel aux bornes de deux électrodes (loi de Nernst) : celle de référence, à potentiel fixe, et celle de travail, à potentiel variable. Cette différence de potentiel est proportionnelle à la concentration des espèces à étudier présentes dans la solution. Les transducteurs potentiométriques se classent en deux catégories, les ISE (Ion Selective Electrode) où l'électrode de travail est recouverte d'une membrane sensible, et les ISFET (Ion Selective Field Effect Transistor). L'ISFET, dont le principe est détaillé par *Jaffrezic et al.* **[44]**, est un transistor à effet de champ (FET), dont la grille est constituée d'une membrane ionique sensible (biorécepteur) et plongée dans une solution d'analyse. Les caractéristiques du transistor, et donc le courant de sortie pour une force électromotrice appliquée entre l'électrode de la solution et l'électrode de référence, est ainsi fonction des interactions entre l'analyte et la membrane sensible. Les capteurs à base d'ISFET permettent ainsi de réaliser, entre autre, la détection de glucose et de pH **[45]**, de créatine **[46],** d'urée **[47]** ou de bactéries **[48-49]**. Ces capteurs ont l'avantage de pouvoir être miniaturisés et mis en réseaux **[50]**, démontrant ainsi la possibilité d'intégration de ce type de dispositif dans un LOC comportant divers capteurs.

1.3.1.3. L'impédancemétrie

Une détection impédancemétrique implique la mesure de la conductance entre deux plaques plongées dans une solution. La mesure est effectuée à l'aide d'un courant alternatif afin d'éviter les perturbations de polarisation des électrodes. Les électrodes sont fonctionnalisées afin d'interagir avec les espèces à détecter. Cette interaction au niveau des électrodes modifie la conductance du système. Ce type de transducteur a permis à l'équipe *d'Escamilla-Gómez et al.* **[51]** de réaliser un immunocapteur pour la détection de bactéries *E. Coli* à l'aide d'un dispositif à base de SAM et d'électrodes en or.

1.3.2. Plateformes optiques

Les capteurs optiques font partie des biocapteurs les plus répandues du fait de leur sélectivité et de leur sensibilité, notamment ceux basés sur la photoluminescence et la SPR (Surface Plasmon Resonance ou Résonance de Plasmons de Surface). Ils ont été mis au point pour permettre des détections rapides de contaminants **[52-53]**, de toxines et drogues **[54]** ou de bactéries **[55]**. Ils se distinguent selon le principe et le procédé de détection utilisés, principalement **[56-57]** l'un de ceux décrits ci-après.

1.3.2.1. La photoluminescence

La photoluminescence (fluorescence, phosphorescence, chimiluminescence) permet de réaliser la détection directe d'une molécule à la suite d'une réaction chimique ou d'un changement de conformation. Elle permet aussi de réaliser une détection indirecte par l'ajout d'un colorant pouvant révéler l'entité à détecter : une molécule fluorescente produite de manière naturelle par certains organismes marins **[58]**, la GFP (Green Fluorescent Protein), est classiquement utilisée. Pour s'affranchir du bruit de fond généré par la fluorescence et localiser le site d'interaction, une technique, le FRET (FluoRescence Energy Transfer) utilise deux fluorochromes portés par deux sites moléculaires. Lors de l'interaction spécifique de ces sites, les fluorochromes se rapprochent suffisamment (quelques nanomètres) et il se produit un transfert d'énergie non radiatif du fluorochrome donneur vers le fluorochrome accepteur, produisant ainsi une modification caractéristique de la fluorescence de chaque fluorochrome. Cette technique possède plusieurs avantages, elle est rapide, spécifique, sensible, permet de localiser le site d'interaction et la concentration des espèces cibles.

Qdots : actuellement les sondes fluorescentes les plus efficaces sont les Quantums dots ou Qdots; ce sont des monocristaux semi-conducteurs, dont la modification du diamètre permet d'adapter la longueur d'onde de fluorescence permettant de générer un spectre très large d'émission à partir d'une seule source lumineuse d'excitation. Les Qdots sont très brillants, ont un spectre d'émission étroit, sont très solubles dans l'eau, et permettent de réaliser en temps réel le suivi de molécule et de réactions chimiques. Ainsi, *Jokerst et al.* **[59]** ont mis au point un biocapteur microfluidique multiplexé utilisant des Qdots fonctionnalisés à l'aide d'anticorps, leur permettant de détecter trois biomarqueurs de cancer, ouvrant ainsi la voie à la détection précoce de cancer **[59]** et à la mise au point de traitements spécifiques et ciblés plus efficaces. Il est aussi possible de détecter des bactéries *E. coli* et des anticorps anti-*E. coli* à l'aide de peptides antimicrobiens, présentant une affinité naturelle avec les

lipopolysaccharides présents sur l'enveloppe de la bactérie, marqués avec des colorants fluorescents **[60]**.

Biopuces : parmi les biocapteurs utilisant la photoluminescence, citons l'un d'entre eux commercialisé et couramment utilisé, la biopuce à ADN, déjà mentionnée. À base de lames en plastique, verre ou silicium, ces biopuces sont équipées de séquences d'ADN réparties de manière matricielle en surface (d'où la terminologie de *micro-array*). Les accroches spécifiques des brins ADN extraits de l'échantillon et équipés d'un marqueur avec les brins sondes sont ainsi observées par fluorescence lors de l'hybridation des séquences **[28]**. L'analyse de cette carte de fluorescence permet le séquençage de brins d'ADN inconnus. Ces puces sont par exemple utilisées dans le diagnostic de maladies génétiques, la reconnaissance d'éléments pathogènes, le typage tumoral en cancérologie, l'analyse environnementale ou la lutte contre le terrorisme. L'avantage de ces puces est de permettre une étude quantitative automatisée, simultanée et systématique, sur des milliers de gènes avec un large spectre de marqueurs, d'où un certain succès commercial pour la réalisation de cartographies génétiques avec un gain de temps remarquable, ce, malgré une relative complexité de mise en œuvre.

1.3.2.2. Les ondes évanescentes

Le phénomène d'évanescence se produit lorsqu'une onde lumineuse est réfléchie à l'interface séparant deux milieux d'indices de réfraction différents (fibre optique, prisme, guide d'onde). Lorsque cette onde lumineuse est réfléchie, une partie infime pénètre l'interface et son amplitude décroît exponentiellement avec l'épaisseur. Confinée au voisinage de l'interface, cette onde évanescente permet de sonder en temps réel les paramètres optiques (fluorescence, adsorption, variation d'indice) et physiques (épaisseur) des substrats, classiquement sur plusieurs dizaines de nanomètres. Les principaux dispositifs utilisés sont les guides d'ondes, les fibres optiques (monomodes, multimodes à gradient d'indice ou à saut d'indice), les dispositifs à SPR, et l'interféromètre de Mach-Zehnder. Les avantages de plateformes optiques sont leur temps de réponse très faible et leur insensibilité aux perturbations électromagnétiques.

SPR : Le principal système, commercialisé, utilisant les ondes évanescentes, utilise la technique SPR, découverte par *Wood R.W.* **[61]**; elle est basée sur l'interaction d'une lumière polarisée avec le gaz d'électrons libres d'une fine couche métallique déposée sur un substrat transparent diélectrique : le plasma d'électrons, en surface de la couche métallique, est excité par les photons de l'onde polarisée et entre en résonnance avec ceux-ci, c'est la

résonnance plasmonique. Cette résonnance génère différents modes électromagnétiques évanescents, de part et d'autre de cette interface. Ces ondes évanescentes sont très sensibles à la variation d'indice du milieu adjacent à la couche métallique, ainsi, en fonctionnalisant cette couche, il est possible de mettre au point des biocapteurs. Ainsi, *Olkhov et Shaw* **[62]** ont mis au point un immunocapteur utilisant un réseau de nanoparticules d'or fixées sur un substrat de verre. Les nanoparticules d'or sont fonctionnalisées avec de l'albumine de sérum de bovin (ASB ou BSA en anglais) ou du fibrogène d'origine humaine (HFG) et permettent la détection d'anticorps par la mesure des variations de l'indice de réfraction en proche surface générées par les interactions antigène-anticorps (ASB-[anti-ASB] et HFG-[anti-HFG]).

Nous pouvons nous référer à un article datant de 2007, passant en revue les principales techniques d'intégration de dispositifs SPR dans des plateformes LOC dédiées à la biodétection **[63]**. Un article plus récent de *Gopinath* **[64]**, traite de la technologie Biacore (une molécule de reconnaissance, le ligand, est fixée sur la surface du capteur et interagit avec une molécule cible, l'analyte). Très répandue dans les applications de bio-détection, cette technologie permet de détecter spécifiquement des espèces non marquées de manière très rapide et très sensible. Le Biacore est largement utilisé pour la détection et le suivi de cinétiques d'interactions (associations-dissociations) entre biomolécules. Son principe est exposé sur la Figure 1-2**[64].**

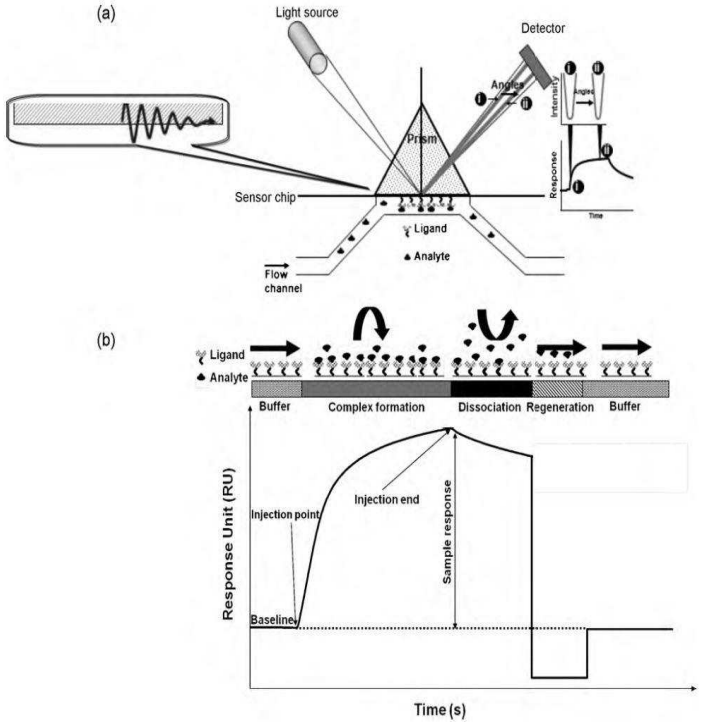


Figure 1-2 Principe du Biacore basé sur la variation d'angle du pic d'absorption (a) proportionnel à l'indice de réfraction du milieu, lui-même proportionnel à la concentration des analytes associés aux ligands (b) ***[64]***

Les guides d'ondes planes : équipés d'une couche de fonctionnalisation, les guides d'ondes planes peuvent être utilisés pour la détection de microorganismes. C'est ainsi que *Zourob et al.* **[65-66-67]** ont mis au point des biocapteurs grâce à l'élaboration de nouvelles couches guidantes métalliques, les MCLW (Metal Clad Leaky Waveguides), permettant d'atteindre des épaisseurs de pénétration du champ évanescent dans le milieu étudié de l'ordre de 1,5 µm, capables de détecter des pesticides, et surtout des bactéries, organismes de grande taille. D'autre chercheurs, tels que *Neuschäfer et al.* **[68-69]**, *Mathias et al.* **[70]**, ou encore *Beuvink et al.***[71]**, ont développé des résonateurs évanescents, pour le dépistage de certaines maladies, en modifiant la structure de la surface en gravant des sillons de quelques dizaines de nanomètres et en recouvrant ensuite cette surface avec un matériau à indice de réfraction élevé (TiO_2,Ta_2O_5). Les biocapteurs à base de guide d'onde permettent également de réaliser des immunocapteurs pour l'étude d'activités enzymatiques **[72]**.

Interféromètres : Les interféromètres sont des dispositifs très sensibles basés également sur des guides d'ondes optiques. Une configuration typique est l'interféromètre de Mach-Zehnder, constitué d'un guide d'onde principal, se séparant en deux sections via un coupleur en forme de Y, la première section jouant le rôle de référence, la seconde section étant la partie sensible du capteur. Un second coupleur permet la recombinaison des deux ondes cohérentes générant un phénomène d'interférence. Lors d'une interaction spécifique, il apparaît une variation d'indice Δn du milieu dans le bras sensible, générant un changement de phase $\Delta\phi$. La sensibilité est alors définie par le rapport $\Delta\phi/\Delta n$. On peut ainsi réaliser des immunocapteurs **[73-74]** ou détecter des protéines **[75]**.

1.3.2.3. Capteurs à ellipsométrie

La technique de l'ellipsométrie est une méthode de mesure indirecte en temps réel, elle a été mise au point par P.K.L. Drude en 1887. Elle est basée sur l'analyse de la variation d'indice d'une onde lumineuse polarisée (laser) après que celle-ci ait subi une réflexion sur un substrat de couches nanométriques, préalablement déposées et fonctionnalisées pour la détection d'analytes. C'est lors de l'interaction de l'analyte avec la couche sensible que l'état de polarisation de l'onde réfléchie est modifié et mesuré. Des biocapteurs basés sur des dispositifs à ellipsométrie permettent ainsi la détection de virus, tels que celui de la grippe aviaire H5N1 **[76]** ou de l'hépatite du canard **[77]**, ou d'autres types de bio-organismes **[78]**. L'ellipsométrie est une technique aussi utilisée pour la mesure de réactions antigènes-anticorps et présente des avantages de rapidité et de simplicité contrairement aux tests de type

ELISA, plus longs et nécessitant des étapes de marquage et de PCR (Polymerase Chain Reaction, ou amplification en chaîne par polymérase).

1.3.2.4. Plateformes térahertz

Dans le prolongement des plateformes « optiques », les ondes térahertz font l'objet d'avancées récentes dans le domaine des biocapteurs, ainsi la mise au point de BioMEMS dédiés à l'analyse des réactions enzymatiques **[79]**. Elles présentent notamment comme intérêt un fort pouvoir pénétrant, contrairement aux ondes évanescentes en général. Ainsi elles permettent potentiellement de voir à travers de nombreux matériaux non conducteurs. Elles sont peu énergétiques et non-ionisantes (1 THz, soit sensiblement moins que l'énergie d'activation thermique à température ambiante) ce qui les rend a priori peu nocives. La forte absorption de l'eau à ces hautes fréquences permet et caractérise une interaction importante avec les tissus biologiques. Les ondes térahertz mettent en effet en vibration/rotation les molécules d'eau polaires et excitent les liaisons de faible énergie intermoléculaires (liaisons hydrogène dans l'eau et les protéines). Ce mécanisme permet de mettre au point des systèmes de détection biologique basés sur la spectroscopie térahertz avec des axes d'application liés notamment à l'étude de l'hydratation et conformation de protéines, l'hybridation de l'ADN, la détection de certaines cellules cancéreuses (anormalement riches en eau). Pour plus d'informations sur la mise au point de biocapteurs térahertz, le lecteur peut se référer à l'étude détaillée réalisée par *Nagel et al.* **[80]**.

1.3.3. Plateformes à ondes acoustiques

La piézoélectricité, propriété de conversion électromécanique, est le principe de base du fonctionnement des capteurs à ondes acoustiques, elle a été découverte par P. et P.-J Curie. en 1880 **[81]**. Le comportement des ondes acoustiques de surface a ensuite été étudié par Lord Rayleigh en 1885 **[82]**. Par la suite A.E.H. Love en 1911 **[83]** étudie pour la première fois le comportement d'ondes acoustiques de surface de cisaillement ayant un mouvement perpendiculaire au plan sagittal, ce qui donnera son nom à une onde de ce type. Cette complémentarité entre piézoélectricité et ondes acoustiques permet de développer une large gamme de capteurs à ondes acoustiques. Nous en décrivons ici brièvement deux catégories : les capteurs à ondes de volume et ceux à ondes de surface, et plus spécifiquement à ondes de Love, qui seront retenus dans le cadre de nos travaux.

1.3.3.1. Capteurs à ondes de volume ou BAW (Bulk Acoustic Wave)

Les biocapteurs à ondes de volume, appelés communément microbalance à quartz (QCM, pour Quartz Crystal Microbalance), sont typiquement constitués de deux électrodes en contact avec un cristal de quartz (voir Figure 1-3), l'une recouverte d'un biorécepteur. Lors de l'absorption ou de la fixation d'un analyte, on observe une variation de la fréquence de résonnance due notamment à une augmentation de la masse à la surface des électrodes, principe qui autorise une grande diversité d'applications. Ce système est largement commercialisé, aussi de nombreuses couches bioréceptrices ont été étudiées pour détecter divers composés chimiques ou biologiques. Plusieurs équipes utilisent des QCM pour la réalisation d'immunocapteurs **[84-85-86]**, la conformation de brins d'ADN, par *Gizeli et al.* **[87]**, la détection d'*E. Coli* (*Tableau 1-3*) ou encore la détection d'ADN, par l'équipe de *Perrot et al.* **[88-89-90]**, ayant même réussi à mettre au point un capteur à ADN avec une surface de détection très réduite de 0,2 mm^2 **[91]**. Citons également le capteur QCM réalisé par *Saitakis et al.* **[92]** pour l'étude des liaisons entre les récepteurs membranaires d'une cellule biologique entière et un ligand immobilisé à la surface du QCM. Bénéficiant d'une technologie relativement simple (dispositif et électrode de conditionnement – résonateur à quelques mégahertz), la microbalance à quartz atteint ses limites dans certaines applications nécessitant un seuil de détection particulièrement bas. L'énergie de l'onde est en effet ici répartie sur toute l'épaisseur du disque, alors que seule la partie proche de l'interface est susceptible d'être modifiée par l'interaction.

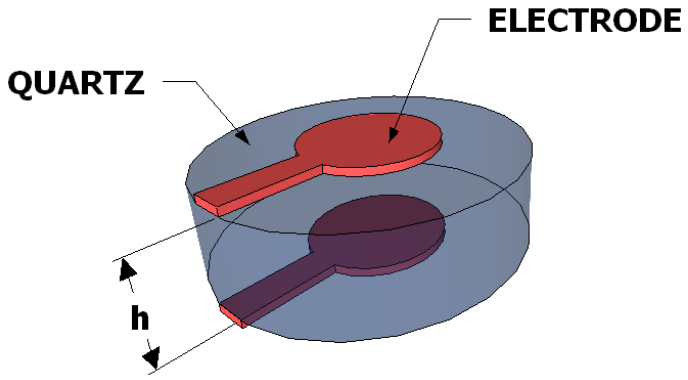


Figure 1-3 Capteur à ondes BAW

1.3.3.2. Capteurs à ondes de surface ou SAW

Les capteurs SAW planaires sont aussi utilisés dans de nombreux champs d'applications depuis des décennies, particulièrement depuis les travaux de *Wohltjen et al.* **[93-94]**, le

premier à avoir démontré la possibilité de réaliser un capteur SAW (ondes de Rayleigh) sous la forme d'une ligne à retard à électrodes interdigitées (principe général décrit Figure 1-5 et texte correspondant) couplée à un amplificateur électronique, notamment, pour la détection de composés chimiques volatils, la possibilité d'utiliser des capteurs SAW en milieu liquide **[95]**, le suivi des propriétés viscoélastiques de matériaux **[96]**, ou encore l'analyse chimique **[97]**. *White* **[98]**, en se basant sur les travaux de *Wohltjen*, a démontré leur intérêt certain et croissant pour les applications physiques, chimiques ou biochimiques en général.

Les ondes de Rayleigh ont un fort pouvoir de couplage avec les matériaux (solides ou liquides) en contact avec la surface de ce même substrat, du fait de leur polarisation elliptique dans le plan sagittal et de leur confinement en surface (profondeur de pénétration de l'ordre de la longueur d'onde λ). Ce couplage affecte fortement l'amplitude, la vitesse et la fréquence de l'onde, permettant ainsi aux capteurs SAW d'être utilisés pour des mesures gravimétriques et le sondage des propriétés mécaniques de divers matériaux. Différents substrats, en fonction des applications visées et notamment de la sensibilité nécessaire, sont utilisés pour supporter ces ondes, principalement le quartz (SiO_2), mais également : le tantalate de lithium ($LiTaO_3$), l'arséniure de gallium (GaAs), le carbure de silicium (SiC), le langasite (LGS), l'oxyde zinc (ZnO), le nitrure d'aluminium (AlN), l'alliage plomb-zirconium-titane (PZT), le fluorure de polyvinyle (PVF). Le choix d'un angle de coupe cristallographique et une direction privilégiée de l'onde dans le matériau, permettent d'optimiser le dispositif SAW en adoptant une polarisation de l'onde spécifique aux applications choisies et par rapport aux effets de température. Du fait d'une technologie de réalisation collective et éprouvée, de leur haute résistance, et de leurs caractéristiques électriques à très grand coefficient de qualité, les dispositifs SAW sont largement répandus dans de nombreuses applications de la microélectronique et notamment en télécommunications **[99]**. Ces avantages, associés à une grande sensibilité aux effets de surface, une grande polyvalence, et une bonne résistance mécanique ou chimique du substrat, ont permis d'explorer un spectre très large d'applications de détection: pression **[100]**, chimie **[101]**, vapeur **[102]**, humidité **[103]**, température **[104]**, gravimétrie **[105]**, rhéologie et sismologie **[106]**.

En ce qui concerne les biocapteurs et sous réserve du choix d'un type d'onde adapté (exposé en suivant), les dispositifs SAW permettent de réaliser de nombreuses applications **[107]**. Ainsi, suite aux travaux pionniers comme ceux de *Wohltjen et Dessy* **[108-109-110]** sur la mise au point de capteurs à gaz basés sur des dispositifs SAW recouverts de couches sensibles, des équipes ont tenté d'appliquer ces méthodes pour la détection en milieu liquide mais avec moins de succès **[111-112-113]**. En effet, en milieu liquide, le déplacement des

particules étant normal à la surface du capteur, les ondes de compression du liquide causent des atténuations et des pertes d'insertions importantes. Pour s'affranchir de ce problème d'amortissements des ondes acoustiques en milieu liquide, les ondes acoustiques doivent être polarisées horizontalement ou avoir une vitesse de phase inférieur à la vitesse du son dans le liquide. Ainsi, les premiers capteurs fonctionnels en milieu liquide sont apparus en 1987 **[114,115]**, par la suite, ce type de plateforme à permit la détection de protéines, de sucre, d'ADN, de virus, de bactéries et de cellule **[116]**. De nombreuses possibilités d'amélioration font aujourd'hui l'objet d'investigations, en particulier pour favoriser l'immobilisation des espèces en surface ou augmenter leur influence sur la réponse du transducteur. Par exemple, *Länge et Rapp* **[117-118]** ont fonctionnalisé la surface d'un capteur SAW avec une couche d'hydrogel couplée à des ligands biologiques afin de réaliser un biocapteur pouvant être spécifique. De même, *Saitakis et al.* **[92]** ont mis au point un capteur SAW capable de détecter des cellules biologiques de manière spécifique à l'aide d'une couche de fonctionnalisation constituée d'un complexe [protéine G-anticorps HLA] se liant aux récepteurs HLA des cellules biologiques (Figure 1-4).

Pour la détection d'*E. Coli*, plusieurs équipes ont mis au point des plateformes de détection spécifique SAW basées sur l'utilisation d'anticorps de reconnaissance (*Pereira da Cunha et al.* **[119-120]**, *Dejous et al* **[121-122-123]**, *Gizeli et al.* **[124-92]**).

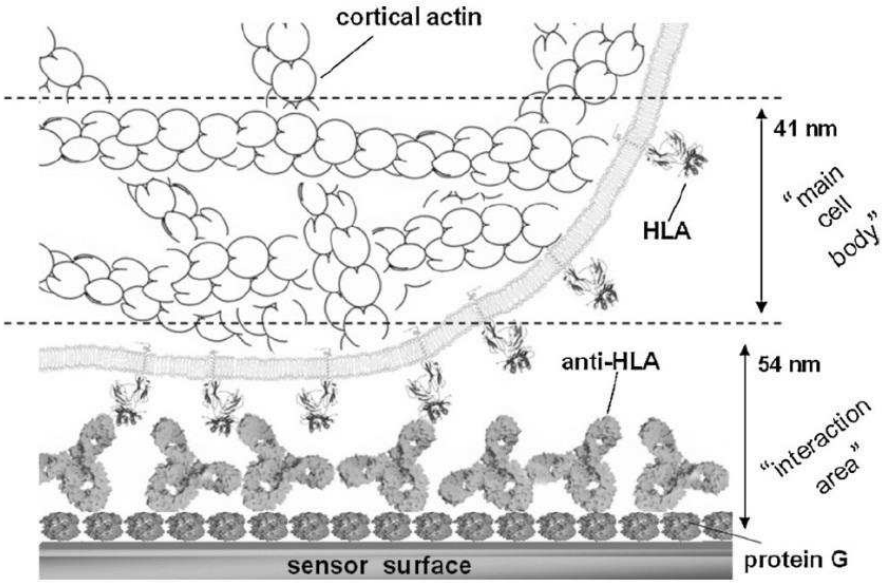


Figure 1-4 Immonocapteur SAW réalisé par Saitakis et al. (2010) ***[92]***

Dans une grande majorité de cas, les applications en milieu liquide reposent sur l'utilisation d'ondes TH (Transverses Horizontales) guidées, communément appelées « guided SH-

SAW » (Shear-Horizontal SAW), ou ondes de Love, compte tenu de leur grande sensibilité gravimétrique de surface et de leur capacité à fonctionner avec des fluides adjacents grâce à la polarisation transverse horizontale. C'est ce type de capteur qui est utilisé pour ces travaux. Comme pour les capteurs planaires SAW, de manière générale, la structure est classiquement constituée (Figure *1-5*) de deux transducteurs interdigités déposés en fine couche métallique à la surface d'un cristal piézoélectrique. Un transducteur d'entrée, convertissant un signal électrique en onde acoustique, et un transducteur de sortie, convertissant l'onde acoustique en signal électrique sinusoïdal, forment ainsi une ligne à retard. L'onde générée avec ce type de dispositif, en l'occurrence une onde de polarisation TH grâce à une direction de propagation parallèle à un axe cristallographique X d'ordre 2 du substrat, a une fréquence de synchronisme spécifique et met un temps déterminé pour parcourir le chemin acoustique, soit la distance séparant les deux transducteurs. Le dépôt contrôlé d'une "couche guidante" en surface permet de piéger l'énergie acoustique sur une faible épaisseur (quelques µm) au voisinage de l'interface **[125]**, donnant ainsi naissance à une onde de Love. Le biorécepteur consiste en une couche sensible greffée sur le chemin de propagation entre les deux transducteurs. L'immobilisation des analytes induit notamment une augmentation de masse de la couche sensible, entraînant une décroissance de la vitesse de propagation et de la fréquence de résonnance (ou de synchronisme) de l'onde acoustique. Cet effet de masse est accompagné souvent d'une modification de certains paramètres, notamment viscoélastiques dont l'effet se superpose. Le capteur SAW de la Figure 1-5, mis au point lors de travaux précédents **[126]**, comporte deux lignes à retard, la seconde pouvant être utilisée comme référence ou seconde voie de mesure, pour redondance ou complémentarité du signal.

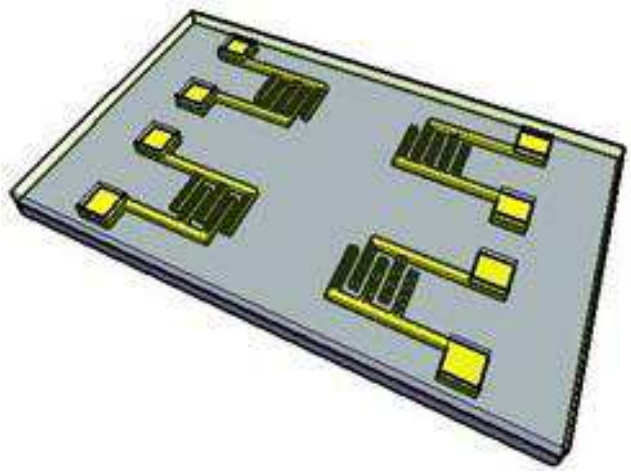


Figure 1-5 Capteur SAW à ondes de Love constitué de deux lignes à retard.

1.3.4. Tableaux récapitulatifs des principaux types de transduction et leurs applications pour la biodétection d'*E. Coli*

Nous avons synthétisé (Tableau 1-2) les principaux types de biocapteurs, selon leurs modes de fonctionnement et de transduction ainsi que les avantages et inconvénients généralement rencontrés avec les principaux dispositifs dédiés à la biodétection sont exposés au Tableau 1-3. Le tableau suivant présente les différents types de transduction, en mentionnant des références représentatives d'études de capteurs immunologiques pour la détection d' *E. coli*, qui constituent notre objectif principal.

Une explication s'impose au regard des données présentées dans le Tableau 1-3. Alors que les capteurs SAW, comme les capteurs optiques, ont une sensibilité intrinsèque élevée de quelques ppb (part per billion ou partie par milliard) et supérieure à celle des capteurs électrochimiques, ils s'avèrent être les moins sensibles pour les *E. coli*. En effet, les bactéries *E. coli* étant majoritairement constituées d'eau, ont la même densité que le milieu de détection. C'est pourquoi malgré leur poids et leur taille, elles restent en suspension dans l'eau et n'impactent pas suffisamment le détecteur sensible à l'effet gravimétrique.

Par ailleurs, notre objectif vise la détection de bactéries entières vivantes ou bactéries viables, alors qu'un certain nombre des protocoles (Tableau 1-2) nécessitent des étapes d'amplification préalables (mise en culture, PCR), ou de préparation des échantillons dénaturant ou susceptibles de dénaturer les micro-organismes (extraction et marquage d'ADN, bactéries modifiées, fragmentées). Ces étapes peuvent amener à intégrer dans la quantification des bactéries lysées ou à omettre des bactéries viables non cultivables. De plus les seuils de détection annoncés correspondent souvent à des concentrations initiales estimées, à partir de modèles de cinétiques de croissance par exemple et ainsi ne reflètent pas toujours la sensibilité intrinsèque du capteur.

Tableau 1-2 Quelques avantages et inconvénients des principaux types de capteurs utilisés pour la biodétection

Type de capteur		Avantages	Inconvénients
Électrochimiques Biocapteurs métaboliques	Ampérométrique, Potentiométrique, Conductimétrique, Impédimétrique	Faible coût et encombrement, simple à utiliser, avec possibilité d'autorégéneration de la couche sensible du capteur pour une réutilisation	Parfois peu reproductible et fragile, avec des seuils de sensibilité bas et une faible sélectivité
Optique	Absorption lumineuse	Gamme spectrale étendue et sensibilité élevée	Sensible à la température (dérive thermique), temps de réponse et bruit de fond important, avec une réponse non linéaire et un vieillissement des dispositifs important
	Biopuces à ADN	Grande sensibilité (pg/ml), parallélisable	Pas de suivi en temps réel et préparation (extraction, marquage) de l'échantillon
	SPR- fibres optiques	Miniturisable, à faible coût (SPR à base de fibre optique), résistant aux radiations et à la chaleur (fibres en silice), insensible aux perturbations électromagnétiques. Grande sensibilité aux interactions de surface avec un spectre large d'analytes, ne nécessitant aucun marquage moléculaire, suivi temps réel	Prix élevé en général, avec une extraction de la mesure complexe (influence de la diffusion des plasmons), sensible à la lumière naturelle et à la température. Avec des interactions non spécifiques dans certains cas même après fonctionnalisation
Acoustique	QCM	Utilisable dans une large gamme spectrale (qq kHz à 10 MHz, voire GHz avec harmoniques) avec un facteur de qualité élevé. Bonne tenue en puissance, stabilité thermique. Faible encombrement et consommation réduite. Sensibilité dépendante de l'épaisseur du substrat piézoélectrique.	Dérive thermique à compenser (3000 ppm/1000°C), Augmentation des pertes avec la miniaturisation et coût élevé.
	SAW	Suivi en temps réel. Simple avec signal fréquentiel de sortie. Confinement efficace de l'énergie acoustique assurant une grande sensibilité aux interactions de surface. Faible encombrement et adaptable sur des pièces mobiles. et intégrable Possibilité d'utilisation en passif : faible consommation (alimenté par signaux RF), interrogeable à distance et utilisable en milieux extrêmes (pression, température, radiation).	Sensible aux perturbations électriques et mécaniques avec une faible tenue en puissance. Limité en fréquence (forte dépendance au process de réalisation des IDTs

Tableau 1-3 Différents types de capteurs pour la détection d' E. Coli

Transducteur		Fonctionnalisation	Seuil/plage de détection	Temps de réponse	Équipe	Réf.	Année
Électrochimique		Hybridation ARN-DN	2000 cfu/ml	5h	Pöhlmann C. et al, Germany	2010	[127]
Ampérométrique		Bicouche polypyrrole-N2-anti-E. Coli antibody	10 cfu/ml	/	Abu-Rabeah K. et al., Israel	2009	[128]
		Nanoparticules Fe3O4 + nanotubes de carbone	20 à 10^5 cfu/ml	4h	Chang Y. et al.,Chine	2009	[129]
		Hybridation ADN	0,01 cfu/ml	/	Loaiza O.A. et al., Espagne	2009	[130]
Potentiométrique		Aptamères + nanotubes de carbone	6 - 10^4 cfu/ml	Qqs min	Zeleda-Guillén G.A. et al., Espagne	2010	[131]
Impédimetrique		SAM	10cfu/ml	1h	Escamilla-Gomez V. et al., Espagne	2009	[132]
Conductimétrique		Anticorps biotinylé anti-E.Coli	500 cfu/ml	/	Jaffrezic-Renault N. et al., France	2008	[133]
Optique	fluorescence	Hydrogel (polyacrylamide)	10^3-10^5 cfu/ml	Qqs min	Massad-Ivanir N. et al., Israel	2010	[134]
	bioluminescence	Billes de verre+anticorps	30-3,2.10^5 cfu/ml	20 min	Guan X. et al., Chine	2010	[135]
	Qdots	Qdots+anticorps anti-IgG	10 cfu/ml	/	Sanvicens N. et al., Espagne	2011	[136]
		Qdots+streptavidin	10^2-10^4 cfu/ml	30 min	Liu J. et al., Chine	2010	[137]
	SPR	Couche d'or+SAM (acid-thiol)+anticorps	10^4 cfu/ml	/	Baccar H. et al., Tunisie	2010	[138]
		BSA+bactériophage T4+SAM + couche d'or	7.10^2-710^8 cfu/ml	/	Arya S.K. et al., Canada	2011	[139]
		Couche d'or+anticorps	10^2-10^3 cfu/ml	30 min	Waswa J. et al., Etats-Unis	2007	[140]
Acoustique	QCM	Thiols+nanoparticules d'or+brin d'ADN	2.10^3 cfu/ml	/	Wang L. et al., Chine	2008	[141]
		Thiols +brin d'ADN spécifique	3.10^2-3.10^3 cfu/ml	/	Mao X. et al., Etats-Unis	2006	[142]
		SAM (mannose) + lectin Con A	7,510^2-7,5.10^7 cfu/ml	/	Shen Z. et al., Etats-Unis	2007	[143]
		Monocouche MHDA + Anticorps	10^3-10^8 cfu/ml	50 min	Su X.-L. et al., Etats-Unis	2004	[144]
	SAW	SAM (GPTS) + Anticorps	10^6 cfu/ml	3h	Dejous C. et al., France	2008	**[123]**
		Biotine+neutravidine	10^9 cfu/ml	/	Pereira da Cunha M. et al., Etats-Unis	2006	**[119]**

1.4. De l'intérêt de l'approche microfluidique

1.4.1. L'avènement de la microfluidique

La miniaturisation des systèmes à des échelles micrométriques a permis l'émergence des MEMS dans les années 1980, et par la suite, la diversification des MEMS a donné naissance aux systèmes fluidiques ayant des échelles de taille allant du micromètre à quelques centaines de micromètres dans les années 1990. L'avènement de ces systèmes, notamment avec la création de la "softlithographie" basée sur l'utilisation du PDMS, introduite par le groupe pionnier de *Whitesides, The Georges Whitesides Research Group* **[145-146]**, a permis l'étude de la dynamique des fluides dans des conditions nouvelles, ce qui a naturellement abouti à une discipline nouvelle : la microfluidique, l'étude de la dynamique des fluides à l'échelle du micromètre. A cette échelle, les écoulements adoptent des comportements très différents de ceux usuellement étudiés à des échelles plus grandes. Les effets inertiels deviennent très négligeables devant les effets de viscosité, et il est nécessaire, de fait, de mettre au point de nouvelles techniques d'acheminement et de mélange des liquides. La microfluidique (utilisée pour la biodétection en biologie), permet notamment l'étude d'échantillons de sang, de suspensions de bactéries, de protéines ou d'anticorps, et ce, dans divers sortes de matrices liquides, à partir de faibles volumes.

La plupart des liquides étudiés sont complexes. Aussi, la microfluidique permet de réaliser une grande variété de mesures telles que les mesures des coefficients de diffusion moléculaires **[147-148]**, de la viscosité **[149]**, la pH-métrie **[150-151]**, des coefficients de réactions chimiques ou encore la cinétique de réactions enzymatiques. La microfluidique trouve aussi des applications dans les systèmes d'électrophorèse capillaire, de cytométrie de flux, de PCR, de focalisation isoélectrique, d'injection de protéines pour analyse par spectrométrie de masse, de croissance de cristaux pour analyse par diffraction X, de manipulation de cellules, de séparation de cellules, de mise en forme de cellules, de structuration de gradient chimique, de diagnostics de santé et des biocapteurs.

De nos jours, les dispositifs PDMS offrent une nouvelle approche dans beaucoup de domaines, tel que la biologie, la médecine, la chimie, la cristallographie ou l'optique **[152-153-154-155]**. Les laboratoires d'analyses médicales et les industriels de la chimie sont intéressés par ces technologies prometteuses pour la mise au point de véritables laboratoires sur puce, où toutes les analyses et réactions chimiques peuvent être réalisées dans quelques cm^3, diminuant les coûts de manière prodigieuse. Pour la plupart de ces dispositifs, le PDMS

est le matériau de base, son utilisation, au moins au stade de prototypage, est largement répandue pour des applications en biotechnologies. Il possède en effet plusieurs avantages : il est facile à utiliser pour réaliser des motifs variés, il est non toxique, biocompatible et disponible facilement et en grande quantité dans le commerce.

1.4.2. Principe de la Microfabrication : "Softlithographie-PDMS"

La technique de lithographie douce ou "softlithographie" permettant de réaliser des dispositifs en polymère PDMS a révolutionné le monde de la microfluidique et les applications qui en découlent dans de nombreux domaines. Il s'agit d'une technique non photolithographique basée sur l'auto-assemblage et la réplication par moulage pour la réalisation de dispositifs micrométriques et nanométriques. Elle offre une méthode pratique, peu polluante, efficace et à faible coût pour la réalisation de micro et nanostructures. Pour la réalisation d'un dispositif PDMS, il est au préalable nécessaire de mettre au point le moule qui servira à contenir et modeler le PDMS pour lui conférer la structure désirée.

Plusieurs types de moules existent. Dans tous les cas, il s'agit de créer le négatif des géométries à réaliser. Cela peut être fait classiquement, soit par micro-usinage chimique ou mécanique d'un substrat, soit par dépôt de résine photosensible (typiquement SU8 liquide ou film laminé) suivi d'une insolation à travers un masque (impression laser sur film transparent, découpe laser sur film métallique, …) et développement.

Après la réalisation du moule, le PDMS liquide est préparé et dégazé pour être coulé dans, ou sur le moule. Après réticulation par chauffage, le dispositif PDMS peut être démoulé.

Pour des informations plus détaillées concernant toutes les étapes et les processus de fabrication des dispositifs en PDMS, ainsi que les propriétés physico-chimiques du PDMS, le lecteur peut se référer aux travaux de thèse de *V. Raimbault* **[156]**, eux-mêmes issus des technologies classiques de mise en œuvre de ce polymère.

Ces techniques permettent la mise au point des LOC, par l'association de différents blocs dédiés à une ou plusieurs fonctions, et la réalisation d'une plateforme de détection autonome, par exemple :

- diagnostics médicaux pour la détection rapide de cholestérol à partir d'un capteur électrochimique avec système intégré d'injection microfluidique et nanotubes de carbones fonctionnalisés **[157]**,
- modules microfluidiques calorimétriques à haute sensibilité pour des applications de détection biologique ou de caractérisation chimique, autonomes et adaptatifs **[158]**,

- modules microfluidiques intégrant des systèmes autonomes et découplés d'acheminement, de traitement et d'analyse d'associations de biomolécules **[159]**,
- plateformes de détection tridimensionnelles pour une isolation et une détection rapide de cellules cancéreuses à l'aide de microbilles magnétiques fonctionnalisées **[160]**.

1.4.3. Association systèmes microfluidiques - plateformes acoustiques

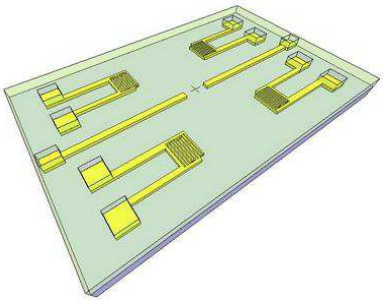
Les interactions importantes au niveau du biocapteur sont localisées à sa surface sur une épaisseur très faible de liquide; aussi, la conception et la réalisation de systèmes microfluidiques sont des éléments primordiaux pour améliorer les interactions de surface entre la couche bioréceptrice et les espèces biologiques à détecter. La manière dont vont interagir les espèces biologiques et le capteur, représente l'aspect le plus important de nos travaux visant à améliorer la sensibilité du capteur et le temps de réponse de la plateforme globale.

Dans ce contexte, les capteurs SAW sont des candidats désignés pour être couplés avec des systèmes microfluidiques, pour à terme mettre au point des systèmes de détection intégrés. Des développements récents avec de tels capteurs ont permis l'étude des caractéristiques physiques de très petits volumes de liquide (μL) grâce à la mise au point dès 2006 d'un microrhéomètre permettant de sonder en temps réel le comportement à haute fréquence de plusieurs types de liquides, ceci dans un spectre large de viscosité et des taux de cisaillement très élevés (sollicitations à 118 MHz) **[161]**. Pour des applications en biodétection, leur surface peut être fonctionnalisée, pouvant ainsi potentiellement détecter de manière spécifique et avec une grande sensibilité, un grand nombre de molécules ou d'entités biologiques.

Nous avons donc tout naturellement choisi d'associer des dispositifs PDMS aux capteurs SAW à ondes de Love pour la réalisation d'une plateforme de biodétection. À la différence des dispositifs PDMS généralement utilisés et associés par collage au dispositif de détection, nous avons opté pour la mise au point de dispositifs PDMS calibrés maintenus par pression sur le capteur, ainsi réutilisables, tout en assurant une reproductibilité rigoureuse des conditions d'expérimentation. Ce type d'association permet une grande souplesse d'utilisation et un large spectre d'applications, non seulement en biodétection, mais aussi comme plateforme d'étude des écoulements fluidiques à petites échelles. Les intérêts de ce type d'association sont de coupler les avantages des capteurs SAW à ceux des dispositifs en PDMS. Dans la même optique, *Mitsakakis et al.* **[162]** ont réalisé un dispositif de détection

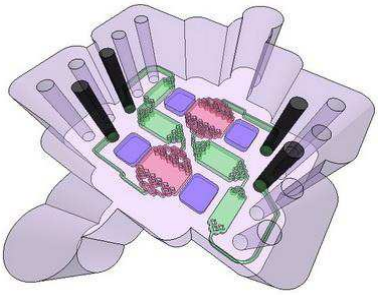
couplant un dispositif SAW avec un module microfluidique comportant plusieurs canaux et zones individuelles permettant la réalisation simultanée de plusieurs expériences.

Capteurs SAW :

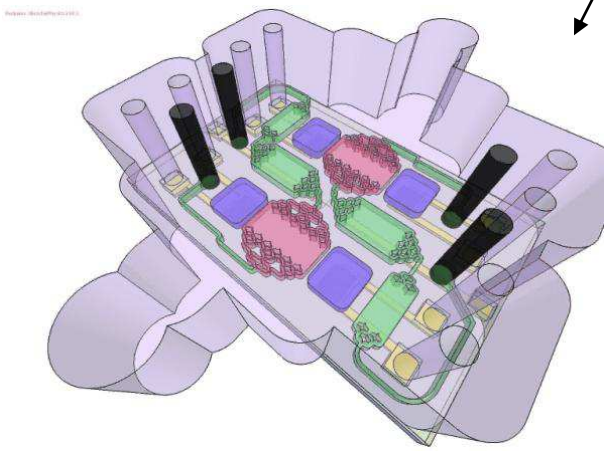


- Grande sensibilité gravimétrique
- Réponse en temps réel
- Robustesse

Puces PDMS :



- Effets hydrodynamiques intéressants pour le mélange et l'advection des espèces vers la zone sensible du capteur
- Caractère biocompatible et biomimétique du PDMS
- Facilité de réalisation et bas coûts



1.5. Conclusion

Ce chapitre nous a permis de voir les principales technologies et les aspects multidisciplinaires nécessaires à la mise au point d'une plateforme de détection biologique. Nous pouvons noter une évolution de la complexité des systèmes de détection depuis leur création au début des années 60. Plusieurs générations de biocapteurs ont vu le jour, du premier détecteur de glucose aux systèmes évolués tels que les LOC ou les µTAS intégrant toutes les étapes et les fonctions nécessaires à différents types de détections réalisées dans des laboratoires classiques. Ces systèmes de détection miniaturisés et autonomes ont pour objectif de créer à terme des systèmes mécatroniques de biodétection.

C'est dans cette optique, et forts de l'expérience accumulée au sein du laboratoire IMS sur les capteurs à ondes acoustiques et la biodétection, que nous avons commencé le développement d'un système de type LOC reposant sur l'association de dispositifs microfluidiques et de capteurs SAW.

Bien évidemment, les aspects liés à la fonctionnalisation et au domaine d'application du capteur sont menés grâce à l'implication de nos collègues chimistes et biologistes.

2. Dynamique des fluides

Préalablement à la conception de puces microfluidiques adaptées à nos applications, il est nécessaire de définir le cadre fondamental théorique du formalisme qui sous-tend les phénomènes physiques et biophysiques en milieu liquide, se déroulant au niveau de l'interface du capteur et du milieu de test contenant les espèces à détecter. Pour cela, nous allons explorer la phénoménologie dans son ensemble pour apporter des éléments de compréhension des interactions au sein de notre système et définir les directions théoriques et expérimentales à adopter. Pour cette exploration, nous allons nous baser sur le formalisme de la mécanique des fluides classique (hydrostatique et hydrodynamique) et voir dans quelles mesures nous pourrons l'adapter à notre système. Pour ce faire, nous commencerons par la théorie des systèmes statiques puis dynamiques à grandes échelles, pour aboutir à la théorie microfluidique régissant les phénomènes à l'échelle microscopique correspondant aux dimensions de nos cellules de détection. Pour approcher au plus près les conditions microfluidiques expérimentales, nous allons partir d'un cadre théorique général et l'appliquer à notre modèle moyennant quelques simplifications. Le but final est d'apporter un cadre théorique pour définir les directions à prendre. Cela nous amènera à considérer la géométrie des différentes puces conçues dans le cadre de cette étude et les écoulements mis en jeu dans chacune d'elles, au contact du chemin de propagation de l'onde acoustique.

2.1. Continuité et propriétés physiques des fluides

2.1.1. Description du milieu continu

Puisque les liquides utilisés sont chimiquement inertes, l'entité fondamentale à étudier est la molécule. De plus, du fait des dimensions mises en jeu (échelles représentatives de notre système), il est possible de considérer en première approximation le milieu comme étant continu. En effet, l'échelle du système est suffisamment importante par rapport aux dimensions des molécules, et le milieu est suffisamment dense, pour considérer que la matière est répartie de manière homogène et isotrope. Cette approximation du milieu continu nous permet d'attribuer des variables descriptives macroscopiques au liquide étudié. Pour valider

ou invalider cette hypothèse de continuité, il est nécessaire d'introduire le nombre de Knudsen, K_n. Ce nombre adimensionnel est le rapport du libre parcours moyen des molécules, λ_{lpm} , à la plus petite dimension du système d'écoulement, L_0 **[163]**:

$$K_n = \frac{\lambda_{lpm}}{L_0} \qquad (2\text{- }1)$$

Le nombre de Knudsen permet de définir quatre types de régime d'écoulement selon la plage de valeurs qu'il prend:

- Régime continu $K_n \leq 10^{-2}$
- Écoulement avec glissement $10^{-2} \leq K_n \leq 10^{-1}$
- Régime de transition $10^{-1} \leq K_n \leq 10$
- Régime moléculaire discontinu $K_n \geq 10$

Dans le cadre de nos travaux nous serons toujours dans le premier cas. Il est nécessaire de définir l'échelle du plus petit volume de liquide à étudier, le volume élémentaire ε. Pour respecter l'hypothèse de continuité d'une grandeur physique macroscopique ($\mathcal{P}$) du volume ε, celui-ci doit être suffisamment grand afin d'englober un nombre conséquent de molécules pour négliger les effets microscopiques, et suffisamment petit afin d'éviter l'apparition d'hétérogénéités spatiales à son échelle. En effet, une grandeur physique macroscopique, définie comme la moyenne des grandeurs microscopiques du volume élémentaire, doit être constante sur le volume ε pour remplir la condition de continuité (Figure 2-1).

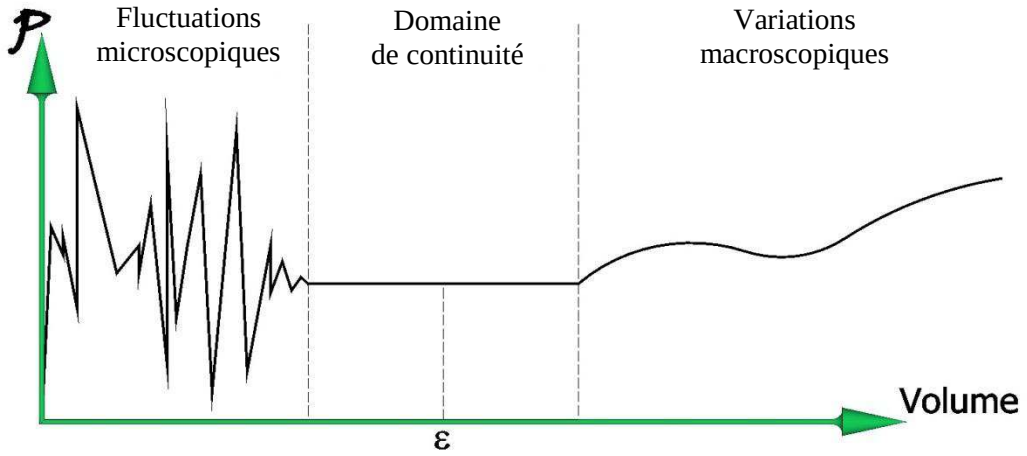


Figure 2-1 Domaine de continuité, homogénéité et inhomogénéité d'une grandeur physique $\mathcal{P}$

Pour décrire notre volume élémentaire de fluide, il est nécessaire d'introduire les paramètres macroscopiques relatifs à celui-ci : la température T, la pression P, la vitesse $\vec{V}$ et

la masse volumique ρ. De manière générale, le fluide classique est un état de la matière situé entre le solide spatialement organisé et les molécules d'un gaz gouvernées par l'agitation thermique. Ses principales caractéristiques utilisées ici sont sa viscosité, sa conductivité thermique et sa compressibilité.

2.1.2. Viscosité

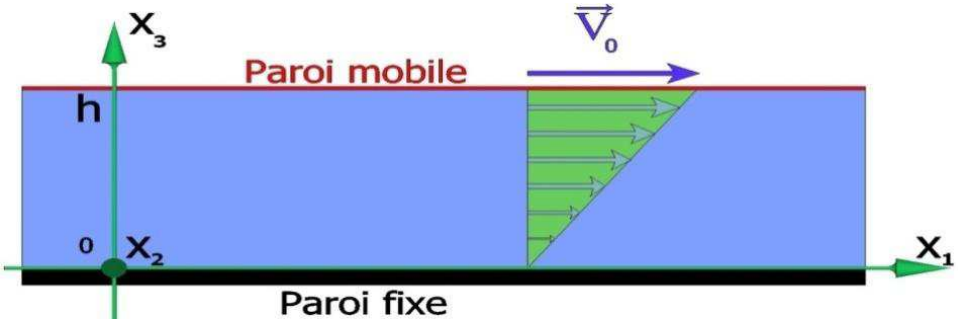


Figure 2-2 Écoulement plan de Couette

La viscosité d'un fluide est la résistance que celui-ci oppose à la force qui tend à le cisailler (à le mettre en mouvement). L'écoulement de Couette (Figure 2-2) est la manière la plus simple d'expliciter la viscosité. En l'absence d'interactions extérieures, le déplacement du fluide est seulement régi par le déplacement de la paroi mobile. L'expérience de Couette fait apparaître un gradient de vitesse linéaire entre les deux parois. Pour mettre en mouvement la paroi supérieure, il faut appliquer une force *F*, tangentielle à sa surface. Cette force, par unité de surface, est proportionnelle à la vitesse $\overrightarrow{V_0}$ de déplacement de la paroi supérieure et à l'épaisseur *h* de la couche de liquide. Le coefficient de proportionnalité définit la viscosité dynamique du système, tel que :

$$\frac{F}{A} = \mu \frac{V_0}{h} \qquad (2\text{-}2)$$

Avec μ, la viscosité dynamique, exprimée en $kg.m^{-1}.s^{-1}$ ou *Pa.s* ou encore *Pl* (Poiseuille) en unité S.I et en *Po* (Poise) en unité C.G.S. (*1Pl=10Po*). Elle peut aussi être exprimée de manière cinématique, soit υ, en $m^2.s^{-1}$ en unité S.I. ou Stockes (*St*) en unité C.G.S. ($1m^2.s^{-1}=10^4$ *St*) :

$$\upsilon = \frac{\mu}{\rho} \qquad (2\text{-}3)$$

Il est à noter que la viscosité diminue si la température augmente et qu'elle augmente si la pression augmente :

$$\mu = \mu_0^{\left(\frac{T}{T_0}\right)^m} \quad et \quad \frac{\mu}{\mu_0} = a^{\left(\frac{P}{P_0}-1\right)} \qquad (2\text{-}4)$$

Le rapport *F/S* représente la contrainte visqueuse tangentielle due au mouvement causé par l'application de la force *F* sur la surface *S*, elle est notée τ. En généralisant cette notion à un système tridimensionnel, les contraintes visqueuses sont représentées par un tenseur d'ordre 2 à 9 composantes, notées τ_{ij}, (i=1, 2, 3 et j=1, 2, 3). Par convention, la direction de la force est indiquée par le premier indice et la normale à la surface par le second. La relation (*2- 2*) définit les fluides dits classiques, ayant un comportement rhéologique dit newtonien. Pour un fluide newtonien le tenseur des contraintes visqueuses s'écrit:

$$\tau_{ij} = \mu\left(\frac{\partial V_i}{\partial x_j} + \frac{\partial V_j}{\partial x_i}\right) + \mu' \frac{\partial V_k}{\partial x_k}\delta_{ij} \qquad (2\text{-}5)$$

$$\tau_{ij} = 2\mu S_{ij} + \mu' \vartheta \delta_{ij} \qquad (2\text{-}6)$$

Avec : $$S_{ij} = \frac{1}{2}\left(\frac{\partial V_i}{\partial x_j} + \frac{\partial V_j}{\partial x_i}\right) \text{ et } \vartheta = \frac{\partial V_k}{x_k} \qquad (2\text{-}7)$$

Où:
- S_{ij} représente le tenseur des vitesses de déformation,
- μ est la viscosité dynamique,
- μ' est la viscosité de volume. Les contraintes correspondantes sont associées aux variations de volume par compression et font intervenir la divergence de la vitesse. (où δ_{ij} est le symbole de Kronecker, valant 1 si i=j et 0 si i≠j). Étant donné que nous utilisons des fluides incompressibles, la divergence des vitesses est nulle et le terme ϑ n'apparaîtra plus, τ_{ij} s'écrit alors :

$$\tau_{ij} = 2\mu S_{ij} \qquad (2\text{-}8)$$

Dans le cas de la Figure 2-2, nous avons : $\tau_{13} = \mu\frac{V_0}{h}$, ou encore, si le champ des vitesses $V(x_3)$ n'est pas linéaire :

$$\tau_{13} = \mu\frac{dV(x_3)}{dx_3} \qquad (2\text{-}9)$$

En l'absence de mouvement, les contraintes sont seulement dues aux forces de surface générées par la pression hydrostatique *P* isotrope, ne dépendant que de l'état

thermodynamique du fluide. Dans le cas général, deux types de contraintes existent, d'une part celle due à la pression hydrostatique et d'autre part celle due à la résistance qu'un fluide oppose à son déplacement. La somme de ces contraintes représente le tenseur total des contraintes, soit:

$$\sigma_{ij} = -P\delta_{ij} + \tau_{ij} = -P\delta_{ij} + 2\mu S_{ij} \qquad (2\text{-}10)$$

$$\overline{\overline{\sigma}} = \begin{pmatrix} \sigma_{11} & \sigma_{12} & \sigma_{13} \\ \sigma_{21} & \sigma_{22} & \sigma_{23} \\ \sigma_{31} & \sigma_{32} & \sigma_{33} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \vec{e}_x \\ \vec{e}_y \\ \vec{e}_z \end{pmatrix} \qquad (2\text{-}11)$$

Où :
- $-P\delta_{ij}$ représente les contraintes de pression normales aux surfaces,
- τ_{ij} représente les contraintes de cisaillement tangentes aux surfaces dues à la viscosité.

A ce tenseur des contraintes est associée une contrainte $\vec{T}(P,\vec{n})$, telle que:

$$T_i(\vec{n}) = \sigma_{ij}(P)n_j(P) \quad soit \quad \vec{T}(\vec{n}) = \begin{vmatrix} \sigma_{11}n_1 + \sigma_{12}n_2 + \sigma_{13}n_3 \\ \sigma_{21}n_1 + \sigma_{22}n_2 + \sigma_{23}n_3 \\ \sigma_{31}n_1 + \sigma_{32}n_2 + \sigma_{33}n_3 \end{vmatrix} \qquad (2\text{-}12)$$

La contrainte $\vec{T}$ et le tenseur des contraintes $\overline{\overline{\sigma}}$ sont représentés sur la Figure 2-3.

En rhéologie, les comportements des fluides diffèrent selon que leurs réponses aux contraintes dépendent ou non du temps. Lorsque le comportement est indépendant du temps, la contrainte de cisaillement est dépendante uniquement du gradient de vitesse (Figure 2-4).

Lorsque la réponse du liquide à une contrainte fixe dépend de la durée d'application de la contrainte ou lorsque la réponse dépend de la variation de contrainte dans le temps, les fluides sont respectivement qualifiés de :

- Rhéopectiques: la viscosité apparente augmente lorsque la durée d'application de la contrainte augmente.
- Thixotropes: la viscosité apparente diminue lorsque la durée d'application de la contrainte augmente.
- Viscoélastiques: ces matériaux modifient leur structure pour s'adapter à la contrainte et ont, soit un comportement type fluide visqueux, soit un comportement type solide élastique.

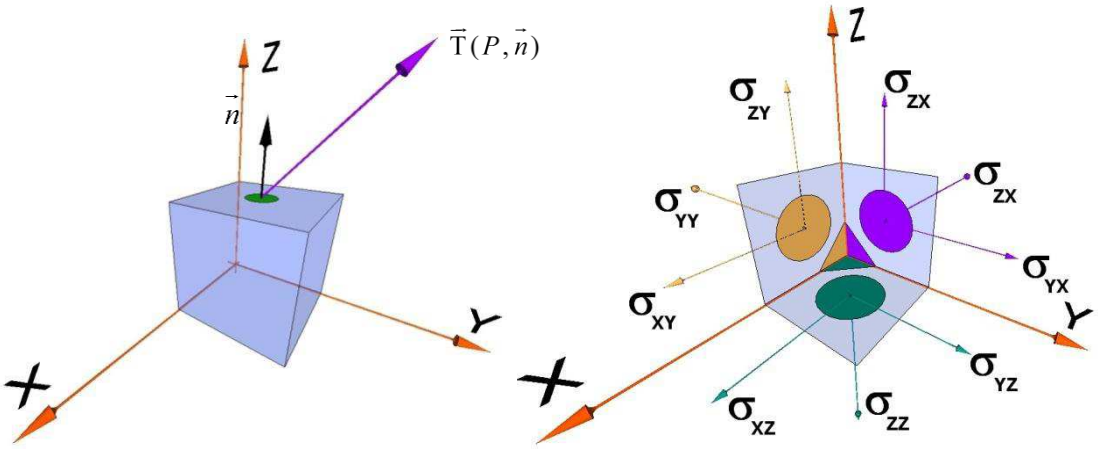


Figure 2-3 Contraintes et composantes du tenseur des contraintes dans un repère tridimensionnel orthonormé

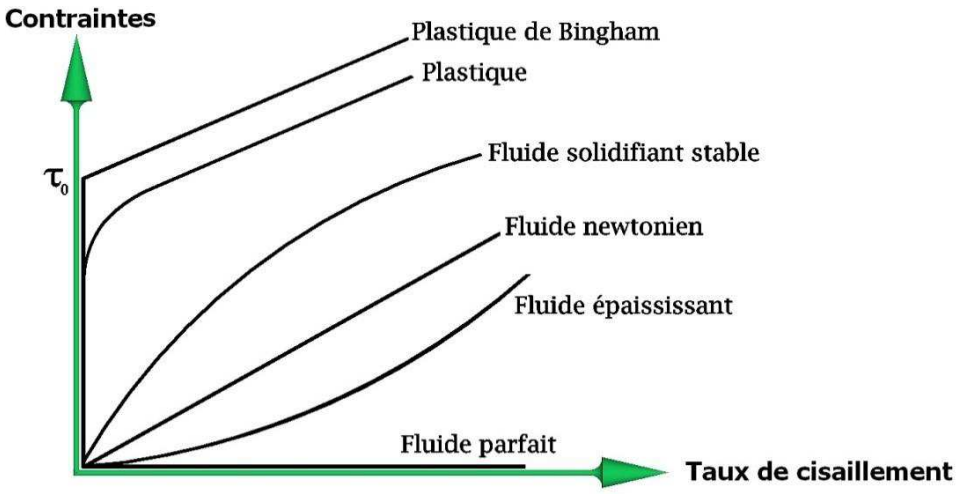


Figure 2-4 Comportements des fluides en fonction de la variation des contraintes par rapport au taux de cisaillement.

Le comportement des fluides viscoélastiques est caractérisé par le nombre de Deborah. Ce nombre adimensionné définit la fluidité d'un matériau. Il est le rapport du temps de changement de conformation du matériau, ou temps de relaxation, t_r, sur le temps caractéristique de variation de la contrainte $\vec{T}$ appliquée au matériau, c'est à dire l'échelle de temps caractéristique de la durée de l'expérience, t_{exp}, soit :

$$D_e = \frac{t_r}{t_{\exp}} \qquad (2\text{- }13)$$

Si $D_e << 1$ le fluide aura un comportement visqueux, si $D_e >> 1$ il aura un comportement élastique.

Pour un fluide Newtonien, les contraintes sont proportionnelles à la variation du taux de cisaillement γ (variation de la vitesse de déformation) du volume liquide. Le coefficient de proportionnalité représente de nouveau la viscosité dynamique, μ :

$$\sigma = \mu \dot{\gamma} \qquad (2\text{- }14)$$

2.1.3. Conductivité thermique

Dans un milieu solide la chaleur se transmet de deux manières, par rayonnement électromagnétique ou par conduction. Dans notre cas, étant données les températures de travail, les phénomènes de transfert radiatifs pourront être négligés et seuls les transferts par conduction seront abordés. La conduction est la propriété de transférer de la chaleur par agitation thermique de la matière (échange d'énergie cinétique microscopique entre atomes voisins). En mécanique des fluides, la conduction s'accompagne d'un phénomène nouveau : la convection. La convection est le transport de chaleur macroscopique, dû à l'écoulement La convection thermique peut être naturelle ou forcée. Pour un fluide au repos entre deux parois planes à l'équilibre thermique, la température des deux plaques est T_0. Lorsqu'on élève la température de la paroi supérieure à T_1, en ne supposant aucun mouvement d'ensemble du liquide et après un certain temps de diffusion thermique, un profil linéaire de température apparaît entre les deux plaques lorsque l'équilibre thermique est atteint (Figure 2-5) :

$$\frac{T - T_0}{T_1 - T_0} = \frac{x_3}{h} \qquad (2\text{- }15)$$

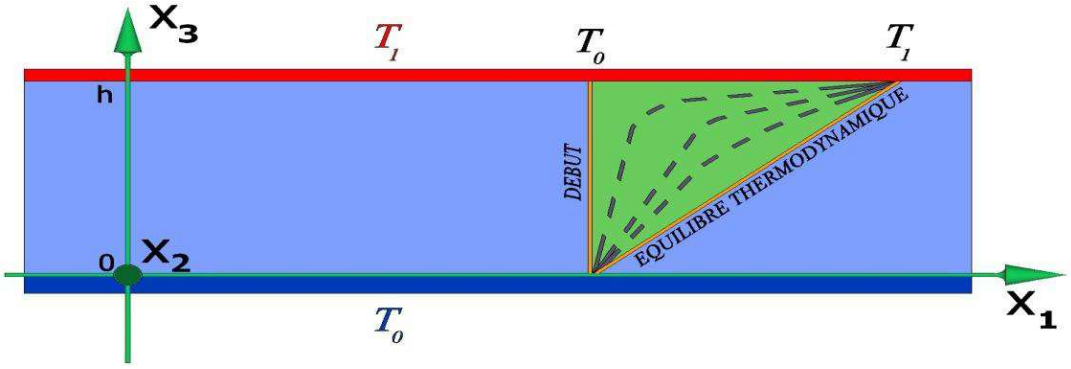


Figure 2-5 Transfert thermique entre deux plaques parallèles

L'intensité du flux de chaleur *Q* à travers une surface S est proportionnelle au gradient thermique et à la distance séparant les deux plaques, ce coefficient de proportionnalité définit la conductivité thermique du milieu, λ, en $W.m^{-1}.K^{-1}$:

$$\frac{Q}{S} = -\lambda \frac{\Delta T}{h} \qquad (2\text{- }16)$$

Plus généralement, à basses températures, le mode de transfert thermique est la conduction, définie dans le cadre de la théorie de Fourier :

$$\vec{q} = -\lambda \overrightarrow{grad T} \qquad (2\text{- }17)$$

Le vecteur de densité de flux de chaleur $\vec{q}$ représente le flux de chaleur par unité de surface. La conductivité thermique peut aussi être exprimée de manière dynamique, elle définit dans ce cas la diffusivité thermique:

$$a = \frac{\lambda}{\rho C_p} \qquad (2\text{- }18)$$

C_p étant la chaleur spécifique du liquide, à pression constante. Ainsi la viscosité cinématique et la diffusivité thermique s'expriment toutes les deux en $m^2.s^{-1}$. Il est possible d'établir une relation liant ces deux grandeurs en introduisant le nombre de Prandtl :

$$\mathrm{P_r} = \frac{\upsilon}{a} = \frac{\mu C_p}{\lambda} \qquad (2\text{- }19)$$

Ce nombre adimensionné, propriété d'un fluide, est très utile, car il permet de déterminer le transfert thermique au sein d'un fluide en mouvement et de choisir le fluide le plus approprié:

- $P_r \ll 1$: les transferts thermiques seront maximisés en diminuant les pertes d'énergie dues à la viscosité (régulation et transferts thermiques).
- $P_r \gg 1$: les transferts thermiques seront minimisés en augmentant les pertes d'énergie dues à la viscosité (lubrification des systèmes).

Dans notre cas, nous chercherons à minimiser les pertes d'énergie par viscosité afin de faciliter les écoulements à petites échelles, donc utiliseront des liquides tels que $P_r \ll 1$.

2.1.4. Compressibilité et dilatation thermique

La compressibilité d'un liquide est définie par son nombre de Mach, le rapport de la vitesse des particules au sein d'un fluide, V_P sur la célérité de l'onde de pression qui le traverse, c_e:

$$\mathcal{M} = \frac{V_P}{c_e} \qquad (2\text{- }20)$$

Un nombre de Mach $\mathcal{M} < 1$ caractérise un régime subsonique, pour $\mathcal{M} > 1$, le régime est qualifié de supersonique. La nature de l'écoulement, et non celle du fluide, permet ainsi de qualifier un fluide de compressible ou incompressible ; en effet, il est admis qu'un liquide est compressible si $\mathcal{M}$<0,2.

La célérité de l'onde de pression est :

$$c_e = \sqrt{\frac{\gamma_P P}{\rho}},$$

γ_P étant le coefficient polytropique, rapport des chaleurs spécifiques à pression constante (C_P) et volume constant (C_V), soit :

$$\gamma_P = \frac{C_P}{C_V}.$$

De plus C_p et C_v sont reliés par la relation suivante :

$$C_p = C_v + \frac{d}{dT}(PV)$$

La variation du produit PV est négligeable avec la température. On admettra donc que :

$$C_P = C_V = C$$

Puisque dans notre cas, la pression de travail est la pression atmosphérique, et que les vitesses de fluides utilisées (quelques mm/s) permettent d'estimer $\mathcal{M} \ll 0{,}2$, nous pouvons alors considérer nos fluides comme étant incompressibles.

La dilatation thermique à pression constante, δv, d'un fluide soumis à une variation de température δT vaut:

$$\left(\frac{\delta v}{v}\right)_P = \alpha \delta T$$

α étant le coefficient de dilatation thermique. Dans notre cas, la dilatation thermique sera négligée car la température de travail de notre système est constante, proche de 37°C (310K).

Nous pouvons donc admettre que les fluides utilisés dans le cadre de nos travaux, sont incompressibles aux pressions, températures, et vitesses d'écoulement considérées.

2.2. Description du mouvement et de l'énergie des fluides

2.2.1. Modèle général de Navier-Stokes

Après avoir décrit les principales propriétés des fluides et mis en évidence des hypothèses simplificatrices validées dans le cadre de nos applications, nous allons maintenant décrire leurs mouvements à l'aide de variables. Les variations de ces grandeurs descriptives peuvent être de types lagrangiennes (suivi d'un domaine matériel au sein du liquide, traceur) ou eulériennes (observation des propriétés du fluide dans un volume de contrôle fixe et localisé dans le fluide, sonde). Par la suite, nous traiterons les problèmes avec une approche eulérienne. Pour un champ scalaire $f(x,y,z,t)$ des variables d'Euler (x,y,z,t) nous avons :

$$\frac{df}{dt} = \frac{\partial f}{\partial t} + \vec{V}\vec{\nabla} f \qquad (2\text{- }21)$$

Pour un champ de vecteur $\vec{A}(x,y,z,t)$ des variables d'Euler $A_i(x,y,z,t)|_{i=1,2,3}$ il s'ensuit:

$$\frac{d\vec{A}}{dt} = \frac{\partial \vec{A}}{\partial t} + \left(\vec{V}\overrightarrow{grad}\right)\vec{A} \qquad (2\text{- }22)$$

Dans le formalisme eulérien, le mouvement d'un fluide étudié est défini par le modèle de Navier-Stokes généralisé, basé sur les lois de conservation de la masse, d'évolution de la quantité de mouvement et de l'énergie. Les fluides étant incompressibles, il est possible de découpler ces équations.

2.2.1.1. Conservation de la masse - équation de continuité

La conservation de la masse est définie par l'équation de continuité (2- 23) (car définie dans le cadre d'un milieu continu). Elle exprime le fait suivant : au cours du temps, la variation de masse volumique du fluide, $\partial\rho/\partial t$, est opposée au flux de matière sortant de ce

fluide, $div\left(\rho\vec{V}\right)$. Le fluide étant incompressible, la divergence de la vitesse représentant la vitesse de dilatation du volume de liquide, est nulle. Autrement dit, le débit volumique est constant le long d'un tube de courant : sur la Figure 2-6, le produit de la section par la vitesse est identique en A et B. Comme $div(\rho\vec{V}) = \rho div\vec{V} + \vec{V}\cdot\vec{\nabla}\rho = 0$, le bilan de masse peut s'écrire :

$$\frac{\partial\rho}{\partial t} + div(\rho\vec{V}) = \frac{d\rho}{dt} + \rho div\vec{V} = 0 \qquad (2\text{-}23)$$

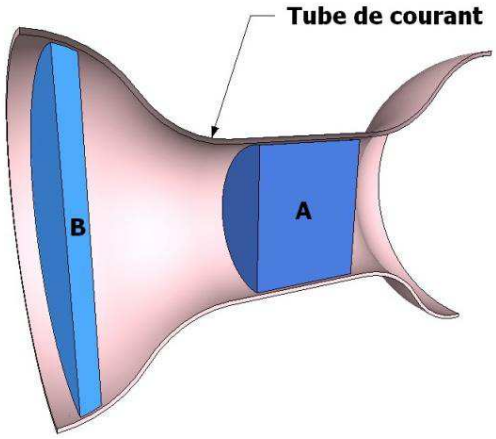


Figure 2-6 du fait de la continuité du milieu, le volume A est égal au volume B

2.2.1.2. Bilan de quantité de mouvement - équation de la dynamique

La conservation de la quantité de mouvement est représentée par la seconde loi de Newton reliant la dérivée de la quantité de mouvement d'une particule aux forces exercées sur celle-ci. Les forces d'un tel système sont d'origine volumique (gravité) et surfacique (pression et cisaillement) :

$$\Sigma Forces\ d'inertie\begin{cases} Instationnarité \\ Advection \end{cases} = \Sigma Forces\ extérieures\begin{cases} Volume: gravité \\ Surface\begin{cases} Pression \\ Viscosité \end{cases} \end{cases}$$

Soit : $$\rho\frac{d\vec{V}}{dt} = \rho\vec{g} + div\overline{\overline{\sigma}} \qquad (2\text{-}24)$$

ou encore, en utilisant (2- 10) et (2- 22)

$$\rho\left(\frac{\partial\vec{V}}{\partial t} + \left(\vec{V}\,\overrightarrow{grad}\right)\vec{V}\right) = \rho\vec{g} - \overrightarrow{grad}P + \mu\vec{\Delta}\vec{V} \qquad (2\text{-}25)$$

Où $\vec{g}$ est l'accélération de la pesanteur.

Ou encore, sous sa forme indicielle (notations d'Einstein) :

$$\rho\left(\frac{\partial V_i}{\partial t}+V_j\frac{\partial V_i}{\partial x_j}\right)=\rho g_i-\frac{\partial P}{\partial x_i}+2\frac{\partial(\mu S_{ij})}{\partial x_j} \qquad (2\text{- }26)$$

Pour le membre de gauche, le premier terme représente la variation temporelle de la vitesse (caractère instationnaire) et le second terme représente la variation de quantité de mouvement dûe à l'inhomogénéité des vitesses. Pour le second membre, le premier terme représente toutes les forces de volume, le second terme caractérise les forces de pression correspondant aux contraintes normales (pression hydrostatique), le troisième terme représente les forces de viscosité dues aux cisaillements.

2.2.1.3. Bilan de l'énergie

Pour expliciter la conservation de l'énergie, il est nécessaire d'exprimer le bilan des énergies du système: énergie cinétique E_c et interne E_i. Pour cela vont être utilisés :

- le théorème de l'énergie cinétique ;
- le premier principe de la thermodynamique ;
- le second principe de la thermodynamique.

➢ Le théorème de l'énergie cinétique s'obtient en multipliant l'équation de la quantité de mouvement *(2- 26)* par V_i, c'est la relation de Cauchy:

$$\rho\frac{d}{dt}\left(\frac{V_i^2}{2}\right)=\rho V_i g_i+V_i\frac{\partial\sigma_{ij}}{\partial x_j} \qquad (2\text{- }27)$$

La variation d'énergie cinétique est égale à la puissance de toutes les forces extérieures appliquées au volume (surfaciques et volumiques).

➢ Le premier principe de la thermodynamique est exprimé par la relation suivante :

$$d(E_c+E_i)=\delta W_{ext}+\delta Q_{ext} \qquad (2\text{- }28)$$

Ou

$$\Delta(E_c+E_i)=\Delta W_{ext}+\Delta Q_{ext} \qquad (2\text{- }29)$$

Les variations des énergies internes et cinétiques d'un système entre deux états (initial noté I et final noté F) à l'équilibre thermodynamique sont fonctions du travail δW_{ext} et de la chaleur δQ_{ext} échangés par le système avec l'extérieur durant la transition du système entre ces deux états. Nous pouvons aussi l'écrire sous la forme :

$$\frac{d}{dt}(E_c + E_i) = \Pi_{ext}^{W} + \Pi_{ext}^{Q} = \Pi_{Totale} \qquad (2\text{-}30)$$

Où la puissance totale, Π_T, est égale à la somme des puissances mécaniques et thermiques échangées avec l'extérieur. Le système, à un instant *t*, possède un volume matériel $\mathcal{V}_m(t)$ et une surface matérielle $\mathcal{S}_m(t)$.

- La puissance mécanique échangée avec l'extérieur du volume matériel $\mathcal{V}_m(t)$, Π_{ext}^{W}, possède deux contributions, l'une surfacique ($\Pi_{ext}^{\mathcal{S}}$) et l'autre volumique ($\Pi_{ext}^{\mathcal{V}}$) :

$$\Pi_{ext}^{W} = \Pi_{ext}^{\mathcal{S}} + \Pi_{ext}^{\mathcal{V}} = \iint_{\mathcal{S}_m(t)} V_i T_i ds + \iiint_{\mathcal{V}_m(t)} \rho V_i g_i dv \qquad (2\text{-}31)$$

Soit encore: $$\Pi_{ext}^{W} = \Pi_{ext}^{\mathcal{S}} + \Pi_{ext}^{\mathcal{V}} = \iiint_{\mathcal{V}_m(t)} \frac{\partial}{\partial x_j}\left(V_i \sigma_{ij}\right) dv + \iiint_{\mathcal{V}_m(t)} \rho V_i g_i dv \qquad (2\text{-}32)$$

- La puissance thermique totale échangée est seulement due aux transferts de chaleur de type conductifs, en effet, il n'y aura aucune réaction de type exothermique au sein de notre système et l'échange de chaleur avec l'extérieur se fait à travers la surface $\mathcal{S}_m(t)$:

$$\Pi_{ext}^{Q} = -\iint_{\mathcal{S}_m(t)} \vec{q}\vec{n} ds = -\iiint_{\mathcal{V}_m(t)} div\vec{q} dv \qquad (2\text{-}33)$$

Où $\vec{n}$ est la normale sortante à $\mathcal{S}_m(t)$. Pour rappel, $\vec{q}$ est la densité de flux de chaleur, voir équation (2- 17). Globalement le bilan des puissances prend la forme suivante:

$$\Pi_{Totale} = \Pi_{ext}^{W} + \Pi_{ext}^{Q} = \Pi_{ext}^{\mathcal{S}} + \Pi_{ext}^{\mathcal{V}} + \Pi_{ext}^{Q} \qquad (2\text{-}34)$$

Soit : $$\Pi_{Totale} = \iiint_{\mathcal{V}_m(t)} \frac{\partial}{\partial x_j}\left(V_i \sigma_{ij}\right) dv + \iiint_{\mathcal{V}_m(t)} \rho V_i g_i dv - \iiint_{\mathcal{V}_m(t)} \frac{\partial q_i}{\partial x_i} dv \qquad (2\text{-}35)$$

De manière locale, par passage à la limite lorsque $V_m(t) \to 0$, nous obtenons :

$$\frac{d(\Pi_{Totale})}{dv} = \Pi_{Totale}^{Volumique} = \rho V_i g_i + \frac{\partial}{\partial x_j}\left(V_i \sigma_{ij}\right) - \frac{\partial q_i}{\partial x_i} \qquad (2\text{- }36)$$

Ce qui donne localement, pour la variation totale d'énergie :

$$\rho \frac{d}{dt}\left(e + \frac{V_i^2}{2}\right) = \rho V_i g_i + \frac{\partial\left(\sigma_{ij} V_i\right)}{\partial x_j} - \frac{\partial q_i}{\partial x_i} \qquad (2\text{- }37)$$

Avec e l'énergie interne par unité de masse. Sa variation est donnée par la loi de Joule : $de = C_V dT$ (pour rappel, C_V est la chaleur spécifique à volume supposé constant dans le domaine de notre étude). Avec la loi de Fourier (2- 17) et en explicitant de nouveau les composantes de σ_{ij} et q_i à l'aide de (2- 10) et (2- 17), il vient:

$$\rho \frac{d}{dt}\left(C_V T + \frac{V_i V_i}{2}\right) = \rho V_i g_i - \frac{\partial\left(P V_i\right)}{\partial x_i} + 2\frac{\partial(\mu S_{ij} V_i)}{\partial x_j} + \frac{\partial}{\partial x_i}\left(\lambda \frac{\partial T}{\partial x_i}\right) \qquad (2\text{- }38)$$

Nous pouvons aussi donner cette expression sous forme vectorielle :

$$\underbrace{\rho \frac{d}{dt}\left(C_V T + \frac{1}{2}V^2\right)}_{\substack{Taux\ de\ variation \\ de\ l'énergie\ totale \\ par\ unité\ de\ volume \\ et\ de\ temps}} = \underbrace{\rho \vec{g}\vec{V}}_{\substack{Puissance \\ des\ forces \\ de\ volume \\ (gravité)}} \underbrace{- div\left(P\vec{V}\right)}_{\substack{Puissance \\ des\ forces \\ de\ pression}} \underbrace{+ div\left(\overline{\overline{\tau}}.\vec{V}\right)}_{\substack{Puissance \\ des\ forces \\ visqueuses}} \underbrace{- div\vec{q}}_{\substack{Dissipation \\ thermique}} \qquad (2\text{- }39)$$

Remarque : la puissance des forces visqueuses (Φ_M) et le flux de chaleur (Φ_T) représentent la puissance des phénomènes irréversibles, notée Π_I :

$$\Pi_I = div(\overline{\overline{\tau}}.\vec{V}) - div\vec{q} = \Phi_M - \Phi_T \qquad (2\text{- }40)$$

Nous obtenons finalement les équations du modèle général de Navier-Stokes des bilans de masse, quantité de mouvement et énergie :

$$\textit{Continuité:} \quad \frac{d\rho}{dt} + \rho div\vec{V} = 0$$

$$\textit{Dynamique:} \quad \rho\left(\frac{\partial V_i}{\partial t} + V_j\frac{\partial V_i}{\partial x_j}\right) = \rho g_i - \frac{\partial P}{\partial x_i} + 2\frac{\partial(\mu S_{ij})}{\partial x_j} \qquad \textit{(2- 41)}$$

$$\textit{Energie:} \quad \rho\frac{d}{dt}\left(C_v T + \frac{V_i V_i}{2}\right) = \rho V_i g_i - \frac{\partial(PV_i)}{\partial x_i} + 2\frac{\partial(\mu S_{ij} V_i)}{\partial x_j} - \frac{\partial}{\partial x_i}\left(\lambda\frac{\partial T}{\partial x_i}\right)$$

En microfluidique, ces relations se simplifient, et deviennent :

$$\textit{Continuité:} \quad div\vec{V} = 0$$

$$\textit{Dynamique:} \quad \overrightarrow{grad}P = \mu\vec{\Delta}\vec{V}$$

$$\textit{Energie:} \quad 0 = \frac{\partial(\sigma_{ij}V_i)}{\partial x_i} - \frac{\partial q_i}{\partial x_i}$$

Ce résultat est démontré dans les paragraphes qui suivent.

2.2.2. Formes adimensionnelles de l'équation de Navier-Stokes – Nombres caractéristiques des écoulements

Les formes adimensionnelles des équations de Navier-Stokes sont très utiles car elles permettent de réaliser des hypothèses simplificatrices. Pour obtenir les formes adimensionnées des équations (2-41), nous allons les réécrire en divisant chaque variable par son échelle caractéristique au sein de l'écoulement (Tableau 2-1).

Soient $\vec{r} = \sum_{i=1}^{3} x_i\vec{e_i}$, $\vec{V} = \sum_{i=1}^{3} V_i\vec{e_i}$ et P, les coordonnées, la vitesse et la pression au temps *t* dans le repère eulérien $(O,\vec{e}_1,\vec{e}_2,\vec{e}_3)$ fixe de l'écoulement, avec les grandeurs adimensionnées du Tableau 2-1.

Nous allons utiliser ces grandeurs adimensionnelles pour définir plusieurs nombres caractéristiques de l'écoulement, pour les bilans de quantité de mouvement et énergie. Par la suite, ceci nous permettra de sélectionner les termes prépondérants en fonction des caractéristiques des éléments étudiés.

Tableau 2-1 : Variables adimensionnées

Paramètre adimensionné	**Variable adimensionnée**	**Échelles caractéristiques du système**
longueur	$x_i^* = \frac{x_i}{L_0}$	L_0 = échelle de longueur du système
vitesse	$V_i^* = \frac{V_i}{V_0}$	V_0 = échelle de vitesse de l'écoulement
temps	$t^* = \frac{t}{\left(\frac{L_0}{V_0}\right)}$	t = échelle de temps
pression	$P^* = \frac{P}{\rho V_0^2} = \frac{P}{P_0}$	$P_0 = \rho V_0^2$ = échelle de pression cinétique
accélération de la pesanteur	$g^* = \frac{g_i}{\left(\frac{L_0}{t_0^2}\right)} = \frac{g_i L_0}{V_0^2}$	$\frac{L_0}{t_0^2}$ = échelle de l'accélération
température	$T^* = \frac{T}{\Theta}$	Θ = échelle de température du système

2.2.2.1. Forme adimensionnelle pour la quantité de mouvement

À partir de l'équation de la quantité de mouvement du bilan (2- 41) et en remplaçant chaque variable par la variable adimensionnée correspondante du Tableau 2-1, le bilan de la quantité de mouvement sous sa forme adimensionnée (démonstration A 1 en Annexe A) s'écrit:

$$\left(\frac{\partial V_i^*}{\partial t^*} + V_j^* \frac{\partial V_i^*}{\partial x_j^*}\right) = \frac{1}{F_r}\left(\frac{g_i}{g}\right) - E_u \frac{\partial P^*}{\partial x_i^*} + \frac{1}{R_e}\left[\frac{\partial^2 V_i^*}{\partial x_j^* \partial x_j^*} + \frac{\partial}{\partial x_j^*}\left(\frac{\partial V_j^*}{\partial x_i^*}\right)\right] \qquad (2\text{- }42)$$

Cette écriture permet de définir les nombres adimensionnés caractéristiques suivants (Tableau 2-2), permettant de comparer le rapport des forces et pressions du système et de définir ainsi les phénomènes prépondérants.

Tableau 2-2 : Nombres adimensionnés relatifs à la quantité de mouvement du système

Nombre	**Expression**	**Signification**
de Reynolds :	$R_e = \frac{\rho V_0 L_0}{\mu} = \frac{V_0 L_0}{\upsilon}$	$\frac{Forces \quad d'inertie}{Forces \quad de \quad viscosité}$
de Froude :	$F_r = \frac{V_0^2}{gL_0}$	$\frac{Forces \quad d'inertie}{Forces \quad de \quad pesanteur}$
d'Euler :	$E_u = \frac{P_0}{\rho V_0^2}$	$\frac{Pression \quad statique}{Pression \quad dynamique}$

2.2.2.2. Forme adimensionnelle pour l'énergie

En procédant de la même manière que la relation (2- 42), le bilan énergétique s'écrit de la manière suivante (démonstration A1 en Annexe A):

$$\frac{\partial T^*}{\partial t^*} + V_j^* \frac{\partial T^*}{\partial x_j^*} = \frac{E_c}{F_r}\frac{g_i}{g} - E_u E_c \frac{\partial (P^* V_i^*)}{\partial x_i^*} + \frac{E_c}{R_e}\Phi_M - \frac{1}{P_e}\frac{\partial^2 T^*}{\partial x_i^* \partial x_i^*} \qquad (2\text{- }43)$$

$$\text{Avec } \Phi_M = \frac{\partial}{\partial x_i^*}\left[\left(\frac{\partial V_i^*}{\partial x_j^*} + \frac{\partial V_j^*}{\partial x_i^*}\right) V_i^*\right]$$

Où Φ_M représente la dissipation mécanique (voir la relation (*2- 40*)). Avec les nombres adimensionnés du Tableau 2-3 permettant de comparer les énergies du système entre elles et les contributions des transports et transferts de chaleur:

Tableau 2-3: Nombres adimensionnés relatifs à l'énergie du système

Nombre	Expression	Signification
Eckert	$E_c = \frac{V_0^2}{C_p \Theta}$	$\frac{Energie \quad cinétique}{Enthalpie}$
Péclet	$P_e = P_r \times R_e$	$\frac{Transport\ convectif}{Transfert\ diffusif}$

2.2.2.3. Forme adimensionnée temporelle de Navier-Stokes - Échelles de temps pour la quantité de mouvement

Afin d'étudier l'aspect chronologique de plusieurs phénomènes physiques, ayant leur temps propre de réalisation, un nouveau traitement permet d'obtenir une forme adimensionnelle du bilan de la quantité de mouvement avec des temps caractéristiques définis dans le Tableau 2-4. Ceux-ci permettront de privilégier certains phénomènes à d'autres en fonction du rapport de leurs temps caractéristiques.

Tableau 2-4: Temps caractéristiques de diffusion de la quantité de mouvement (avec les échelles caractéristiques du Tableau 2-1)

Symbole	Expression	Signification des temps caractéristiques
τ_I	$t^* = \frac{t}{\tau_I}$	Temps d'instationnarité
τ_A	L_0/V_0	Temps d'advection sur L_0
τ_G	V_0/g	Temps d'action des forces de gravité
τ_P	$\frac{\rho V_0 L_0}{P_0}$	Temps d'action des forces de pression
τ_D	$\frac{\rho L_0^2}{\mu} = \frac{L_0^2}{\upsilon}$	Temps d'action de la diffusion moléculaire sur L_0

L'écriture temporelle de l'équation de Navier-Stokes permet de comparer les phénomènes advectifs et instationnaires. Dans un liquide, plusieurs phénomènes sont à l'origine du déplacement des particules élémentaires: les forces inertielles et la diffusion. Les forces inertielles sont causées par l'advection et le caractère instationnaire de l'écoulement.

La diffusion est provoquée par les gradients de concentration de toutes les espèces au sein du liquide. Les temps caractéristiques définis précédemment permettent dès lors, d'effectuer quelques comparaisons entre tous les phénomènes de transports en redéfinissant, sur un plan temporel, les nombres de Reynolds et Péclet, et en introduisant le nombre de Strouhal.

Ainsi l'équation (2- 41) du bilan de la quantité de mouvement faisant intervenir les différentes échelles de temps du système devient :

$$\frac{1}{\tau_I}\left(\frac{\partial V_i^*}{\partial t^*}\right)+\frac{1}{\tau_A}\left(V_j\frac{\partial V_i^*}{\partial x_j^*}\right)=\frac{g^*}{\tau_G}-\frac{1}{\tau_P}\left(\frac{\partial P^*}{\partial x_i^*}\right)+\frac{1}{\tau_D}\left[\frac{\partial}{\partial x_j^*}\left(\frac{\partial V_i^*}{\partial x_j^*}+\frac{\partial V_j^*}{\partial x_i^*}\right)\right] \qquad (2\text{- }44)$$

2.2.2.4. Nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds (voir Tableau 2-2) R_e est le rapport des transferts de quantité de mouvement dues aux forces inertielles et aux forces de viscosité. Si $R_e \ll 1$, les forces visqueuses sont seules responsables du transfert de quantité de mouvement et le mécanisme de transfert dominant sera la diffusion. A l'inverse, si $R_e \gg 1$, les forces inertielles sont seules responsables du transfert de quantité de mouvement, et le mécanisme de transfert dominant sera l'advection.

Pour obtenir une analyse plus fine des proportions entre phénomènes de transports par diffusion et par advection, on peut se placer dans deux configurations possibles :

- Soit on fixe une longueur d'étude sur laquelle on observe les phénomènes d'advection et de diffusion au cours du temps,
- Soit on fixe un intervalle de temps pendant lequel on observe les phénomènes d'advection et de diffusion sur une certaine distance.

Ceci permet de savoir quels impacts auront la modification du temps d'expérimentation ou la dimension du système sur les phénomènes de transports. Le nombre de Reynolds peut alors se définir de deux manières :

a) **Sur un plan temporel**, comme le rapport du temps de transfert diffusif, τ_D, et du temps de transport advectif, τ_A, sur une même échelle de longueur L_0 :

$$R_e = \frac{\tau_D}{\tau_A} \qquad (2\text{- }45)$$

Avec $$\tau_D = \frac{L_0^{\,2}}{\upsilon} = \frac{L_0^{\,2}}{D} \quad et \quad \tau_A = \frac{L_0}{V_0} \qquad (2\text{- }46)$$

Où D est le coefficient de diffusion introduit par Einstein en 1905 :

$$D = \frac{R}{6\pi \mathcal{N}_a} \frac{T}{\mu r} = \frac{k_B T}{6\pi \mu r} \qquad (2\text{- }47)$$

Avec
- R la constante de gaz parfaits,
- T la température en Kelvin,
- μ la viscosité dynamique,
- r le rayon de la particule,
- k_B la constante de Boltzmann,
- $\mathcal{N}_a$ le nombre d'Avogadro,

Ainsi, pour de fortes viscosités, pour lesquelles $R_e \ll 1$, soit $\tau_D \ll \tau_A$, le temps caractéristique de transfert de quantité de mouvement par diffusion est très inférieur à celui de l'advection; nous retrouvons que le phénomène prépondérant de transport est la diffusion. A l'inverse, pour les faibles viscosités, lorsque $R_e \gg 1$, soit $\tau_A \ll \tau_D$, le temps caractéristique de transfert de quantité de mouvement par advection est très inférieur à celui de la diffusion et le phénomène prépondérant de transport est alors l'advection.

b) Sur un plan spatial, en faisant intervenir les longueurs de diffusion et d'advection sur une même échelle de temps :

$$R_e = \left(\frac{L_0}{\delta_D} \right)^2 \qquad (2\text{- }48)$$

De nouveau, il est aisé de retrouver que pour $R_e \ll 1$, la longueur d'advection est plus grande que celle de diffusion et est alors prépondérante. Ainsi, le nombre de Reynolds peut aussi être interprété comme un indicateur de l'équilibre entre advection et diffusion.

2.2.2.5. Nombre de Péclet

Le nombre de Péclet peut être défini sur un plan temporel comme étant le rapport du temps de diffusion τ_D et du temps de convection τ_C des particules à la vitesse V_0. Ce rapport est effectué en posant comme condition l'égalité du rayon de la particule fluide et de la distance de diffusion : $r = \delta_D$.

Avec :

- $\tau_C = \frac{r}{V_0} = \frac{1}{\dot{\gamma}}$, $\dot{\gamma}$ étant le taux de cisaillement
- $\tau_D = \frac{\delta_D^{\,2}}{D} = \frac{r^2}{D}$

Ainsi : $$P_e = \frac{\tau_D}{\tau_C} = \frac{6\pi\mu\dot{\gamma}r^3}{k_B T} \qquad (2\text{-}49)$$

Il apparaît ainsi que la limite entre les deux comportements va principalement dépendre de la taille de la particule, définissant deux tendances :

- un comportement brownien pour $P_e << 1$
- un comportement dépendant du taux de cisaillement pour $Pe >> 1$

2.2.2.6. Nombre de Strouhal

Un autre nombre adimensionné intéressant peut être introduit, comme nous le verrons plus tard lorsque nous étudierons l'influence de sollicitations périodiques d'un fluide sous écoulement : il s'agit du nombre de Strouhal, S_t. Il compare en module les accélérations dues aux phénomènes instationnaires de l'écoulement et celles dues à l'advection du fluide :

$$S_t = \frac{A_A}{A_I} = \frac{L_0}{V_0 T_0} \qquad (2\text{-}50)$$

Pour une sollicitation de type périodique, de fréquence F_0, le nombre de Strouhal s'exprime par la relation suivante :

$$S_t = \frac{A_A}{A_I} = \frac{F_0 L_0}{V_0} \qquad (2\text{-}51)$$

2.3. Application à la conception de cellules microfluidiques

2.3.1. Ondes acoustiques en milieu liquide

Configuration statique sans écoulement

Ces éléments théoriques étant posés, nous allons analyser comment le fluide réagit lorsqu'il est placé au-dessus de la surface d'un dispositif à ondes de Love, parcouru par une onde se propageant sur x_1 et présentant des déplacements sinusoïdaux transverses horizontaux

selon x_2. Cela va nous permettre de préparer l'étude théorique des phénomènes effectivement mis en jeu dans les milieux liquides en surface du capteur étudié, en considérant ainsi une onde de Love, d'amplitude A et de fréquence f_0 (de l'ordre de 115 MHz dans le cas de nos dispositifs). Les profils des vitesses sont présentés sur la Figure 2-7 **[163]**, l'influence de l'écoulement sera considérée en fin de § 2.3.1.

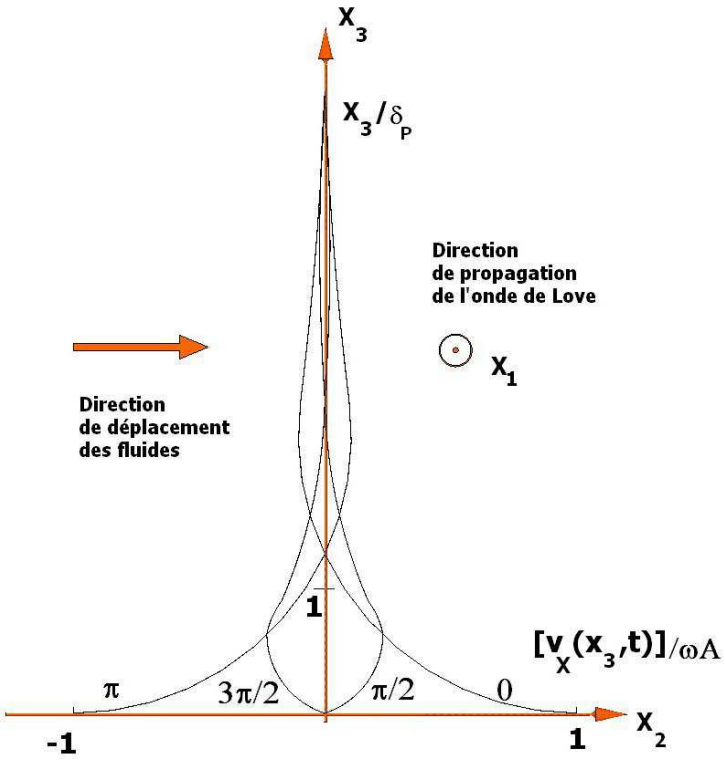


Figure 2-7 Profil de vitesse en fonction de la phase en proche paroi dû à l'oscillation engendrée par l'onde de Love. L'onde de Love cisaille le liquide parallèlement à la surface (sur x_2). Le profil des vitesses dépend de la phase de l'onde, δ_p est la profondeur de pénétration de l'onde dans le liquide.

Étant donnée la symétrie de la cavité de détection, dont nous décrirons les géométries dans les paragraphes suivants, le champ de vitesse ne dépend ni de x_1, ni de x_2, et, le fluide étant incompressible, $div\left(\vec{v}\right)=0$ et $\partial v_3/\partial x_3=0$. Au niveau de la paroi la condition de non glissement impose $v_{12}=0$. De plus, le volume de liquide utilisé étant inférieur au cm^3, les forces de volumes (terme en g_i) sont négligeables.

Le profil des vitesses de la Figure 2-7, est déterminé à l'aide des équations de Navier-Stokes (eq. (2- 26), en utilisant (2- 3) et (2- 7)) dont les projections sur les axes Ox_2 et Ox_3 s'écrivent **[163]**:

$$\frac{\partial v_2}{\partial t} = -\frac{1}{\rho}\frac{\partial P}{\partial x_2} + \upsilon \frac{\partial^2 v_2}{\partial x_2^2} \qquad (2\text{- }52)$$

$$0 = -\frac{1}{\rho}\frac{\partial P}{\partial x_3} \qquad \text{(pression hydrostatique) (2- 53)}$$

$v_2(x_3,t)$ peut s'exprimer à l'aide d'une fonction périodique telle que :

$$v_2(x_3,t) = f\left(x_3\right)\cos\left(\omega t + \varphi\right) = \Re\left(f\left(x_3\right)e^{j\omega t}\right) \qquad (2\text{- }54)$$

$f(x_3)$ étant une fonction complexe et $\Re\left(f\left(x_3\right)e^{j\omega t}\right)$ sa partie réelle. Avec cette expression de la vitesse, la relation (2- 52) devient:

$$j\omega f\left(x_3\right) = \upsilon \frac{\partial^2 f}{\partial x_3^2} \qquad (2\text{- }55)$$

La résolution de cette équation permet d'obtenir le profil de la vitesse imposée au fluide par l'oscillation de l'interface :

$$v_2(x_3,t) = \underbrace{\omega A e^{-kx_3}}_{\substack{amortissement \\ exponentiel}} \underbrace{\cos(\omega t - kx_3)}_{propagation} \qquad (2\text{- }56)$$

Pour un fluide newtonien visqueux, la valeur de profondeur de pénétration δ_P est obtenue lorsque l'amplitude de la vitesse est réduite d'un facteur $\frac{1}{e}$, soit :

$$\delta_P = \sqrt{\frac{2\upsilon}{\omega}} \qquad (2\text{- }57)$$

À nos fréquences, de l'ordre de 100 MHz, $\delta_0 = 53\ \text{nm}$ pour une viscosité égale à celle de l'eau comme pour une matrice de tampon salin. Pour des matrices contenant du polyéthylène glycol (PEG) et ayant un comportement viscoélastiques, dont nous allons démontrer l'utilité au chapitre 4, il est nécessaire d'introduire le modèle mécanique du fluide de Maxwell pour déterminer la profondeur de pénétration de l'onde. Il rend compte du comportement du fluide viscoélastique à des fréquences de sollicitation basses (liquide de viscosité μ) et hautes (solide de module élastique G). Ce comportement peut être modélisé par un ressort (contrainte σ proportionnelle à la déformation) en série avec un amortisseur (contrainte σ proportionnelle

aux taux de cisaillement). La déformation totale d'un fluide de Maxwell soumis à une sollicitation sinusoïdale est complexe : $h(t) = h_0(\omega)e^{j\omega t}$. Elle est par ailleurs égale à la somme des déformations des deux contributions citées précédemment :

$$h_{liquide\ de\ Maxwell} = h_{ressort} + h_{amortisseur} = \frac{\sigma}{G} + \frac{1}{j\omega}\frac{\sigma}{\mu} \qquad (2\text{- }58)$$

Dans ce cas, la viscosité de la relation (2- 52) est complexe et s'écrit :

$$\upsilon^* = \frac{\upsilon}{1 + j\omega\tau} = \frac{\upsilon}{1 + j\omega\frac{\mu}{G}} \qquad (2\text{- }59)$$

Avec τ le temps caractéristique du fluide. La profondeur de pénétration de l'onde s'exprime alors, après résolution de la relation (2- 55), de la manière suivante **[163]**:

$$2k^2\delta^2(\omega) = 4\omega\tau \qquad (2\text{- }60)$$

Avec $$\frac{k^2}{\omega^2} = \frac{\tau}{\upsilon} = \frac{\rho}{G} = \frac{1}{c_t^2}$$

c_t étant la vitesse de propagation des ondes transverses de cisaillement.

Ceci nous permet de déterminer que, quelle que soit la nature du fluide utilisé (viscoélastique ou non), la profondeur de pénétration, et par conséquent le volume liquide sondé, pourront être augmentés en contrôlant la viscosité ou les paramètres viscoélastiques du liquide (voir utilisation de PEG au § 4.3.3).

Configuration statique sous écoulement :

Sous écoulement, la vitesse du fluide est comprise entre 2.10^{-4} m/s et 4.10^{-4} m/s (vitesse imposée au fluide dans la cavité de détection lors de nos travaux). La condition de non glissement impose toujours $v_3=0$. Comparée à la vitesse de l'onde acoustique, de l'ordre de 5 km/s, le fluide en mouvement dans la cavité peut être considéré comme immobile au-dessus de l'interface. Aussi, les résultats précédents resteront valables dans ce cas.

2.3.2. Application des modèles de Navier-Stokes aux dispositifs de détection de bio-organismes

Cette partie vise à exploiter les éléments théoriques précédents pour étudier et tenter d'expliciter les comportements des liquides et des espèces étudiés, en fonction des différentes conditions expérimentales. Plusieurs types de dispositifs expérimentaux en PDMS (dont la réalisation est détaillée au chapitre 3), permettant différentes configurations nécessitant la mise en place de protocoles de détection adaptés (détaillés au chapitre 4) seront utilisés pour réaliser des tests en configurations hydrostatique et hydrodynamique.

Pour la configuration hydrostatique, chaque puce comporte deux réservoirs d'analyse ouverts (250 µL chacun) dans lesquels les liquides à étudier sont déposés à l'aide d'une micropipette. Pour la configuration hydrodynamique, les puces sont équipées de deux chambres de faibles épaisseurs (de 3mm à 100µm pour des volumes de l'ordre de 25 à 1,5 µL) dans lesquelles les liquides à étudier sont injectés et mis en circulation avec un débit contrôlé. Par la suite, les abréviations PHS et PHD seront utilisées respectivement pour les protocoles hydrostatique et hydrodynamique, ce symbole étant suivi du chiffre désignant la version de la puce utilisée.

Nous allons utiliser les équations de Navier-Stokes afin de comparer qualitativement et quantitativement les différents types de géométries. Cela nous permettra de mettre en évidence les phénomènes prépondérants mis en jeu dans nos dispositifs et surtout les mécanismes susceptibles d'être négligés, ceci afin d'apporter des simplifications analytiques pertinentes.

Lors de ces travaux, la température était régulée et nous avons utilisé des fluides réels incompressibles sous écoulement stationnaire:

- masse volumique constante : ρ = Cte,
- divergence de la vitesse nulle (écoulement isovolumique),
- variations temporelles des vitesses nulles : $\partial V_i / \partial t = 0$.

En configuration microfluidique, les échelles, les vitesses et les quantités de liquide imposent des conditions sur les nombres adimensionnés :

- $1/Fr \to 0$: les forces d'inertie sont beaucoup plus grandes que les forces de pesanteur,
- E_u >>1 : les forces de pression sont plus grandes que les forces inertielles,
- R_e <<1 : les forces d'inertie sont beaucoup plus faibles que les forces de viscosité,
- P_e <<1 : les transferts de chaleur dus à la convection sont plus importants que ceux dus à la diffusion.

À partir des équations (2- 41), nous obtenons alors:

$$\begin{aligned} &\textit{Continuité}: && \frac{\partial V_j}{\partial x_j} = 0 \\ &\textit{Dynamique}: && 0 = -\frac{\partial P}{\partial x_i} + 2\frac{\partial(\mu S_{ij})}{\partial x_j} \\ &\textit{Energie}: && 0 = -\frac{\partial(PV_i)}{\partial x_i} + 2\frac{\partial(\mu S_{ij} V_i)}{\partial x_j} - \frac{\partial}{\partial x_i}\left(\lambda \frac{\partial T}{\partial x_i}\right) \end{aligned} \qquad (2\text{- }61)$$

Soit :

$$\begin{aligned} &\textit{Continuité:} && div\vec{V} = 0 \\ &\textit{Dynamique:} && \overrightarrow{grad}P = \mu\vec{\Delta}\vec{V} \\ &\textit{Energie:} && 0 = \frac{\partial(\sigma_{ij} V_i)}{\partial x_i} - \frac{\partial q_i}{\partial x_i} \end{aligned} \qquad (2\text{- }62)$$

2.3.3. Dispositifs pour configuration statique

2.3.3.1. Principe du dispositif

Pour les mesures effectuées avec le protocole statique, nous utiliserons la cellule PHS1 (Figure 2-8) comptant quatre cavités de protection des IDTs et deux chambres d'analyse, chacune de 17 mm^2 pour une hauteur de 14 mm. Pour rappel les volumes utilisés sont de 250µL par cavité.

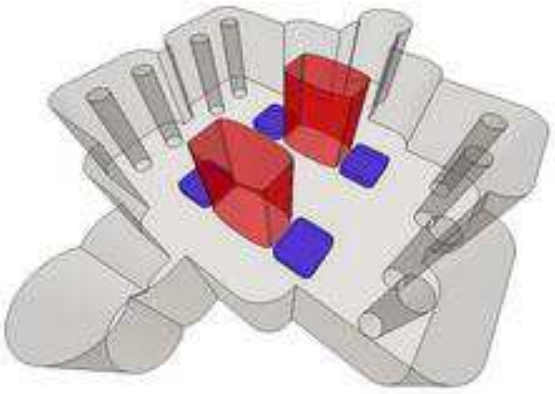


Figure 2-8 Cellule PDMS PHS1 utilisée pour le protocole statique comportant deux réservoirs de 250µL et quatre cavités d'air protégeant les IDTs de chaque transducteur.

En statique, la cellule de mesure est régulée en température à l'aide d'un bac à sable thermostaté ou d'un système de régulation intégré (résistance chauffante sérigraphiée sur plaque d'alumine et Pt 100 intégrée dans la puce de PDMS pour la mesure de température). Deux étapes peuvent être définies dans cette configuration: l'injection des liquides comportant les espèces à étudier et la diffusion des espèces vers la surface sensible fonctionnalisée.

2.3.3.2. Détermination des temps de diffusion et d'advection en configuration statique

La détermination puis la comparaison des temps de diffusion et d'advection va nous permettre d'évaluer le temps de mélange effectif des espèces dans la chambre d'analyse, afin de connaître son impact sur la dynamique globale du capteur.

Lors de l'injection, une certaine quantité de mouvement est transmise au fluide. L'énergie ainsi injectée à l'échelle de la cellule (quelques mm) permet de générer des tourbillons de plus en plus petits, jusqu'à une échelle limite où l'énergie des tourbillons est absorbée par la viscosité. Ainsi l'énergie injectée à la plus grande échelle, L_0, transite d'échelle en échelle de manière inertielle jusqu'à la plus petite échelle possible, η, celle de la dissipation visqueuse. Cette cascade d'énergie est nommée cascade de Kolmogorov et la plus petite échelle atteinte est l'échelle de Kolmogorov, noté η_K. Ces deux échelles extrêmes sont reliées par la relation suivante :

$$\frac{L_0}{\eta_K} = R_e^{\frac{3}{4}} \qquad (2\text{-}63)$$

Dans notre configuration, le liquide utilisé étant de l'eau, ρ=1000 kg.m^{-3}, μ=1.10^{-3} kg.m^{-1}.s^{-1}. L'injection typique d'un volume de 125 μL en une seconde à partir d'un cône ayant une ouverture de 1 mm^2 de section, permet de calculer la vitesse d'éjection du liquide, V_0, de l'ordre de 16.10^{-2} m.s^{-1}. Une échelle caractéristique du système de l'ordre du millimètre, permet d'estimer le nombre de Reynolds dû à l'injection et l'échelle de Kolmogorov associée :

$$R_e = \frac{\rho V_0 L_0}{\mu} = \frac{1000 \times 16.10^{-2} \times 1.10^{-3}}{1.10^{-3}} = 160$$

$$\eta_K = \frac{L_0}{R_e^{\frac{3}{4}}} \approx \frac{10^{-3}}{160^{\frac{3}{4}}} \approx 20\mu m \qquad (2\text{-}64)$$

L'échelle limite des tourbillons dans notre système est de 20 µm. La puissance injectée à une certaine échelle ξ est fonction de la vitesse V_ξ du fluide à cette même échelle, elle est de l'ordre de :

$$\Pi_\xi \approx \frac{V_\xi^3}{\xi} \qquad (2\text{- }65)$$

Les temps de diffusion (transport de matière dû à l'agitation thermique) et d'advection (transport de matière par le courant) de cette énergie à l'échelle ξ sont respectivement de l'ordre de :

$$\tau_D\big|_\xi \approx \frac{\xi^2}{\upsilon} \quad et \quad \tau_A\big|_\xi \approx \frac{\xi}{V_\xi} \qquad (2\text{- }66)$$

En général, le temps de diffusion est plus grand que le temps d'advection, l'advection étant le phénomène le plus efficace pour dissiper l'énergie. Pour notre dispositif, l'échelle caractéristique ξ est le cm (ξ=1.10^{-2} m). On dispose d'une cavité de test d'un volume total de 250µl, comportant 125µL d'une matrice de TBS, dans laquelle sont injectés à la pipette et en 2 secondes, 125 µL d'une solution de test de TBS (de viscosité cinématique ν=1.10^{-3} m^{2}s^{-1}) comportant les espèces biologiques à détecter. Le diamètre de sortie du cône de pipette est de 500µm, ceci correspond à un cylindre de liquide de 0,318 m de hauteur, soit une vitesse d'éjection V_ξ de 0,159 m.s^{-1}, nous permettant d'obtenir les valeurs suivantes :

$$\tau_D \sim 0{,}1 \text{ s} \quad \text{et} \quad \tau_A \sim 6 \text{ ms}$$

Ainsi, le fluide injecté est totalement mélangé dès la fin du processus d'injection à la pipette, grâce au phénomène d'advection. Le système a en quelque sorte perdu la mémoire de l'injection à la pipette au bout de quelques millisecondes seulement. La détection se déroulant sur un temps de plusieurs ordres de grandeur supérieur au temps τ_A, nous pouvons considérer qu'à l'origine des temps de la détection le volume liquide est homogène et que la diffusion est le seul phénomène de transport après la seconde d'injection. De plus le système est régulé en température. En configuration statique nous avons donc un système purement diffusif où la migration des espèces est régie par la loi de la diffusion. La distance parcourue par les espèces en régime diffusif suit la loi temporelle suivante :

$$d_{Diff} = \sqrt{D.t} = \sqrt{\frac{\alpha t}{\mu r}} \quad avec \quad \alpha = \frac{k_B T}{6\pi} \qquad (2\text{- }67)$$

Avec *r* le rayon de la particule diffusante. Il faut noter que ces calculs nous donnent un ordre de grandeur des temps de diffusion et d'advection en milieu liquide: à chaque injection à la pipette, un même utilisateur ne pourra pas reproduire les mêmes conditions de vitesse, de pression et de hauteur d'injection du fluide.

2.3.3.3. Remarque sur la diffusion et le mélange

En général le mélange au sein d'un liquide s'effectue d'une part par diffusion et d'autre part grâce aux instabilités hydrodynamiques et à la turbulence générée à haut nombre de Reynolds. Sous écoulement microfluidique, le nombre de Reynolds est très faible, les écoulements sont laminaires et il n'est plus possible de générer le mélange par les instabilités hydrodynamiques et la turbulence. Les forces d'inertie étant négligeables par rapport aux forces de viscosité, le mélange s'effectue par diffusion. La diffusion trouve son origine dans la différence de concentration entre espèces et l'agitation thermique, d'où le terme de diffusion brownienne.

2.3.4. Dispositifs pour configuration dynamique millifluidique

2.3.4.1. Principe du dispositif

Afin de pouvoir réaliser des tests en régime dynamique permettant de toujours être en milieu liquide quelles que soient les étapes à effectuer, nous avons mis au point un deuxième type de cellule en PDMS comportant des chambres d'analyse closes avec des canaux d'arrivée et de sortie des liquides (Figure 2-9).

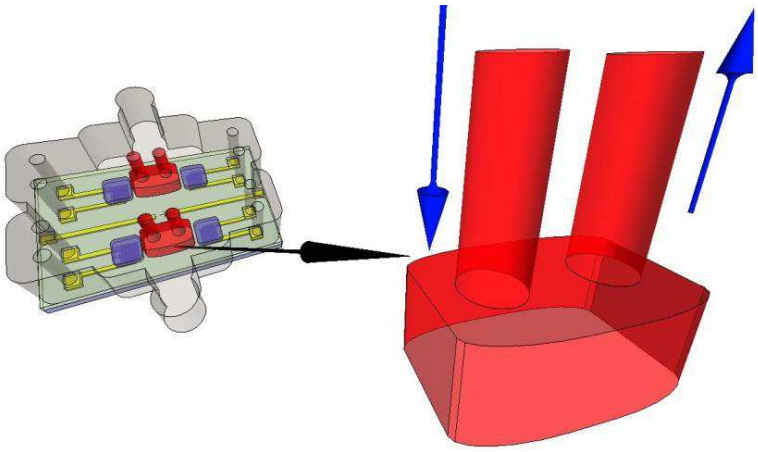


Figure 2-9 Cellule PDMS PHD1 utilisée pour le protocole statique comportant deux réservoirs de 5µL, avec les canaux d'arrivée et de sortie des liquides et quatre cavités d'air protégeant les IDTs de chaque transducteur.

Cette configuration permet d'avoir des avantages sur la configuration statique citée précédemment. Le premier avantage est la disparition des perturbations mécaniques en surface du capteur qui provoquaient fréquemment des sauts de fréquence en régime statique (contact du cône de pipette, transition air-liquide-air lors des nettoyages). Le second avantage est un contrôle des conditions de dépôt des liquides: la vitesse des fluides est contrôlée de manière précise, selon le diamètre d'injection des seringues. Un troisième avantage est lié à la miniaturisation de la chambre d'analyse, d'un volume de 4 à 5 µL, soit 50 fois moins important par rapport au volume de la chambre d'analyse de la cellule utilisée en régime statique. Ce dernier point constitue un intérêt dans la mesure où ce faible volume d'échantillon peut être considéré comme représentatif pour l'application visée.

Ainsi, la cellule en régime dynamique permet d'obtenir une grande reproductibilité des tests, un suivi plus rigoureux grâce à la réduction des sauts de fréquences dus aux perturbations mécaniques, un volume utile de la chambre d'analyse plus petit et un confinement plus efficace des liquides au niveau de la surface du capteur.

2.3.4.2. Circulation en « U », écoulement à vitesse constante

Dans ce type de dispositif, nous avons observé expérimentalement des zones importantes de recirculation de liquide, l'écoulement adoptant un profil en U. Si bien qu'en proche paroi au niveau du capteur, la vitesse d'écoulement est quasiment nulle. Expérimentalement, nous avons filmé ce phénomène: nous avons successivement injecté, à un débit de 250µL/min, de l'eau colorée et de l'eau non colorée. Le liquide est injecté dans un coin de la cavité et ressort par le coin opposé. Après avoir complètement rempli la cavité avec le premier liquide coloré, nous avons procédé au nettoyage de la cavité et observé un écoulement en forme de U et une absence de circulation du liquide à la base de la cavité et au niveau des deux autres coins ne servant pas à l'injection.

Des simulations post expérimentales nous donnent les mêmes résultats, exposés sur la Figure 2-10. Ces résolutions ont été réalisées avec un débit de 25µL/min. Les simulations montrent que les vitesses de déplacement du liquide sont très faibles, avec un maximum de $6 \mu m.s^{-1}$. Nous pouvons voir sur la Figure 2-10-a, l'absence de mouvement du liquide à la base de la cavité soit au niveau de la surface du capteur ; à cet endroit, le mécanisme de transport des espèces est régi par la diffusion des espèces, avec une composante advective quasi inexistante.

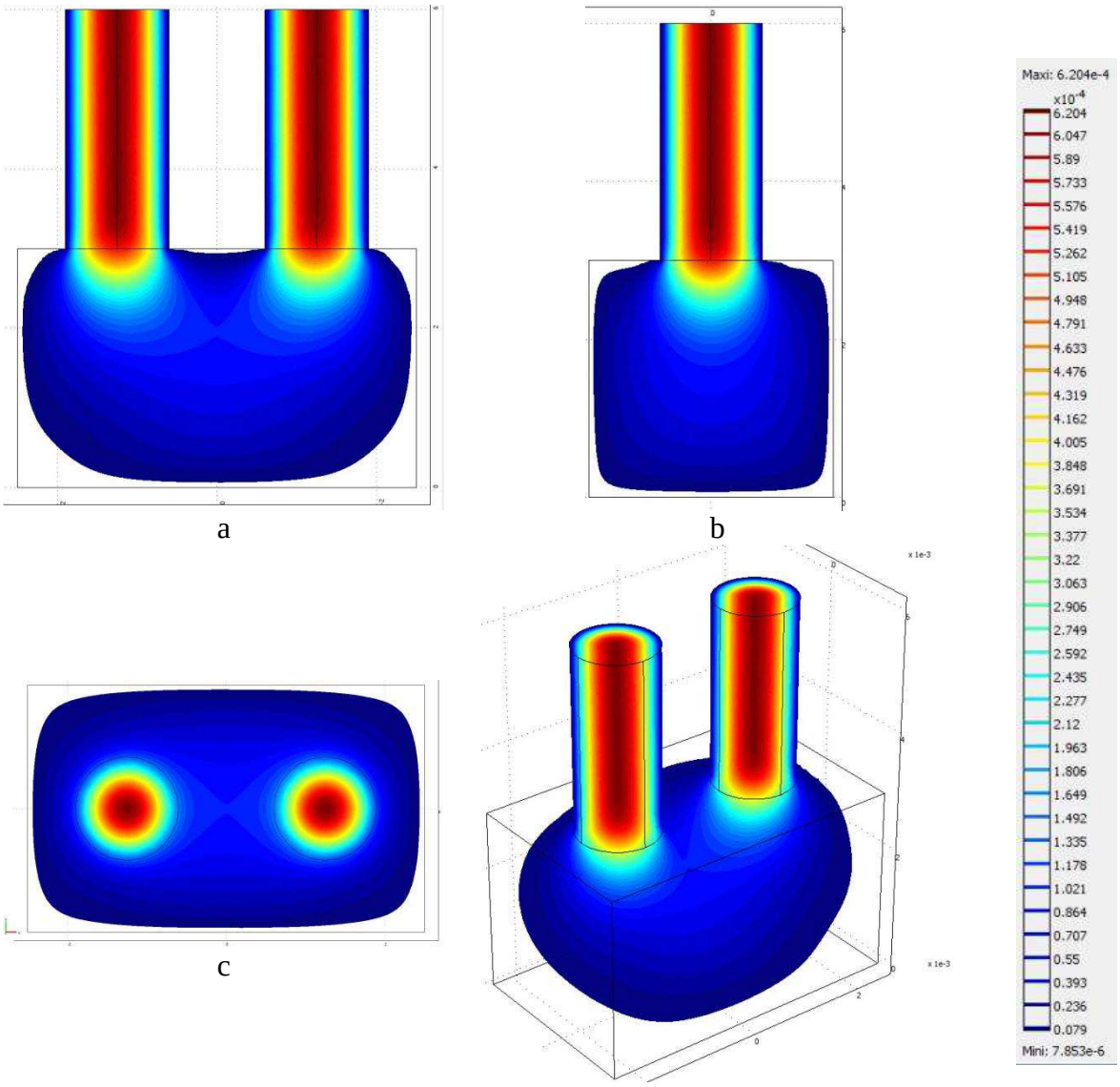


Figure 2-10 Simulation des écoulements dans la cavité millifluidique de 3 mm de hauteur
a : vue de face, b : vue de gauche, c :vue de dessus, d :vue isométrique
Les vitesses sont indiquées en $m.s^{-1}$
27797 mailles, ~72 secondes de calcul

Pour conserver les débits d'écoulement et augmenter la vitesse de l'écoulement, il est nécessaire de réduire la hauteur de la cavité. Une simulation de l'écoulement avec une hauteur de cavité fixée à 250 µm permet d'observer un écoulement plus homogène dans la cavité ainsi qu'une augmentation de la vitesse. De plus, dans cette simulation, nous observons cette fois-ci que le fluide est sous écoulement au niveau de la paroi et peut atteindre dans la cavité 66% de la vitesse maximale du liquide, comme nous pouvons le constater dans la Figure 2-11.

Pour alléger les simulations, nous avons coupé la cavité en deux parties symétriques et réalisé les calculs sur une seule. On retrouve aussi, le profil parabolique typique des vitesses dans une cavité (Figure 2-11c) et d)).

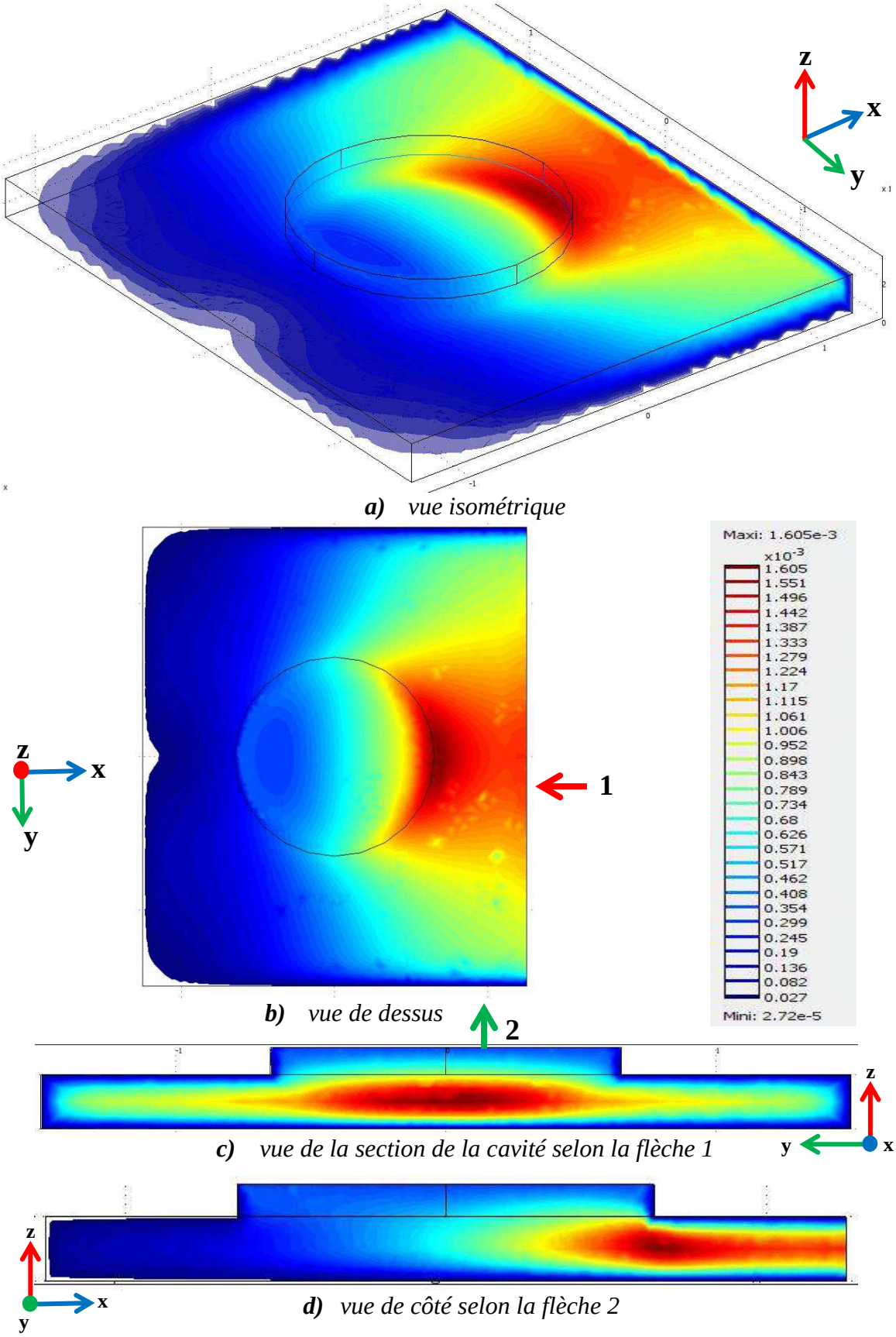


Figure 2-11 Simulation des écoulements dans une cavité microfluidique de 250µm de hauteur. 504254 mailles, ~6 heures de calcul

2.3.5. Dispositifs avec réseaux microfluidiques

2.3.5.1. Principe du dispositif

Le dispositif microfluidique est l'évolution logique du dispositif millifluidique. Comme nous avons pu le constater dans le cas de la cavité simple de 250 µm de hauteur, le fait de réduire la hauteur de la cavité permet d'augmenter la vitesse de l'écoulement et favorise celui-ci à la surface du capteur. Cependant il reste à améliorer davantage l'écoulement, notamment, de diminuer les gradients de vitesse dans la cavité. Pour cela, dans la continuité de l'amélioration des cellules PDMS, nous avons mis au point une cellule PDMS microfluidique, nommée PHD2. Dans cette cellule la chambre d'analyse est remplacée par un réseau microfluidique comportant une chambre d'analyse et des réservoirs (Figure 2-12). Pour confiner davantage le liquide à la surface du capteur, nous avons encore diminué la hauteur de la chambre d'analyse; pour générer un écoulement homogène des liquides, nous avons mis au point des structures tridimensionnelles permettant de créer un système purement advectif. De plus, notre dispositif étant régulé en température, cette configuration permet un bon transfert thermique, du fait de l'épaisseur très faible du réseau microfluidique (100µm à quelques centaines de micromètres). L'entrée du réseau microfluidique se situe avant les réservoirs microfluidiques et la sortie, après la chambre d'analyse. Chaque ligne comporte plusieurs réservoirs qui pourraient être utilisées dans le cadre de notre application pour une étape d'incubation des bactéries.

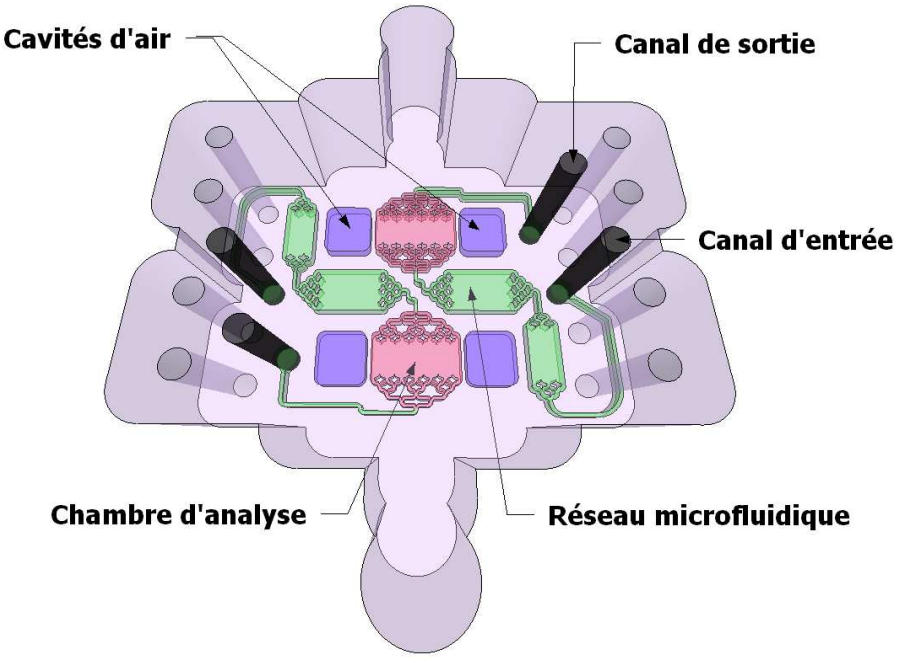
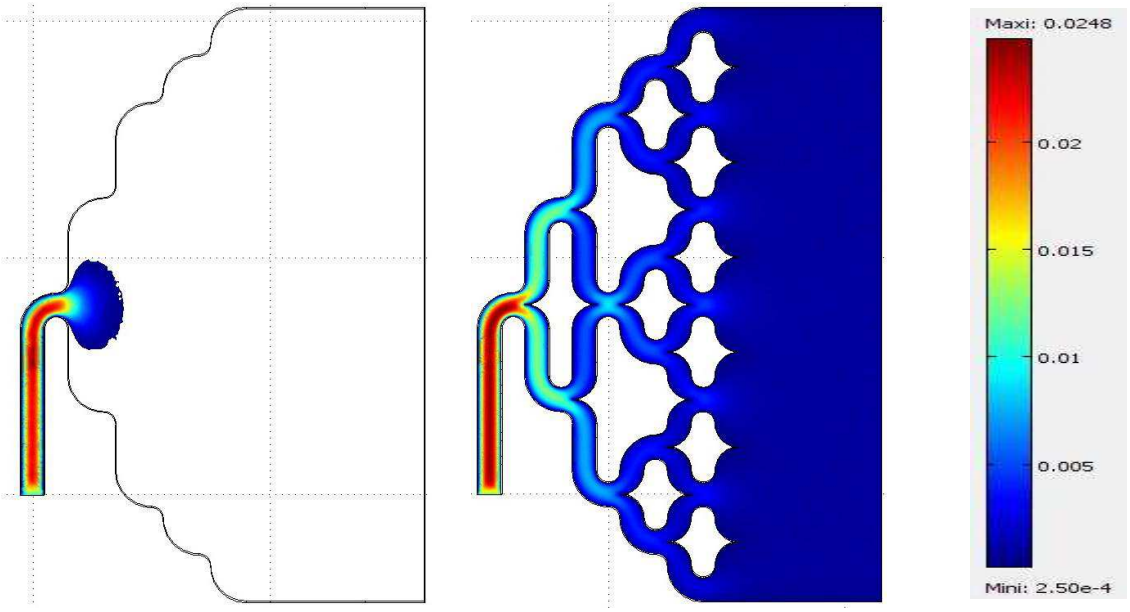


Figure 2-12 Puce PDMS PHD2 avec les deux réseaux microfluidiques

2.3.5.2. Avantages de la puce PHD2 à réseaux microfluidiques

Nous avons également réalisé des tests avec des liquides colorés et avons observé un écoulement très homogène dans la cavité principale et aucune zone dite "morte" (sans écoulement de liquide). Ces simulations montrent une homogénéité des écoulements améliorée par rapport à la cellule millifluidique de 250 µm de hauteur, comme nous pouvons le constater sur la Figure 2-13-b. Sur cette même figure sont représentés les profils des vitesses avec la même cavité, respectivement sans éléments de bifurcation et avec éléments de bifurcation. Nous pouvons constater que la géométrie que nous avons choisie permet d'augmenter la vitesse moyenne des liquides dans la cavité et de diminuer le gradient de vitesses dans la cavité. De plus cette géométrie offre un autre avantage, elle évite toute zone de recirculation du liquide ainsi que toutes zones mortes pouvant ralentir ou empêcher les interactions au niveau de la surface du capteur. Ainsi, nous obtenons une meilleur efficacité d'écoulement, et donc d'interactions, sur la totalité de la surface du capteur. Ceci permet d'accroitre la surface utile du capteur.



a b

Figure 2-13 Simulation des écoulements dans une cavité microfluidique de 200µm de hauteur et 5 mm de largeur, coupe ne représentant que les vitesses comprises entre 1% de la vitesse maximale de l'écoulement et 100% de la vitesse maximale de l'écoulement.

a : vue de dessus du dispositif sans élément de bifurcation

b : vue de dessus du dispositif avec éléments de bifurcation

105541 mailles, ~2 heures de calcul

Pour la chambre de détection, en négligeant les forces de frottement, et étant donné le débit constant de liquide, la vitesse du fluide est divisée entre l'entrée du réseaux et la chambre de mesure. Le réseau (Figure 2-14) évite toute zone de recirculation du liquide et permet de réduire très sensiblement le gradient de vitesse au sein de la chambre par 25 grâce à la diminution de la vitesse à chaque division du réseau. De plus, les profils ont été choisis pour minimiser les pertes de charges ζ. Ces pertes, associées au passage du liquide d'une section A_1 vers une section A_2, avec $A_1<A_2$, sont définies par la formule de Bélanger :

$$\zeta_{A_1 \to A_2} = \alpha \frac{V^2}{2} \qquad (2\text{- }68)$$

Avec

$$\alpha = G\left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right)^2 \qquad (2\text{- }69)$$

G étant une fonction dépendante de l'angle d'ouverture de la division du canal. Dans notre cas, étant donnée la forme des canaux, nous avons α ~ 0,04, on peut alors négliger ces pertes de charges.

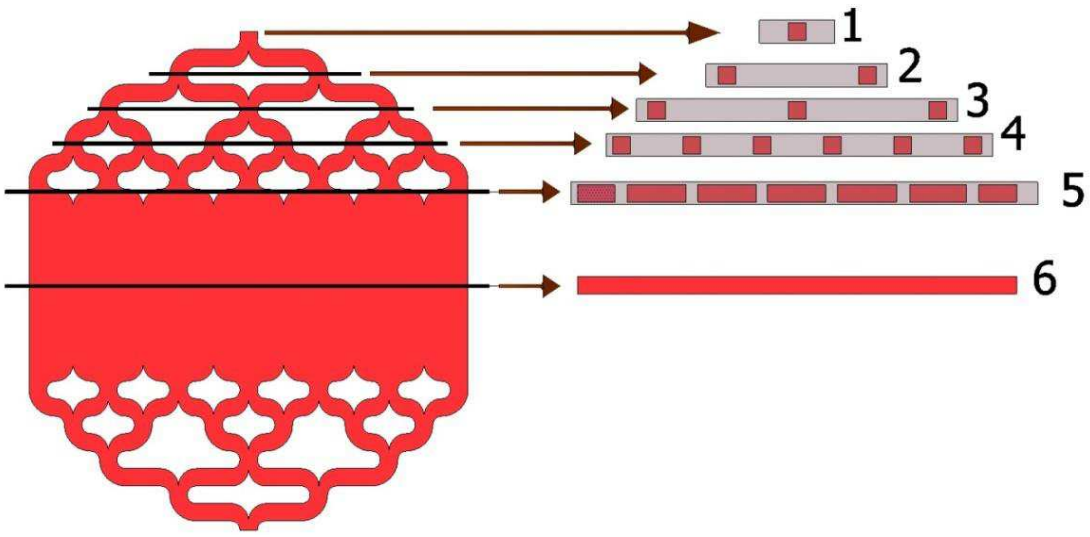


Figure 2-14 Élargissements successifs de la section d'écoulement

2.3.5.3. Bilan de quantité de mouvement en microfluidique

Pour étudier le bilan dynamique avec les réseaux microfluidiques, il est nécessaire de distinguer les différents types d'écoulements en fonction de la géométrie de la puce microfluidique, représentée avec ces différentes zones sur la Figure 2-12.

Dans notre cas, deux types d'écoulement peuvent être distingués :

- En canalisation : la section d'écoulement est très petite par rapport à sa longueur.
- En réservoir : après le passage des bifurcations.

Écoulement en canalisation:

Sur le plan dynamique, la relation liant la vitesse du fluide à la pression appliquée (voir relation dynamique *(2- 61)*) s'écrit:

$$\vec{\Delta V} = \frac{1}{\mu}\overrightarrow{grad P} \qquad (2\text{- }70)$$

En étant dans le repère quelconque de la Figure 2-15 ceci revient à résoudre l'équation de l'écoulement selon l'axe *x*, la vitesse dépendra donc des variables *y* et *z*.

Les conditions aux limites sont $V(y,z)=0$ pour $y=\pm w/2$ et $z=\pm b/2$. Ceci revient à résoudre une équation de Poisson avec des conditions aux bords de Dirichlet. En utilisant un développement en séries de Fourier selon la direction *y* on obtient **[164]**:

$$V(y,z) = -\frac{4}{\mu w}\frac{\partial P}{\partial x}\sum_{n=1}^{\infty}\frac{(-1)^{n+1}}{\beta_n^3}\left(1-\frac{ch\beta_n z}{ch\beta_n \frac{b}{2}}\right)\cos(\beta_n y) \quad ; \quad \beta_n = (2n-1)\frac{\pi}{w} \qquad (2\text{- }71)$$

En introduisant Q_v, le débit volumique tel que

$$Q_v = \int_{-w/2}^{w/2}\int_{-b/2}^{b/2} V(y,z)\,dydz \qquad (2\text{- }72)$$

Nous obtenons :
$$Q_v = -\frac{8b}{\mu w}\frac{\partial P}{\partial x}\sum_{n=1}^{\infty}\frac{1}{\beta_n^4}\left(1-\frac{2}{\beta_n b}th\beta_n\frac{b}{2}\right) \qquad (2\text{- }73)$$

Ou encore **[164]**
$$Q_v = -C(\chi)\frac{b^3 w}{\mu}\frac{\partial P}{\partial x} \qquad (2\text{- }74)$$

$C(\chi)$ étant une fonction dépendant du rapport $\chi = w/b$ **[164]**, telle que représentée sur la Figure 2-16. L'intérêt de $C(\chi)$ est d'obtenir une approximation de l'ordre de 90% de la valeur du débit sans passer par une résolution complexe de la relation (2- 73). On le verra par la suite, ce rapport permettra d'évaluer les débits pour d'autres géométries d'écoulement.

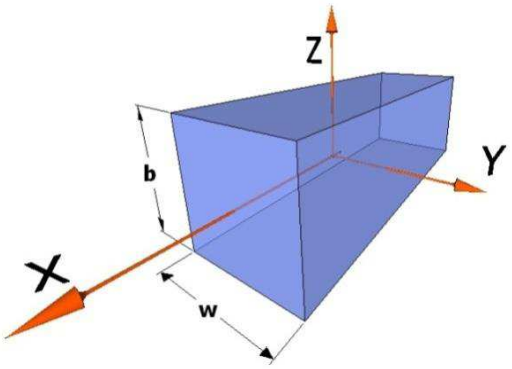


Figure 2-15 Configuration de l'écoulement microfluidique en canalisation

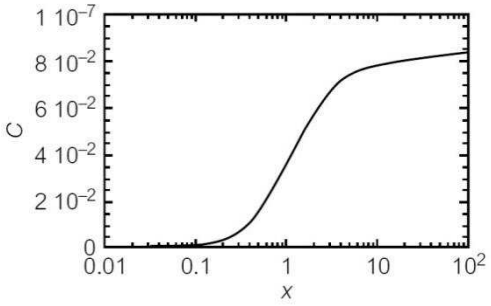


Figure 2-16 Variation de la fonction C(χ) en fonction du rapport $\chi = \frac{w}{b}$ ***[164]***

Si ***w*** est de l'ordre de *b*, comme c'est le cas pour la Figure 2-15, χ vaut 1 et $C(\chi)$~0,035, soit, pour le débit :

$$Q_v \approx -0,035 \frac{b^3 w}{\mu} \frac{\partial P}{\partial x} \qquad (2\text{- }75)$$

Ainsi, cette expression du débit sera valable lorsque le mouvement du fluide est dû à une variation de pression ΔP appliquée au système sur une longueur de canalisation L_x, comme c'est le cas pour nos dispositifs.

Écoulement en cavité:

Lorsque le liquide traverse des cavités, caractérisées par une hauteur de canal b très petite devant la largeur *W* et la longueur *Lx*, le modèle de la cellule de Hele-Shaw (Figure 2-17) permet d'obtenir une formulation exacte de la vitesse de l'écoulement le long de l'axe z, soit, à faible nombre de Reynolds **[164]** :

$$V(x,y,z) = \frac{3}{2}\left(1 - \frac{4z^2}{b^2}\right) V(x,y) \qquad (2\text{- }76)$$

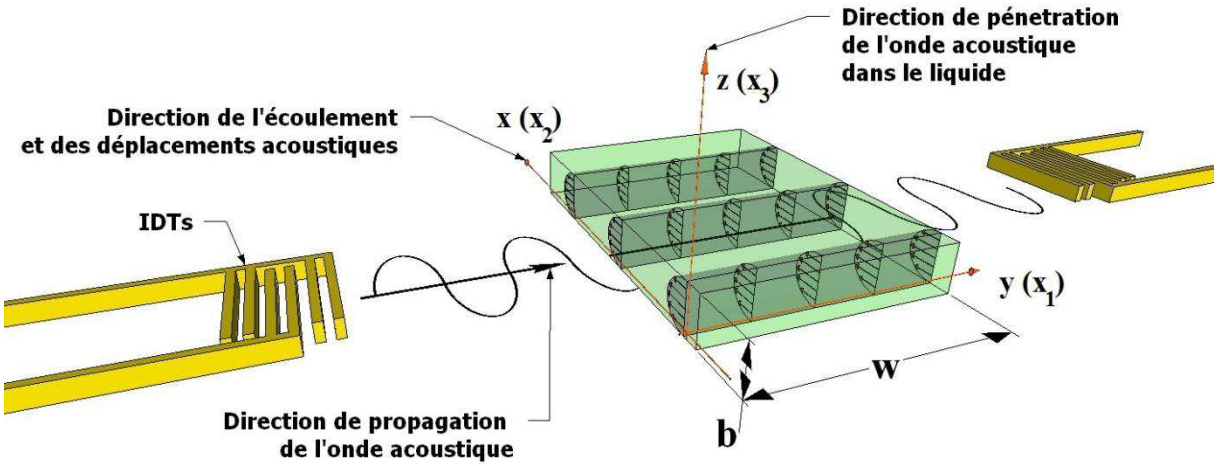


Figure 2-17 Cellule de Hele-Shaw, de largeur W_{HS} et de hauteur b, avec un profil des vitesses de poiseuille dans la direction de l'écoulement, perpendiculaire à la direction de propagation de l'onde acoustique

V(x,y) représente la vitesse sur le plan (*x,y*) à la hauteur *z* considérée et vaut:

$$V(x,y) = -\frac{b^2 \nabla P}{12\mu} \qquad (2\text{- }77)$$

Cette relation est la loi de Darcy, elle signifie que le profil des vitesses dérive d'un potentiel proportionnel à la pression.

En injectant la relation (2- 77) dans l'équation (2- 76), l'expression du profil des vitesses dans la cavité de Hele-Shaw devient :

$$V(x,y,z) = \left(\frac{4z^2 - b^2}{8\mu}\right) \overrightarrow{grad}\left[P(x,y)\right] \qquad (2\text{- }78)$$

Étant donné que l'écoulement s'effectue le long de l'axe *x*, le gradient de pression est selon cet axe, la vitesse dépend alors de *z* selon l'expression :

$$V(z) = \left(\frac{4z^2 - b^2}{8\mu}\right) \frac{\partial P}{\partial x} \qquad (2\text{- }79)$$

Le débit dans la cellule vaudra donc :

$$Q_V = \int_{-w/2}^{w/2} dy \int_{-b/2}^{b/2} V(z)dz = w\frac{\partial P}{\partial x}\int_{-b/2}^{b/2}\left(\frac{4z^2 - b^2}{8\mu}\right)dz \qquad (2\text{- }80)$$

Soit :
$$Q_V = \frac{wb^3}{12\mu}\frac{\partial P}{\partial x} \qquad (2\text{- }81)$$

2.3.5.4. Bilan thermique en microfluidique

En microfluidique, la longueur de pénétration thermique Lct (longueur telle que la température de consigne est atteinte sur la totalité de la section du canal) est donnée par la relation suivante, avec la géométrie de la Figure 2-18, et en utilisant la relation (2- 67) de l'énergie:

$$L_{ct} \approx \frac{1}{16}\frac{Vb^2}{\kappa} \qquad (2\text{- }82)$$

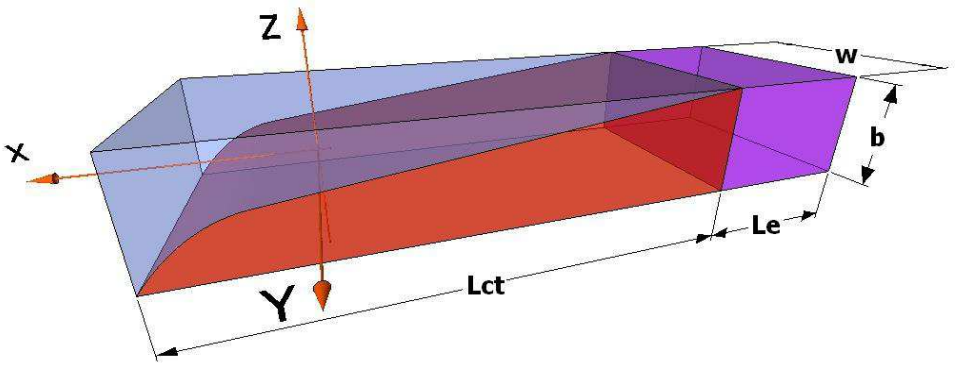
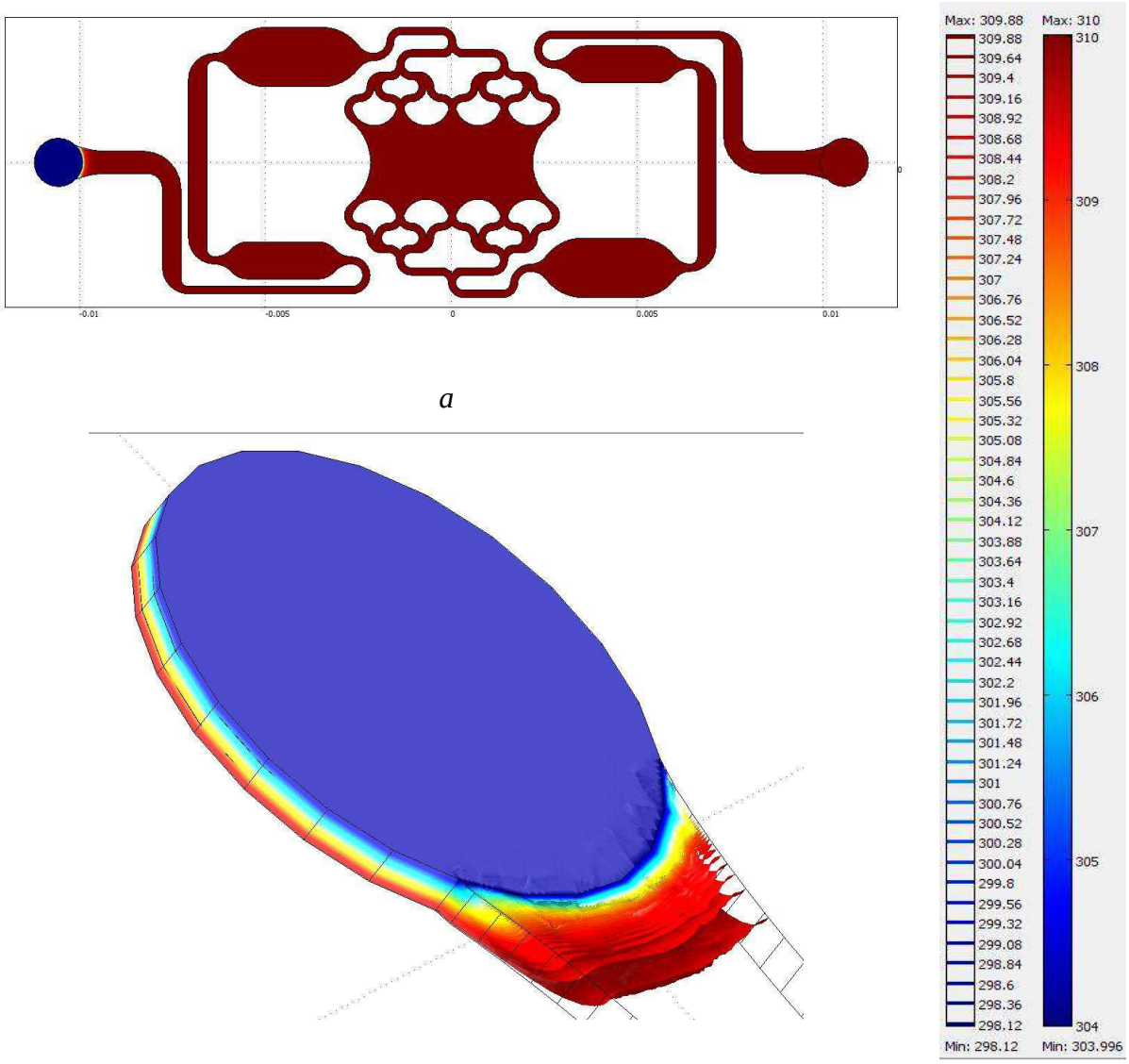


Figure 2-18 Longueur de pénétration thermique

Dans notre configuration cette longueur est de l'ordre de 250µm, ce qui signifie que les liquides sont à la température de consigne dès leur entrée dans le réseau microfluidique. Ainsi la configuration microfluidique permet de réguler rapidement la température des liquides et de manière efficace. Ceci est démontré par les simulations de l'évolution de la température sous écoulement, obtenues pour une puce PHD2 intégrant des réseaux microfluidiques (Figure 2-19), avec une température de consigne de 37° C, un débit de 25 µL/min, et un liquide initialement à 25 °C.

Ceci peut permettre par exemple d'introduire séparément des espèces biologiques et de les incuber efficacement grâce à une température contrôlée et au réseau de réservoirs du circuit.



a

b

Figure 2-19 Simulation du gradient thermique obtenue dans le réseau microfluidique de 200µm de hauteur avec un écoulement à 25µL/min d'un liquide initialement à 298 K (25°C) et avec une consigne à 310K (37°C) à la base du réseau microfluidique (a: vue d'ensemble du réseau, b: zoom sur l'entrée du réseau)

250701 mailles, ~4 heures de calcul

2.4. Conclusion

Finalement, nous sommes partis du cadre théorique général de la mécanique des fluides pour converger vers un cadre théorique adapté et simplifié pour la compréhension des conditions expérimentales et l'amélioration des systèmes utilisés. Cet ensemble d'éléments théoriques et les simulations ont ainsi permis de déterminer les profils des vitesses et des températures pour chaque type de puce PDMS.

Sur un plan dynamique, en partant des cellules PHS1, où le liquide est au repos et où le déplacement des espèces est gouverné par la diffusion, nous sommes passés à la cellule PHD1, permettant une configuration dynamique dans la partie supérieure de la chambre d'analyse. Cependant, cette configuration ne permettant pas d'imposer un régime dynamique dans la totalité de la chambre d'analyse, nous avons développé une cellule microfluidique avec une géométrie efficace en termes de mise en mouvement des liquides dans la totalité de la cavité de test et d'homogénéisation de leurs vitesses. Ceci permet d'obtenir une cellule de test efficace et adaptée à notre étude pour amplifier de manière significative les interactions de surface entre les espèces à détecter et le biorécepteur.

Sur un plan thermique, du fait de la diminution progressive de l'épaisseur des liquides et l'intégration d'un système de régulation en température, nous avons obtenu un volume de test nous permettant d'atteindre en quelques secondes, une température de liquide homogène dans tout le réseau microfluidique, et ceci, même sous écoulement. L'épaisseur de liquide est si fine en configuration microfluidique, qu'il n'y a pas de gradient de température. De fait, cette approche a abouti à la détermination d'une géométrie particulièrement efficace sur le plan dynamique des liquides ainsi que pour la maîtrise de leur température sous écoulement.

Ainsi, comme nous le verrons dans les chapitres suivants, les concepts théoriques n'auront cessé de conforter nos élaborations techniques, tout en validant nos tests d'expérimentation; ils participent également à une meilleure compréhension de la cinétique des phénomènes physiques et des interactions biologiques en milieu liquide.

3. Plateforme de détection à ondes de Love avec puces milli et microfluidiques

3.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous allons d'abord décrire la géométrie et les caractéristiques électriques et électromagnétiques de la plateforme de transduction utilisable en milieu liquide. Ensuite nous présenterons la chaîne électronique d'amplification dans laquelle est insérée la plateforme de détection et permettant d'obtenir les conditions d'oscillation nécessaires au fonctionnement du capteur. Nous continuerons en détaillant la mise au point des différentes puces PDMS caractérisées par des géométries spécifiques selon la nature et l'échelle de l'écoulement désiré. Nous montrerons l'impact des différentes géométries sur les réponses électriques de la plateforme de transduction sous air, eau déionisée et tampon salin, en régime hydrostatique ou hydrodynamique et verrons dans quelles mesures les différentes géométries apportent des réponses en termes d'isolation électromagnétique et d'étanchéité. Nous finirons par décrire le banc de mesure utilisé pour le greffage des anticorps et la détection de bactéries *E. coli*.

3.2. Le capteur à ondes de Love

3.2.1. Géométrie du capteur à ondes de Love

Les dispositifs à ondes de surface sont réalisés en collaboration avec la plateforme technologique du LAAS-CNRS, situé à Toulouse, dans le cadre du réseau national RENATECH pour la Recherche Technologique de Base (RTB). Typiquement, 14 capteurs sont réalisés simultanément sur un substrat de quartz de 4 pouces. Le capteur à ondes de Love utilisé lors de nos travaux est constitué de deux lignes à retard (Figure 3-1), constituées

chacune de deux transducteurs, émetteur et récepteur. Le transducteur d'entrée génère l'onde acoustique (ou élastique) par effet piézoélectrique inverse, tandis que le transducteur de sortie transforme de nouveau cette onde mécanique en signal électrique, par effet piézoélectrique direct.

Chaque transducteur est composé de 44 paires d'électrodes interdigitées (IDTs) (Figure 3-1-A) et de deux plots de contacts r (Figure 3-1-B).La périodicité spatiale des électrodes (ou doigts), λ, est de 40 µm. Chaque doigt est dédoublé : la largeur d'une électrode et l'espacement entre chaque électrode valent λ/8, soit 5µm. L'ouverture des transducteurs, *W*, est de 40 λ.

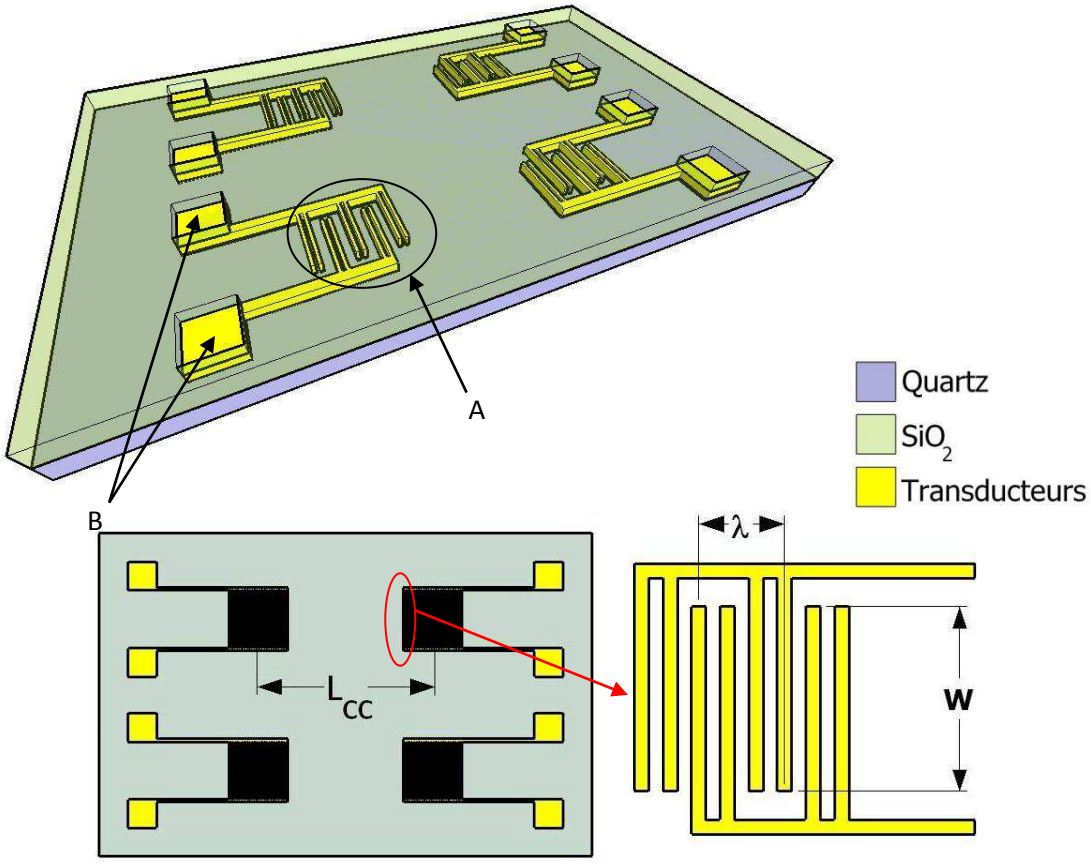


Figure 3-1 Capteur à ondes de Love. Les doubles IDTs permettent d'éviter les réflexions de Bragg entre les transducteurs

Les IDTs sont constitués de deux couches minces en Titane/Or déposées par évaporation sur un substrat de quartz, de coupe cristallographique AT (angles d'Euler :0°, 121.5°, 90°), choisie pour générer une onde purement transverse horizontale. Une surépaisseur Titane/Or est assurée au niveau des contacts électriques. Une couche de SiO_2 (4 à 5 µm d'épaisseur) est ensuite typiquement déposée par PECVD (Plasma Enhanced Vapor Deposition), technique permettant d'assurer un dépôt à basse température (environ 300°C), indispensable pour

conserver le caractère piézoélectrique du quartz. Puis, cette silice est gravée chimiquement, après une nouvelle étape de photolithographie, pour dégager les contacts électriques. L'épaisseur totale du capteur est de 500 µm. La fréquence propre d'oscillation des capteurs ainsi réalisés est proche de 117 MHz.

Plusieurs générations de dispositifs ont été réalisées et des améliorations du procédé ont été proposées suite aux difficultés technologiques rencontrées, notamment lors du dépôt par PECVD, et ce, malgré de grandes précautions de manipulation. Une nouvelle conception a également été réalisée en vue de minimiser le risque de défauts. Avant leur première utilisation les dispositifs sont limés, notamment pour minimiser l'influence de réflexions sur les bords, puis nettoyés pour enlever la résine de protection, ils sont ensuite caractérisés électriquement à l'analyseur de réseau et, en montage oscillateur, à l'analyseur de spectre temps réel.

3.2.2. Choix de la couche guidante

Des dispositifs, tels que ceux préalablement existant, et tels que représentés ici, ont été mis à disposition et utilisés dans le cadre de ces travaux. Il est à noter que pour transmettre efficacement l'onde acoustique entre les transducteurs, le choix de la couche guidante est primordial. La mise au point de nouvelles couches guidantes, qui fait l'objet d'un point d'étude dans le cadre du projet ANR global, vise à constituer une alternative intéressante, susceptible d'offrir des améliorations en termes de facilité de réalisation (reproductibilité, état de surface) et sensibilité, au-delà de l'augmentation de sensibilité espérée **[165-166-167-168]**.

Notre application visant la détection de micro-organismes, plusieurs critères, biologiques, mécaniques et électriques, doivent être pris en compte, en particulier, la couche guidante doit être :

- stable et inerte en milieu liquide,
- biocompatible,
- réutilisable,
- fonctionnalisable,
- résistante aux contraintes mécaniques et chimiques,
- électriquement stable durant plusieurs utilisations.

Un autre paramètre déterminant est ainsi la possibilité de fonctionnaliser la surface pour obtenir une couche bioréceptrice intimement liée, elle-même stable et efficace. Ces éléments dépendent notamment de la nature et de l'état de surface de la couche guidante.

Concernant la sensibilité à l'effet de masse, La Figure 3-2 **[168]** représente les valeurs maximales obtenues théoriquement en supposant négligeables les pertes par propagation en fonction de la masse volumique et du module de transverse de rigidité *G* de la couche guidante. Cette sensibilité est définie ici par :

$$S_m^{V_p} = \frac{\Delta V_p}{V_{p0}} \cdot \frac{A}{\Delta m} \qquad (3\text{-}1)$$

Où ΔV_P est une variation de vitesse par rapport à une vitesse de phase initiale V_{P0}, due à une augmentation de masse Δm rigidement immobilisée sur la surface d'interaction *A* du capteur (chemin de propagation de l'onde).

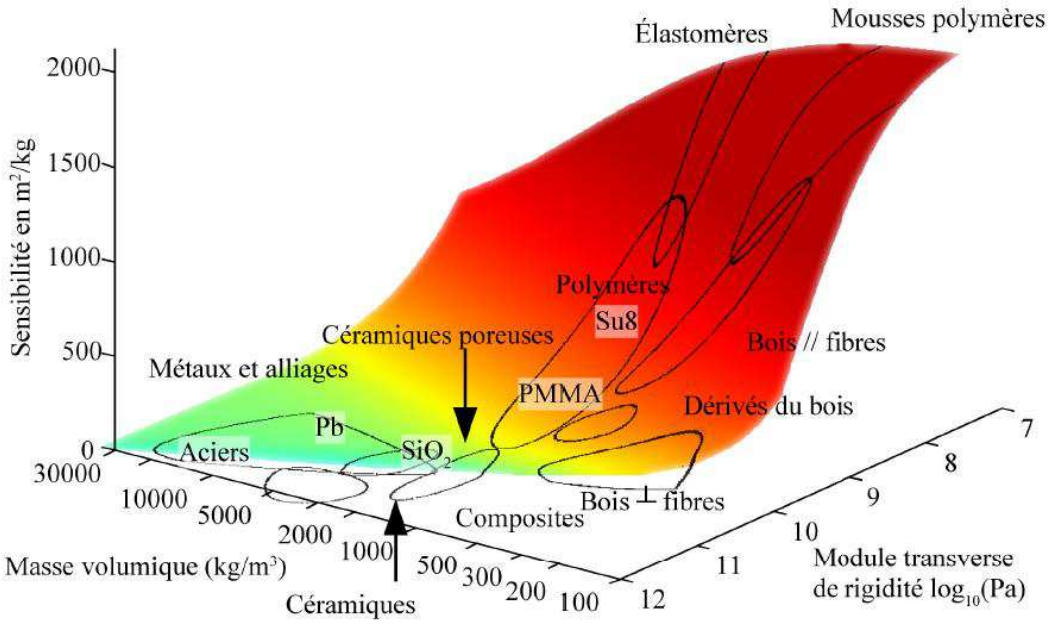


Figure 3-2 Simulation de la sensibilité à l'effet de masse maximale de certains matériaux en fonction de la masse volumique et du module transverse de rigidité de la couche guidante, sans prise en compte des pertes de propagation (substrat de quartz, angles d'Euler (0°, 121.5°, 90), IDTs périodicité λ=40µm, couche guidante d'épaisseur h= 4µm) ***[168]***

Seuls les couples de valeurs (ρ, η) sur cette courbe permettent d'obtenir les conditions de propagation de l'onde de Love. Ces études théoriques semblent montrer que certains matériaux, de type polymère, comme le PMMA (polyméthacrylate de méthyle) ou la résine SU8 utilisée en microélectronique, pourraient permettre une meilleure sensibilité. Cependant, en vue de favoriser d'autres critères, notamment le contrôle du dépôt de la couche bioréceptrice en surface, il a été décidé de conserver la silice comme matériau guidant et d'élaborer des protocoles de greffage permettant d'assurer des liaisons covalentes stables, avec

des anticorps récepteurs. Parallèlement, une étude a été menée par nos collègues chimistes, visant à la synthèse de matériaux organosiliciés avec pour objectif de réunir plusieurs avantages, tant en termes de sensibilité, que de contrôle du biorécepteur. Aussi, cette étude a été entièrement réalisée sur la base de couches en silice. Les solutions proposées seront évidemment compatibles avec de nouveaux matériaux de type organosiliciés qui s'avéreraient intéressants.

3.2.3. La chaîne électronique de conditionnement: configuration en oscillation

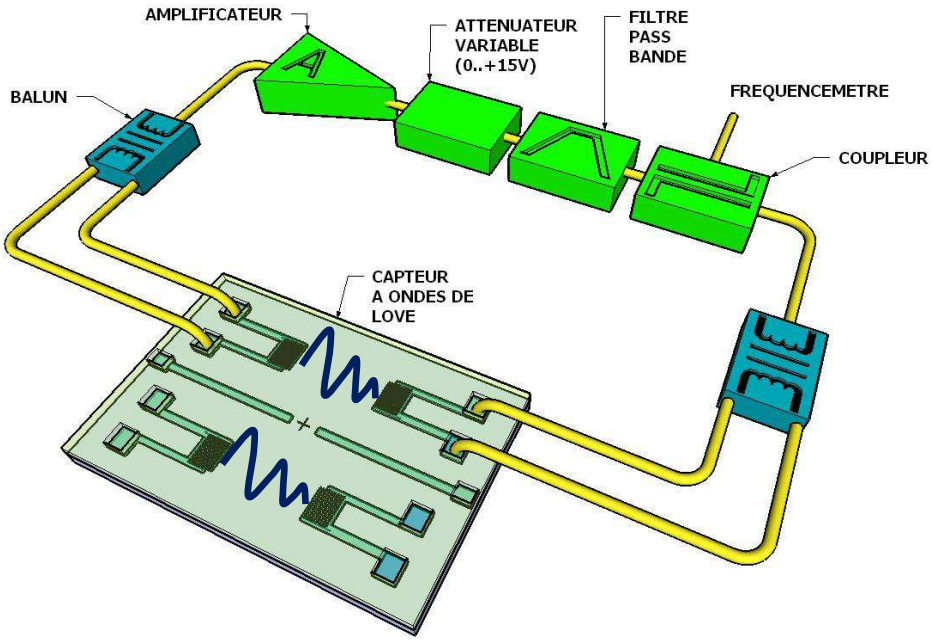


Figure 3 -3 Schéma du montage en oscillateur d'une ligne à retard

L'analyseur de réseaux permet d'obtenir des informations complètes sur les différentes caractéristiques électriques du capteur (paramètres S_{ij} en fonction de la fréquence et dans le domaine temporel), les contacts étant réalisés à l'aide de cellules de test équipées de pointes de touches à ressorts Lorsqu'il s'agit de tests en détection visant des seuils de détection bas et une possibilité de miniaturisation, les lignes à retard sont connectées dans la chaîne de retour d'une boucle amplificatrice (Figure 3 -3) constituant ainsi un oscillateur, dont la fréquence suit un point équiphase du capteur. Des transformateurs à point milieu, ou baluns, sont placés aux entrées et sorties de chaque ligne à retard pour symétriser le signal radiofréquence. Le signal à la sortie de la ligne à retard est amplifié avec une chaîne amplificatrice faible bruit, atténué de manière variable, filtré et un coupleur permet d'en prélever une partie pour en mesurer la

fréquence à l'aide d'un fréquencemètre. Pour plus de détails concernant le dispositif oscillateur le lecteur pourra se référer aux travaux de thèse de *N. Moll* **[169]**. Dans le cadre de ces travaux et afin de réaliser un banc de mesure multicapteurs, de nouvelles cartes d'amplification ont été fabriquées sur lesquelles nous avons apporté un soin particulier, notamment en utilisant un ruban de blindage pour la masse de la carte au boîtier et en privilégiant les connecteurs vissés aux connecteurs sertis.

3.2.4. Sensibilité en fréquence

Le capteur à ondes de Love est sensible à la variation de paramètres à l'interface avec le milieu adjacent, notamment toute variation de masse immobilisée à sa surface. Chaque variation de masse surfacique entraîne une variation de la phase, entraînant à son tour une variation de la fréquence. La phase est reliée à la fréquence selon la relation suivante *(3- 2)* **[170]** :

$$\varphi(f) = kL_{cc} = \frac{2\pi f L_{cc}}{V_p} \qquad (3\text{- }2)$$

La sensibilité du capteur peut être exprimée par une variation relative de vitesse de phase par rapport à la variation d'un paramètre modélisant l'effet lié à la détection, immobilisation d'espèce cible notamment. Ainsi une variation de masse surfacique se traduira par une sensibilité telle que définie plus haut :

$$S_m^{V_P} = \frac{\Delta V_P}{V_{P0}} \cdot \frac{A}{\Delta m} \qquad (3\text{- }3)$$

Cette sensibilité pourra dépendre de multiples paramètres, comme les caractéristiques mécaniques de la solution adjacente. Une variation de ces caractéristiques mécaniques, notamment de la quantité $\sqrt{\mu\rho}$ souvent introduite pour caractériser un fluide visqueux, se traduira par une sensibilité à ce paramètre que nous exprimons :

$$S_{\sqrt{\mu\rho}}^{V_P} = \frac{\Delta V_P}{V_{P0}} \cdot \frac{A}{\Delta\sqrt{\mu\rho}} \qquad (3\text{- }4)$$

Avec μ et ρ, respectivement la viscosité dynamique et la masse volumique.

De manière générale, toute variation relative de vitesse de phase se traduira par une variation relative de fréquence en montage oscillateur. Nous définirons également la sensibilité en fréquence du capteur, comme la variation relative de fréquence par rapport à la variation du paramètre considéré, par exemple pour la masse :

$$S_m^f = \frac{\Delta f}{f_0}\frac{A}{\Delta m} \qquad (3_5)$$

Les variations relatives de phase et de fréquence, et donc de sensibilité correspondantes, sont reliées par un facteur $\frac{V_g}{V_p}$ ou V_g correspond à la vitesse de groupe de l'onde, $\frac{\Delta f}{f_0} = \frac{V_g}{V_p}\frac{\Delta V_p}{V_{p0}}$ et $S_m^f = \frac{V_g}{V_p} S_m^{V_p}$.

3.3. Développement d'architectures PDMS

3.3.1. Introduction

Ce paragraphe traite de la conception et de la réalisation d'architectures de cellules de mesure et de puces en PDMS (fiche de sécurité en annexe B 1) pour la mise en œuvre des protocoles hydrostatique (PHS) et hydrodynamique (PHD) d'utilisation du capteur à ondes de Love :

- Modification de la cellule de mesure initiale et création de la puce PDMS de première génération PHS1, pour utilisation en hydrostatique avec régulation en température.
- Mise au point de la puce PDMS de seconde génération PHS2, utilisée en hydrostatique.
- Mise au point des puces PDMS de troisième génération PHD2, utilisées en hydrodynamique, avec écoulements microfluidiques.
- Mise au point des puces PDMS de quatrième génération, utilisées en hydrodynamique, avec l'introduction des réseaux microfluidiques.

Ces différentes puces seront utilisées comparativement pour des tests de greffage d'anticorps et de détection de bactéries en milieu liquide. Ces tests seront réalisés en régimes hydrostatique (sans mouvement imposé au liquide) et hydrodynamique (avec mouvement

imposé au liquide); ces régimes et leurs protocoles d'application sont détaillés au § 4-5 pour les anticorps et au § 4-6 pour les bactéries *E. coli*. Au préalable, nous présenterons ici des tests préliminaires de validation des puces PDMS effectués à partir de caractérisations à l'analyseur de réseau pour chaque géométrie. Ces caractérisations initiales permettront de vérifier, à partir des paramètres *S* dans les domaines fréquentiel et temporel, le bon fonctionnement du capteur inséré dans la cellule de test, d'un point de vue acoustique, électrique et électromagnétique. Elles seront réalisées sous air, eau déionisée, et tampons salins, et permettront notamment de déterminer deux valeurs caractéristiques pour chaque capteur :

- les pertes par insertion du capteur (paramètre S21), en décibels,
- la fréquence propre d'oscillation de l'ordre de 117MHz.

3.3.2. Cahier des charges des puces PDMS et prototypage

Les différentes géométries des puces PDMS devront permettre plusieurs fonctions :

- délimiter le liquide sur le chemin acoustique,
- aménager des cavités d'air hermétiques au-dessus des IDTs afin d'éviter les perturbations électromagnétiques dues aux espèces chargées en solution dans les liquides ioniques, tout en laissant libre la zone pour la génération et la propagation de l'onde (à partir de la puce PHS2),
- intégrer des fonctions microfluidiques pour le mélange, le tri et l'acheminement des espèces en proche surface du capteur (puces PHD),
- améliorer la régulation thermique du système sous écoulement et en statique.

Pour la fabrication et le prototypage rapide des puces en PDMS, nous avons conçu et réalisé quatre moules. Ces moules permettent d'obtenir des puces PDMS à architectures tridimensionnelles calibrées, prédécoupées, et ajustables sur le capteur ; ces caractéristiques sont essentielles pour obtenir une bonne répétabilité des conditions de tests (température et pression). Ce procédé de fabrication des puces PDMS a été choisi pour sa grande polyvalence dans la réalisation de prototypes. Du fait de son usinage aisé et de sa faible affinité avec le PDMS facilitant le démoulage, l'aluminium a été choisi comme matériau de base des moules. Après conception des moules grâce au logiciel de création 3D ©Google Sketchup PRO 3D, les plans ont été exportés au format DXF vers un robot piloté par ordinateur pour le micro usinage des pièces, autorisant une adaptation rapide aux contraintes mises en évidence lors des expérimentations.

3.3.3. Les puces PDMS pour le protocole hydrostatique

Le protocole hydrostatique a déjà été utilisé lors des travaux de thèse de *N. Moll* [169]. Il consiste à déposer à la micropipette une matrice liquide à l'intérieur du réservoir de test. Durant toutes les étapes de caractérisations et de tests, le fluide reste au repos. La matrice liquide sert de milieu de détection, elle peut être constituée d'eau déionisée ou de l'une des deux solutions de tampons salins (annexe B 1 **- Composés chimiques**), à 0,15M (0,15 mole de sel par litre d'eau déionisée, concentration proche de celle des sels au sein de la cellule: isotonicité) :

- Soit une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline) avec un pH égal à 7. Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium, du phosphate disodique (Na_2HPO_4), du phosphate monopotassique (KH_2PO_4) et un peu de chlorure de potassium.
- Soit une solution de TBS (Tris Buffered Saline) à 0,15M, avec un PH allant de 7,2 à 9. Tris est l'abréviation de tris (hydroxymethyl) aminomethane ($(HOCH_2)_3CNH_2$).

3.3.3.1. Puces PDMS PHS1 pour le protocole hydrostatique de première génération

La différence principale avec les travaux antérieurs **[169]** réside dans la cavité de détection qui n'est plus métallique, mais en PDMS, et qui contient désormais deux chambres d'analyse séparées sur les deux lignes d'un capteur au lieu d'une seule sur l'ensemble du dispositif double (Figure 3-4).

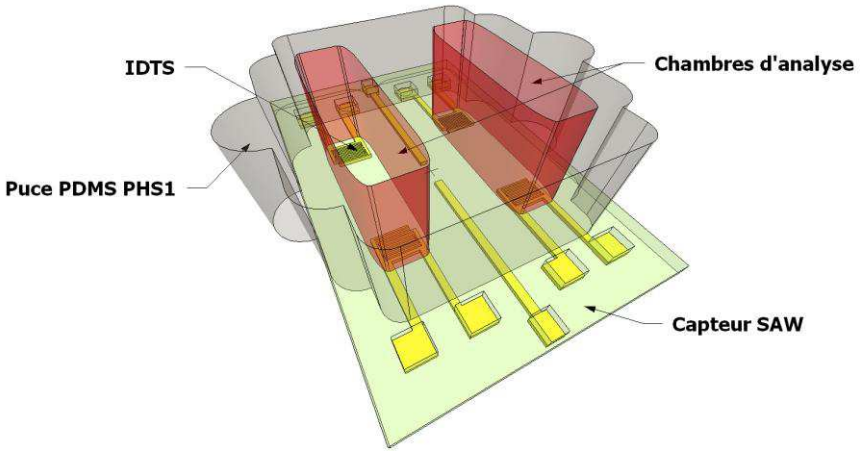
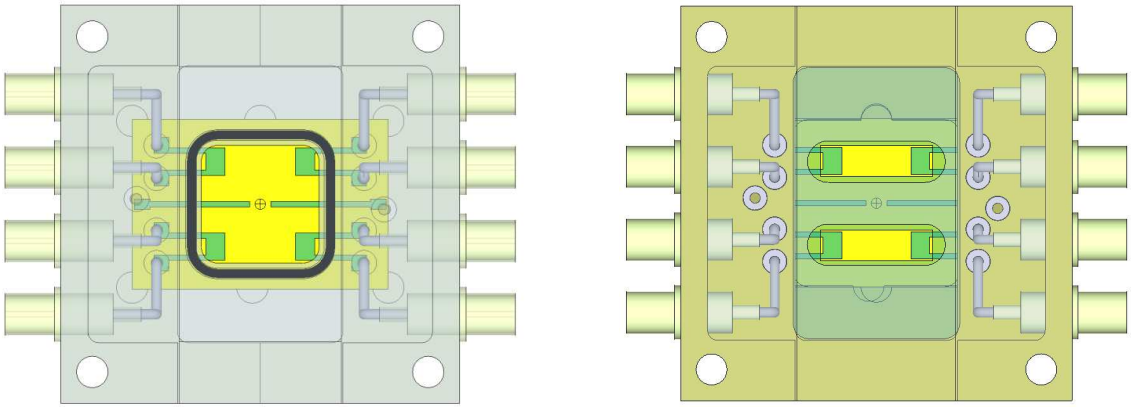


Figure 3-4 Puce PDMS PHS1 posée sur un capteur à ondes de Love

Ces différences permettent de limiter la surface totale de greffage des anticorps, et par conséquent, le volume d'anticorps à greffer, tout en assurant l'indépendance des deux voies de mesure, permettant ainsi la réalisation d'un contrôle sur une voie.

Les différences de surface utiles sont visibles sur la Figure 3-5: la surface de greffage passe ainsi de 130 mm^2 à 30 mm^2. Cependant par souci de comparaison et de représentativité de l'échantillon par rapport à l'application visée (contrôle des eaux de baignade), la même quantité totale de liquide, 500µL, sera répartie dans les deux chambres d'analyse.



(a) *(b)*

Figure 3-5 Comparatif des configurations des cellules de mesure

(a) : Cellule de mesure métallique avec cavité unique utilisée lors des précédents travaux

(b) : Cellule de mesure intégrant les nouvelles puces PHS1 avec cavités séparées

Pour réaliser les puces PDMS PHS1, un moule en aluminium permettant le moulage simultané de quatre puces a été réalisé. Ce moule est constitué de trois éléments : la base, une pièce centrale, et un couvercle (Figure 3-6).

Sur la base du moule en aluminium, quatre groupes de deux plots ont été usinés, ils servent de négatifs pour délimiter la forme intérieure des chambres d'analyses de la puce PDMS. La partie médiane du moule permet de délimiter les contours extérieurs de la puce.

Après avoir soigneusement mélangé et dégazé les deux composants du kit PDMS (base et réticulant du kit Dow Corning Sylgard 184 silicone elastomer, avec un ratio massique base/réticulant = 10/1), le PDMS est coulé dans les cavités formées par l'assemblage de la base et de la pièce centrale du moule. Le couvercle est ensuite fixé et le PDMS en excès est canalisé vers l'extérieur des cavités où il sera retenu dans des chambres prévues à cet effet et permettant le nivelage des puces. Le moule est ensuite placé sur une plaque chauffante et porté à 95 °C pendant 20 minutes. Après refroidissement, il est démonté et les puces sont démoulées.

Ces puces offrent plusieurs caractéristiques intéressantes : elles sont biocompatibles, leur hauteur est calibrée à 10 µm près pour assurer une bonne reproductibilité de la pression lors du serrage de la puce sur le capteur. Pour assurer l'assemblage amovible de la puce PDMS et du capteur, nous avons remplacé le capot de la cellule de mesure préexistante, conçue à partir des travaux de *Josse et Cernosek* **[126]**, par celui représenté sur la vue en éclaté de la Figure 3-7.

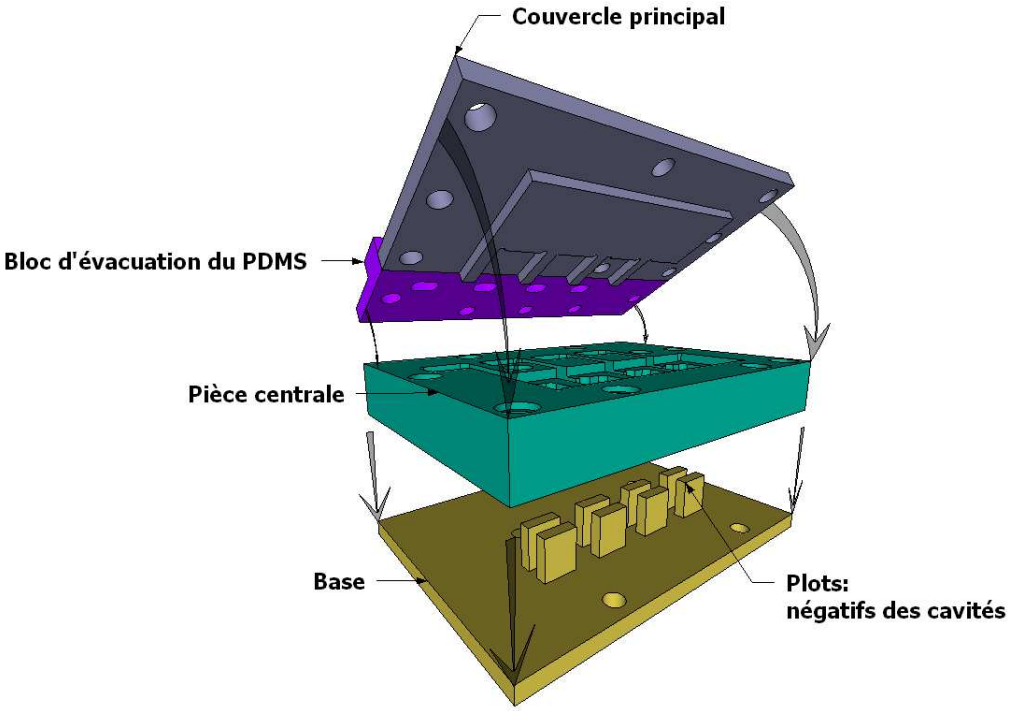


Figure 3-6 Vue du moule en aluminium pour la puce PHS1

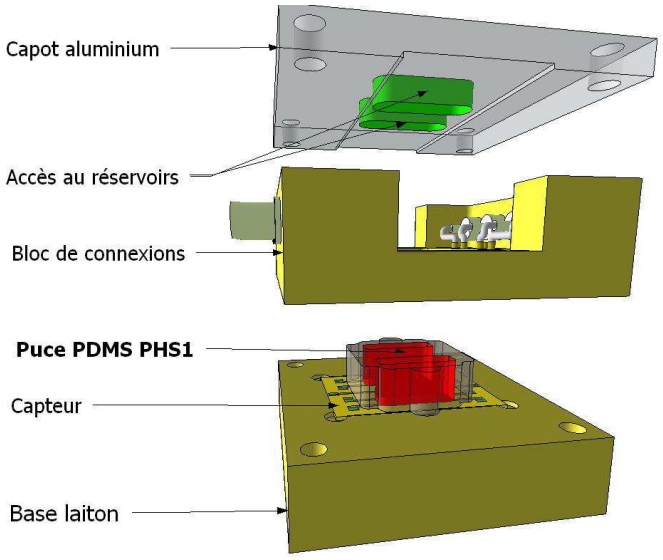


Figure 3-7 Cellule de mesure initiale avec capot en aluminium et puce PDMS PHS1

Désormais, grâce à ces puces, le système (capteur + puce PDMS) est complètement amovible et réutilisable, laissant accessible la surface du capteur pour une partie des étapes de fonctionnalisation hors ligne et de régénération.

Des caractérisations par l'analyseur de réseau des pertes d'insertion en fonction de la fréquence, pour différents milieux d'étude (air, eau déionisée, tampon PBS), ont mis en évidence une dégradation importante du signal (courbe n°3 Figure 3-8) en présence de PBS avec la puce PDMS PHS1 pour le premier protocole hydrostatique (IDTs non protégés).

Les trois profils des pertes par insertion de la Figure 3-8, représentent les réponses obtenues avec les configurations suivantes:

- Courbe 1 : cellule de mesure classique sans puce PDMS et sous air, on peut noter les différents pics dus aux réflexions de l'onde acoustique sur les bords du capteur.
- Courbe 2 : cellule de mesure classique avec puce de PDMS PHS1 sous air, on peut noter la disparition des pics de réflexions aux bords, ils sont absorbés par les parois de la puce PDMS.
- Courbe 3 : cellule de mesure classique avec puce de PDMS PHS1 sous PBS. On constate la nette dégradation du signal, la réponse temporelle (non représentée), confirmant la présence d'un fort pic électromagnétique au détriment du pic acoustique.

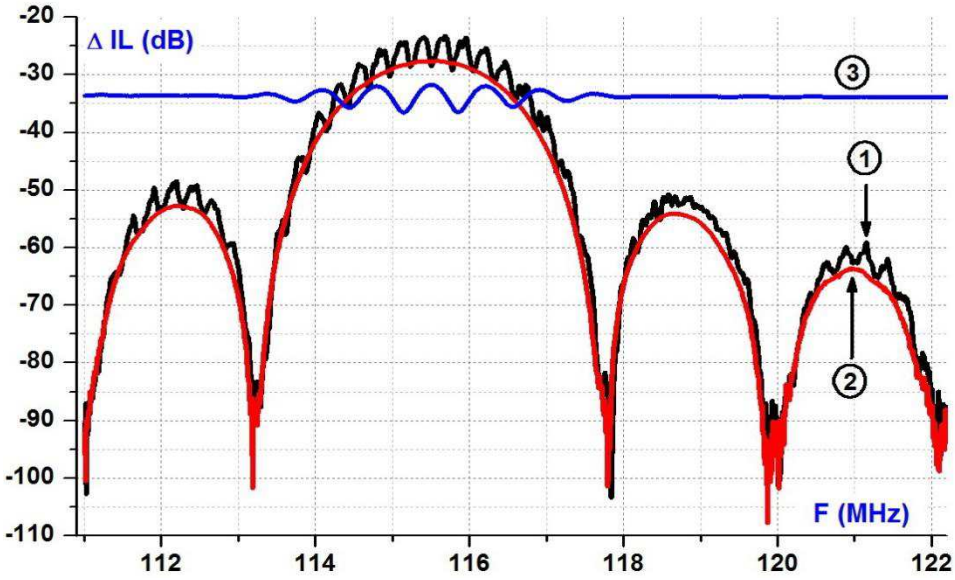


Figure 3-8 : Pertes d'insertion |S21| du capteur

Courbe 1 : sans puce PDMS, sous air

Courbe 2 : avec puce PHS1 sous air

Courbe 3 : avec puce PHS1 sous eau DI ou tampon salin PBS (ou TBS), on observe la dégradation en présence de PBS avec la première puce PDMS PHS1

Ces résultats ont été attribués à la présence d'un liquide conducteur « flottant » électriquement au-dessus des IDTs, sa liaison à une électrode de référence (la « masse ») permettant typiquement de retrouver les courbes en présence d'eau DI (courbe 3, Figure 3-13), comme c'était le cas avec les cellules métalliques initiales.

3.3.3.2. Puces PDMS PHS2 pour le protocole hydrostatique

Ainsi, si les puces PDMS PHS1 sont étanches, en revanche, la présence de liquide conducteur sur la silice au-dessus des IDTs génère de fortes perturbations électromagnétiques rendant le dispositif inutilisable. Pour remédier à ce problème, nous avons modifié la base du premier moule en aluminium afin de créer des cavités d'air isolant la silice au-dessus des IDTs du liquide grâce à des murets de 250µm d'épaisseur, le négatif étant représenté sur la Figure 3-9. Chaque plot initial est ainsi divisé en trois parties :

- un plot central pour la chambre d'analyse,
- deux petits plots de part et d'autre, à 250 µm, pour les cavités d'air protégeant les IDTs.

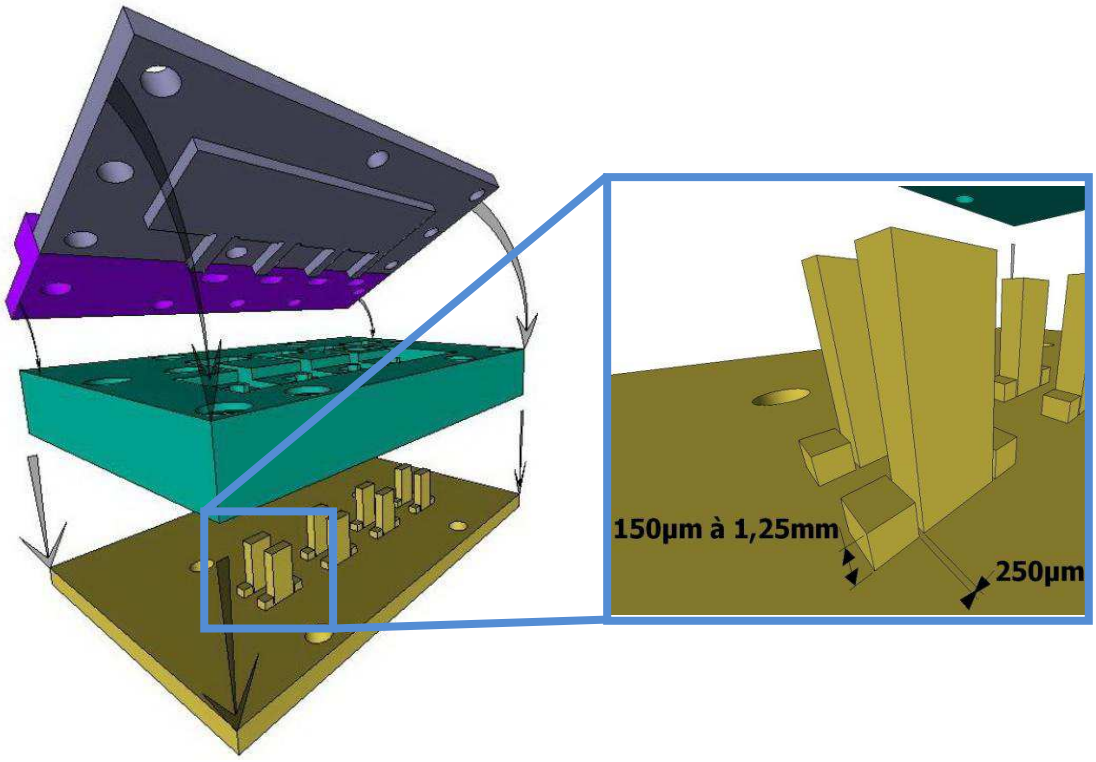
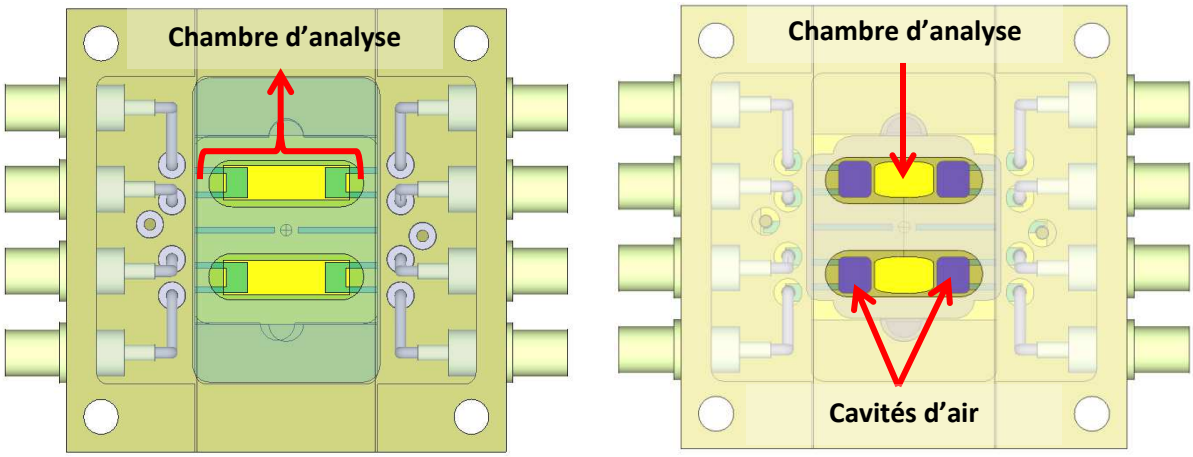


Figure 3-9 Vue du moule à embase modifiée pour la réalisation de puces PHS2

La Figure 3-10 illustre la surface occupée respectivement par les deux puces PDMS PHS1 et PHS2: la surface utile a été divisée de moitié et désormais le liquide est confiné au-dessus

de la zone sensible du capteur. Ce second moule permet ainsi de réaliser les puces PDMS de seconde génération pour le protocole hydrostatique (PHS2).



(a) *(b)*

Figure 3-10 Comparatif des configurations des cellules de mesure ; (a) : cellule de mesure avec puce PDMS PHS1 sans protection des IDTs ; (b) : cellule de mesure avec puce PHS2 intégrant des cavités d'air protégeant les IDTs des perturbations électromagnétiques

Cette modification sur la base du moule a entraîné une adaptation du processus de fabrication des puces. En effet, après dégazage, le PDMS est coulé une première fois jusqu'à noyer complètement les deux plots extérieurs, plus bas, et ensuite chauffé pour réticulation. Cette première étape évite d'emprisonner des bulles d'air dans les fentes entre les plots tout en créant un joint entre la base et le milieu du moule. Une seconde injection de PDMS permet ensuite de compléter les cavités selon un procédé identique au précédent: pose du couvercle avec évacuation du PDMS excédentaire par les colonnes d'échappement, dégazage. Les volumes intérieurs, délimitant les surfaces extérieures et les structures internes des puces PHS2 sont représentés sur la Figure 3-11.

En Figure 3-12 est représentée une puce PDMS PHS2 positionnée sur un capteur. Un élément complémentaire apparaît sur cette représentation. En effet, pour permettre, à terme, une régulation intégrée en température, une sonde de température de type Pt100 est positionnée sur la paroi d'une chambre d'analyse (Figure 3-12 et Photo 3-1). Cette intégration de Pt100 nécessite de nouveau une double étape pour le moulage: une pour fixer la Pt100 dans une base de PDMS (puis réticulation), une autre pour noyer la Pt100 et les plots dans le corps de la puce PDMS, vérifier l'absence de microbulles, puis compléter le remplissage (et seconde réticulation).

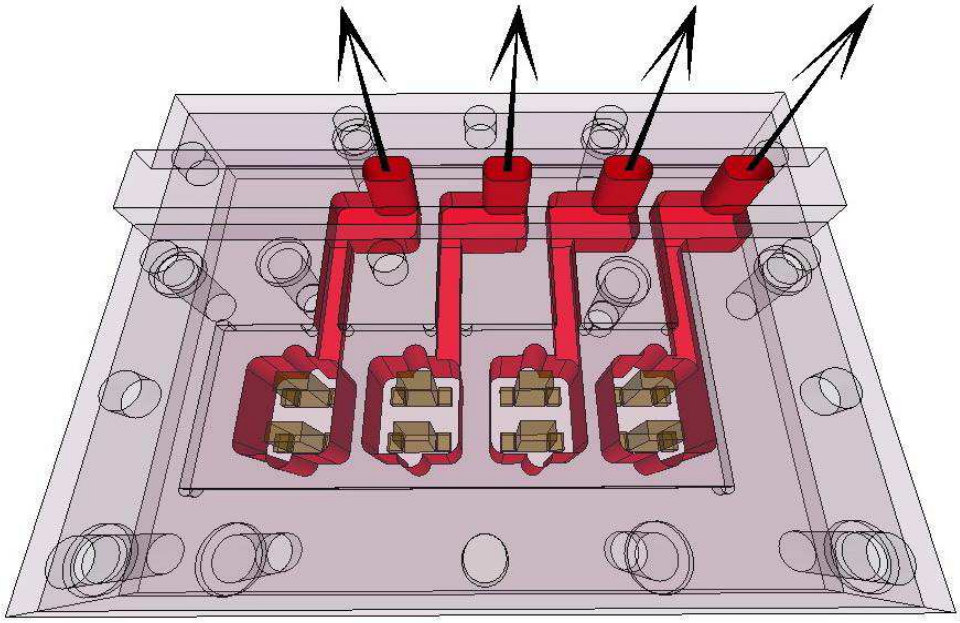


Figure 3-11 Structure des puces PDMS PHS2 avec le second moule

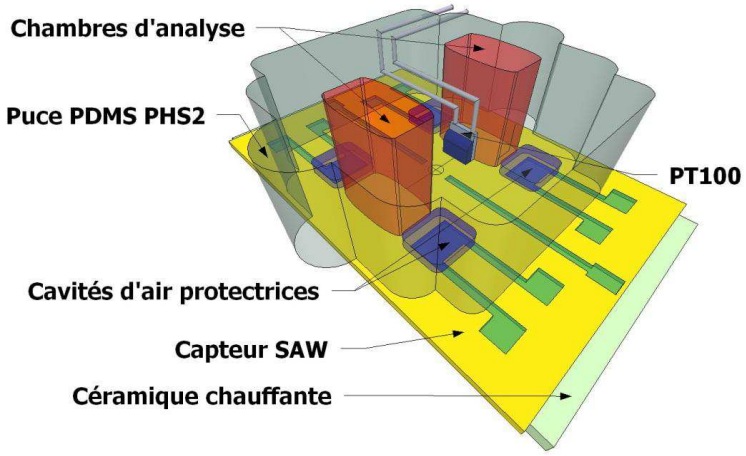


Figure 3-12 Puce PDMS PHS2 sur un capteur

Des puces microfluidiques de ce type avaient déjà été développées en les assemblant par adhésion au capteur **[156-161]**. La difficulté résidait ici dans la mise au point d'un système avec maintien de la puce PDMS par pression, tout en assurant une bonne étanchéité malgré les murs de PDMS de largeur limitée 250 µm pour atténuer l'absorption de l'onde.

La fonctionnalité des puces a pu être validée, en termes d'étanchéité et de compatibilité avec la propagation des ondes acoustiques, après un ajustement de la hauteur des murs, avec un différentiel de 200 µm, pour s'affranchir de phénomènes de fuite par capillarité le long des murs. Des puces opérationnelles, présentant un volume de chambre de 250 µL ont ainsi été obtenues.

Photo 3-1 Puce PDMS PHS2, comportant une sonde PT100 intégrée à la base de l'une des chambres d'analyse

À l'analyseur de réseau, la réponse du capteur en transmission en présence de PBS a été nettement améliorée entre les deux configurations. Là où il y avait une dégradation importante du signal sous PBS avec la puce PDMS PHS1 (courbe n°3 Figure 3-8), on retrouve une réponse classique de bon fonctionnement du capteur dans les mêmes conditions avec la puce PDMS PHS2 (courbe 3 de la Figure 3-13). Les trois profils des pertes par insertion de la Figure 3-13.

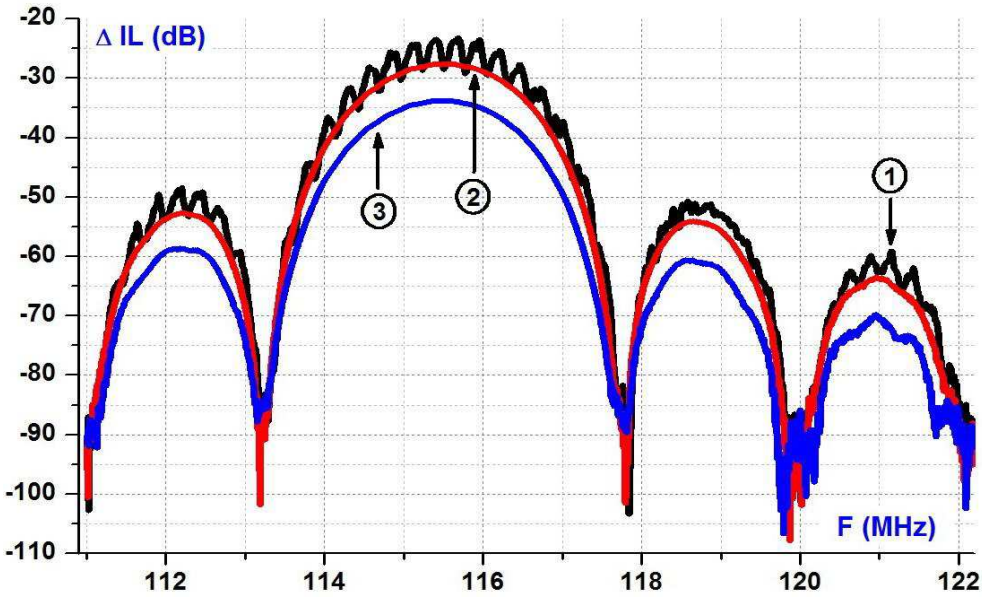


Figure 3-13 Pertes d'insertion |S21| du capteur : bonne réponse en présence de PBS avec la nouvelle puce PDMS PHS2 (IDTs protégés)

Courbe 1 : sans puce PDMS, sous air

Courbe 2 : avec puce PHS2 sous air

Courbe 3 : avec puce PHS2 sous eau DI ou tampon salin PBS (ou TBS)

Ces profils représentent les réponses obtenues avec les configurations suivantes:

- Courbe 1 : cellule de mesure classique sans puce de PDMS et sous air, on peut noter les différents pics dus aux réflexions de l'onde acoustique sur les bords du capteur,
- Courbe 2 : cellule de mesure classique avec puce de PDMS PHS2 sous air, on peut noter la disparition des pics de réflexions, ils sont absorbés par les parois de la puce PDMS PHS2,
- Courbe 3 : cellule de mesure classique avec puce PDMS PHS2 sous PBS. Contrairement au résultat obtenu avec la cellule PHS1, on constate que les pertes obtenues sont comparables à celles obtenues sous air. Ceci démontre l'influence des liquides chargés situés au-dessus des IDTs et la nécessité de garder sous air la surface de silice à ces endroits.

La puce en PDMS PHS2 permet ainsi de retrouver une réponse correcte en présence de PBS. La réduction de surface (limitation à la surface la plus active en termes de sensibilité) permet même de diminuer de 5 décibels les pertes en présence de PBS par rapport à la cellule métallique initiale. Par la suite, des capteurs avec des puces PDMS protégeant les IDTs, seront donc utilisés exclusivement.

Nous avons également effectué des caractérisations à l'analyseur de réseaux avec une base en téflon en remplacement de la base métallique initiale (dispositif détaillé sur la Figure 3-14).

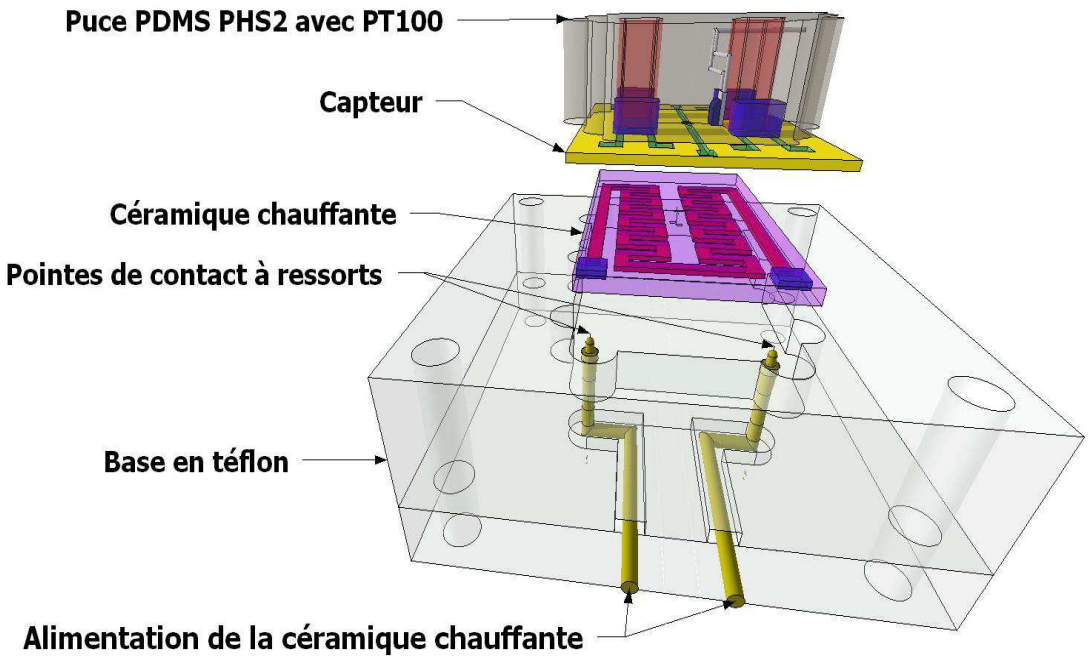


Figure 3-14 Cellule de mesure pour le protocole hydrostatique avec base en téflon pour le chauffage intégré

Cette nouvelle base permet l'intégration d'une céramique équipée d'une résistance chauffante sérigraphiée, alimentée en courant à l'aide de touches de contact à ressort, dans le but d'améliorer de manière sensible la régulation thermique (±0,05 °C), jusque-là réalisée par un bain de sable thermostaté. Le téflon a été choisi comme matériau pour l'usinage de la base, car il permet d'isoler électriquement le circuit chauffant et facilite l'intégration des pointes de contact à ressort.

Des caractérisations à l'analyseur de réseaux ont montré que cette configuration fonctionne, quel que soit le milieu testé, comme on peut le constater sur la Figure 3-15, où sont exposées les pertes par insertion des deux configurations sous air, eau DI (eau déionisée), et tampon salin.

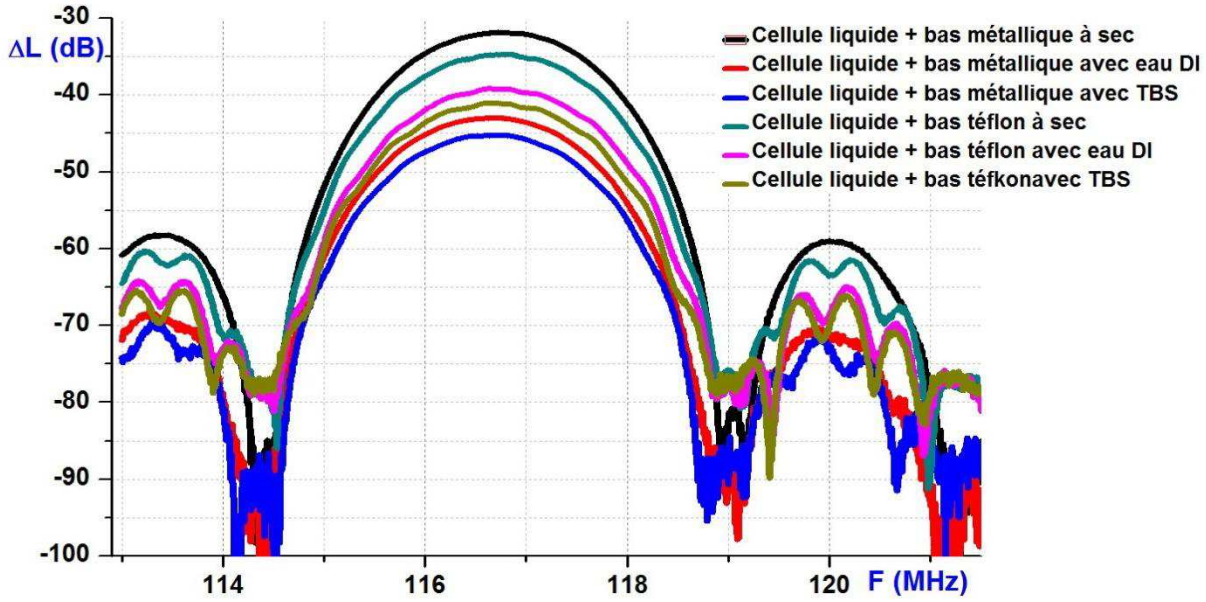


Figure 3-15 Comparatif des pertes d'insertion |S21| du capteur avec base métallique et base en téflon, avec la puce PHS2, sous air, eau DI et tampon salin.

Ainsi, malgré l'utilisation de la base en téflon, le blindage électromagnétique reste suffisamment efficace pour assurer un bon fonctionnement du dispositif.

Les paramètres obtenus dans le domaine temporel (Figure 3-16) permettent de vérifier le bon comportement électromagnétique et acoustique du capteur avec la base en téflon. Cette réponse temporelle en transmission du dispositif de test est obtenue par transformée de Fourier inverse de la réponse fréquentielle à l'aide d'un algorithme de RFFT implémentée dans l'analyseur de réseau.

En effet, comme on peut l'observer sur la Figure 3-16, l'onde électromagnétique est complétement atténuée et son intensité (cercle 1) est négligeable par rapport à celle du pic de

l'onde acoustique (cercle 2). De plus, un seul pic acoustique est observé, l'absence d'échos (zone 3) permet de vérifier que la cellule PDMS absorbe l'onde acoustique hors de la surface utile.

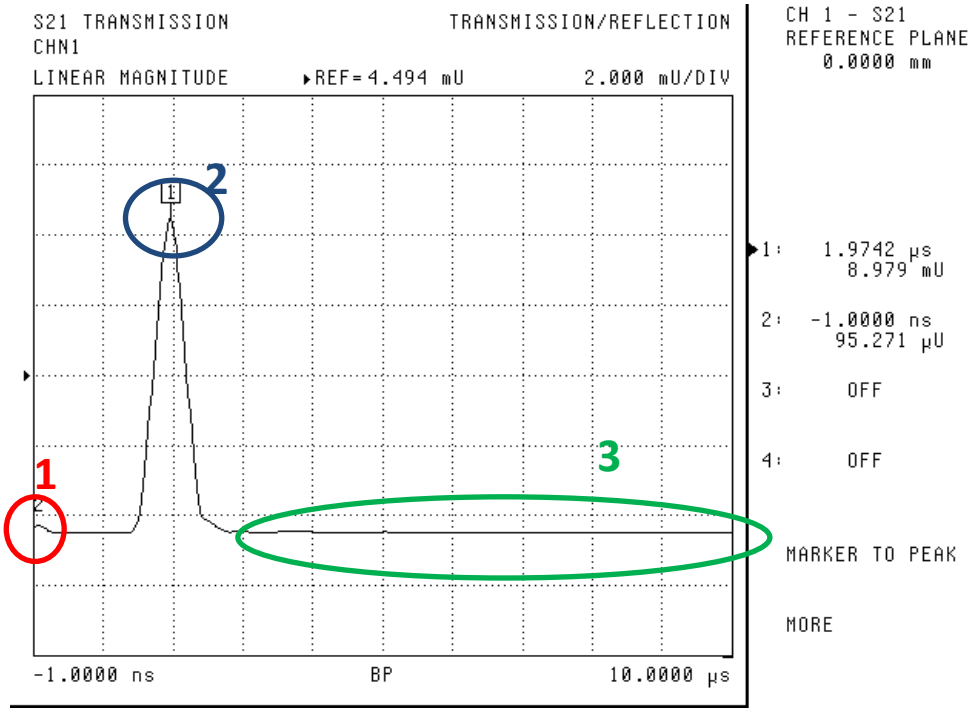


Figure 3-16 Réponse temporelle du capteur avec une Puce PDMS PHS2 et base en téflon

Toutes ces caractérisations en hydrostatique démontrent qu'il est essentiel d'isoler la surface de silice au-dessus des transducteurs pour éviter toutes perturbations électromagnétiques empêchant le bon fonctionnement du capteur acoustique en oscillateur. D'autre part, il est possible d'utiliser des cellules PDMS et une base en téflon tout en préservant les conditions de bon fonctionnement du capteur.

3.3.3.3. Les puces PDMS pour le protocole hydrodynamique

Les deux moules précédents ont ainsi permis de valider ces puces PDMS "libres", maintenues par pression sur la surface du capteur. Ces puces comportent des réservoirs pouvant contenir un volume assez important de liquide (250 µL par réservoir), nécessaire dans certaines applications demandant un volume d'analyse des échantillons représentatif. Pour un grand nombre d'autres applications, la démarche inverse s'impose et il est préférable de réduire les volumes des échantillons utilisés.

De plus, en milieu liquide, avec les puces PHS1 et PHS2, l'acheminement des espèces vers la surface est régi par des phénomènes de diffusion. Ces mécanismes, peu efficaces limitent la

cinétique d'immobilisation d'espèces à la surface du capteur, et en diminuent ainsi la sensibilité.

Aussi, au-delà des architectures précédentes développées pour des protocoles de test en régime hydrostatique, nous avons souhaité réaliser parallèlement et comparativement des tests en régime hydrodynamique pour observer l'impact de ce régime d'écoulement et envisager l'intégration de fonctionnalités susceptibles d'améliorer les caractéristiques du capteur.

Pour le protocole hydrodynamique, nous avons mis au point deux nouveaux types de cellules. La première cellule, dite PHD1 (pour Protocole HydroDynamique de première génération), intègre les mêmes cavités d'air protectrice que la cellule PHS2; cependant pour pouvoir mettre en mouvement les fluides au-dessus du chemin acoustique entre les deux transducteurs de chaque ligne à retard, nous avons fermé la chambre d'analyse et intégré des canaux d'arrivée et de sortie des écoulements. Cette première puce PHD1 est de type millifluidique, en effet les tailles caractéristiques des motifs sont de l'ordre du millimètre, excepté les murs de séparation entre les cavités d'air et les chambre d'analyse, de 250 µm. Pour atteindre des échelles plus petites, nous avons par la suite mis au point des puces PHD2, de seconde génération: ces puces gardent les mêmes cavités d'air que les cellules précédentes PHS2 et PHD1, par contre nous avons remplacé la chambre d'analyse fermée simple de la cellule PHD1 par un réseau microfluidique permettant de mieux maîtriser les écoulements au niveau de la zone sensible du capteur.

3.3.3.4. Puces PDMS PHD1 pour le protocole hydrodynamique

Pour la réalisation des puces PDMS PHD1, des pièces du second moule ont subi des modifications (Figure 3-17):

- La base du moule : les plots centraux pour les chambres d'analyses ont été réduits (entre 250µm et 1,25mm) et équipés de tiges calibrées serties (650 µm) pour aménager les orifices d'injection des liquides dans la chambre d'analyse.
- La pièce centrale du moule : des canaux ont été percés pour injecter le PDMS directement dans chaque cavité.

Ce moule permet de réaliser la première série de puces PDMS pour le protocole hydrodynamique avec un volume de chambre divisé par 10 ou par 50 selon la hauteur de la cavité. La puce PHD1 ainsi obtenue est représentée sur la Figure 3-18, positionnée sur un capteur.

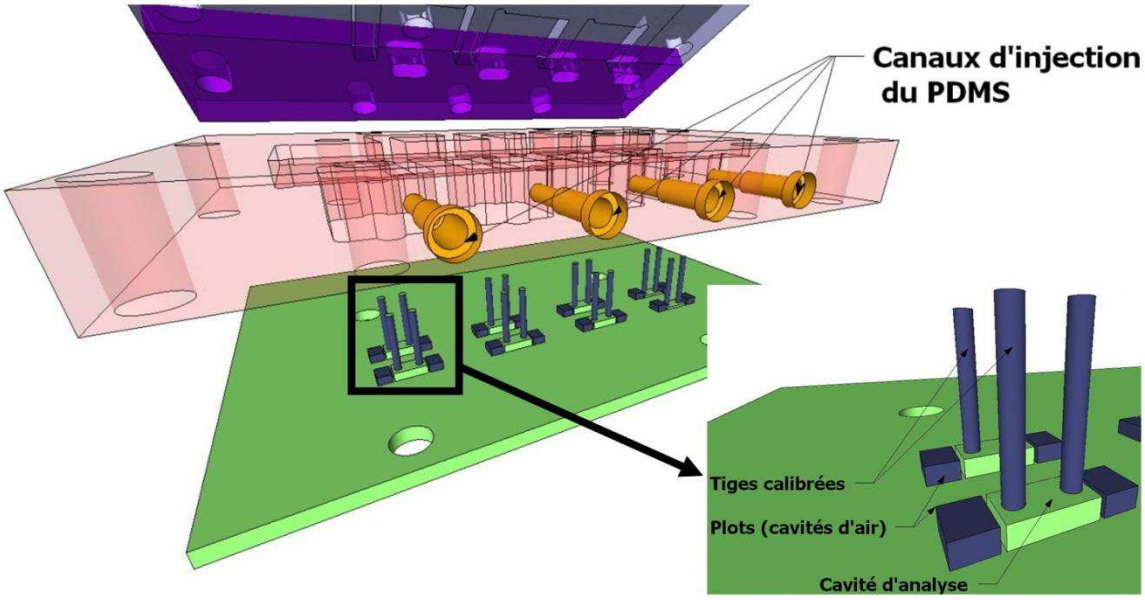


Figure 3-17 Troisième moule pour la réalisation des puces PDMS PHD1

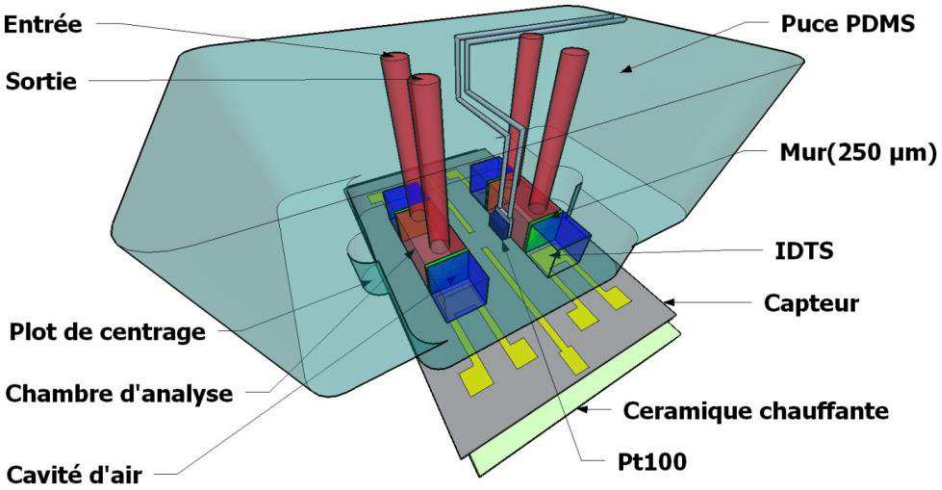


Figure 3-18 Puce PHD1, avec Pt100 intégré, sur un capteur et une céramique chauffante

Dans ce troisième moule, après avoir assemblé ses quatre parties, le PDMS dégazé est injecté lentement en une seule étape (15 minutes pour injecter 40 mL à l'aide d'un pousse-seringue programmable). Ceci permet de diminuer de manière significative le temps de préparation des puces PDMS et ne nécessite aucun dégazage supplémentaire. Le moule est ensuite chauffé à 95 °C pendant 20 minutes, refroidi et démonté pour obtenir les puces, dont l'une est visible en vue de dessous sur la Photo 3-2.

Avec ces puces, le liquide est confiné à la surface du microcapteur et s'écoule le long du chemin de propagation de l'onde acoustique, sur la partie la plus sensible du microcapteur, favorisant ainsi le renouvellement des espèces au niveau de la couche sensible bio-réceptive.

Soumises à des tests d'étanchéité, ces puces PDMS PHD1 ont été validées sous écoulement avec des débits allant jusqu'à 25 mL/min, comme le montre l'exemple représenté sur la Photo 3-3, où l'on observe la séparation des deux lignes d'écoulement, et celui de la Photo 3-4, où l'on observe les murets de séparation entre les cavités d'air protectrices et le réservoir.

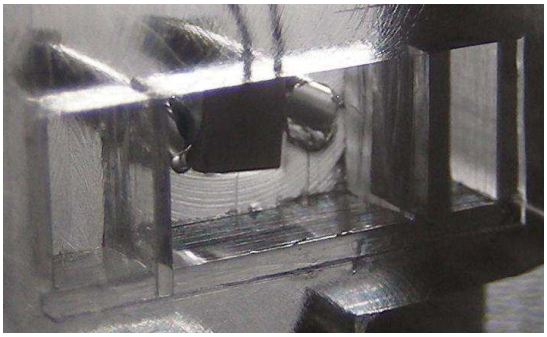


Photo 3-2 Vue de dessous de la partie centrale d'une puce PHD1, on distingue les trois cavités et les murs de 250 µm (cavité d'analyse de 1250 µm)

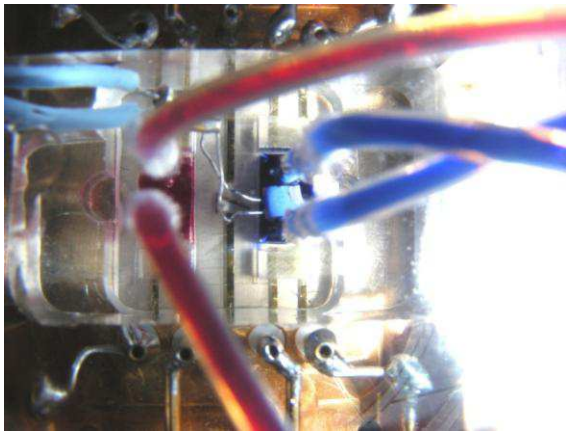


Photo 3-3 Puce PHD1 sous écoulement, avec un débit de 5mL/min.

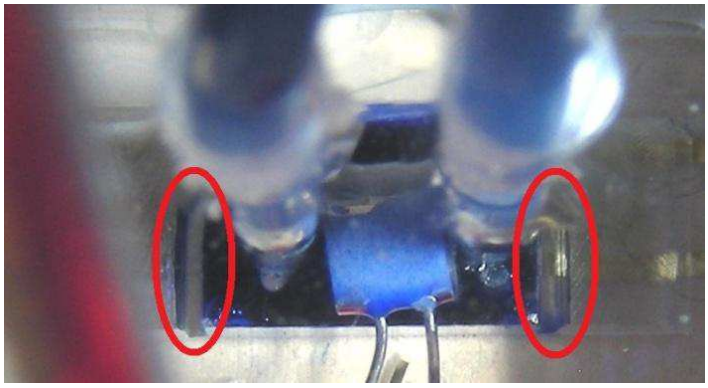


Photo 3-4 Zoom sur une cavité avec une Pt100: sous écoulement on peut distinguer les murs (entourés) et vérifier l'étanchéité.

Ceci est observable grâce aux liquides colorés visibles dans les tubes de téflon aux entrées et sorties, ainsi que dans les réservoirs (débit de 5mL/min).

Les caractéristiques électriques mesurées à l'analyseur de réseau, des lignes à retard équipées de puces PDMS PHD1 (non représentées) et soumises à un écoulement d'eau ou de tampon salins, sont identiques à celles obtenues avec la puce PDMS PHS2 (Figure 3-13).

3.3.3.5. Puces PDMS PHD2 avec réseaux microfluidiques pour le protocole hydrodynamique

Les puces PHD1 sont opérationnelles et permettent désormais de fonctionner en régime dynamique tout en restant compatibles avec les cellules de test précédentes. Cependant, afin d'améliorer encore, notamment l'uniformité des écoulements et l'efficacité de transfert thermique de la céramique chauffante au liquide analysé au sein de la puce PDMS, la conception de la puce PHD2, intégrant un réseau microfluidique, nécessitait des motifs de taille non compatible avec les résolutions obtenues par micro-usinage. Aussi, le moule correspondant a nécessité la mise en œuvre d'une étape classique de " Soft-lithography " sur silicium pour la définition du réseau microfluidique, associée de manière originale avec un moule micro-usiné comme précédemment pour la réalisation de la puce tridimensionnelle. Ce quatrième moule, présenté en suivant, permet de réaliser simultanément quatre puces PDMS de type PHD2 comportant des réseaux microfluidiques.

Ce moule représenté en vue éclatée sur la Figure 3-19 comporte plusieurs éléments superposés:

- une base en aluminium, prévue comme pour accueillir un wafer de 3 pouces de diamètre et de 1000 µm d'épaisseur comportant les motifs microfluidiques, décrits plus loin ;
- un joint d'étanchéité en Viton ;
- une pièce centrale, en aluminium, délimitant les formes extérieures des puces ;
- un élément de répartition (« dispatcheur »), en aluminium, permettant la diffusion du PDMS dans les différentes cavités lors de l'injection ;
- un couvercle, en aluminium, comportant des tiges métalliques serties (non représentées) permettant d'aménager les accès pour les fluides ainsi que les passages pour les pointes de contact à ressort de la cellule de test à travers la puce de PDMS.

Ainsi, un wafer de silicium permet, à la différence des moules précédents, de définir les structures internes des puces PDMS, à partir de motifs en résine SU8 négative révélés à la

surface du wafer. Un exemple est représenté sur la Figure 3-20. Cette association permet de concilier une structure mécanique tridimensionnelle, à une structure microfluidique de bonne résolution, aisément prototypable.

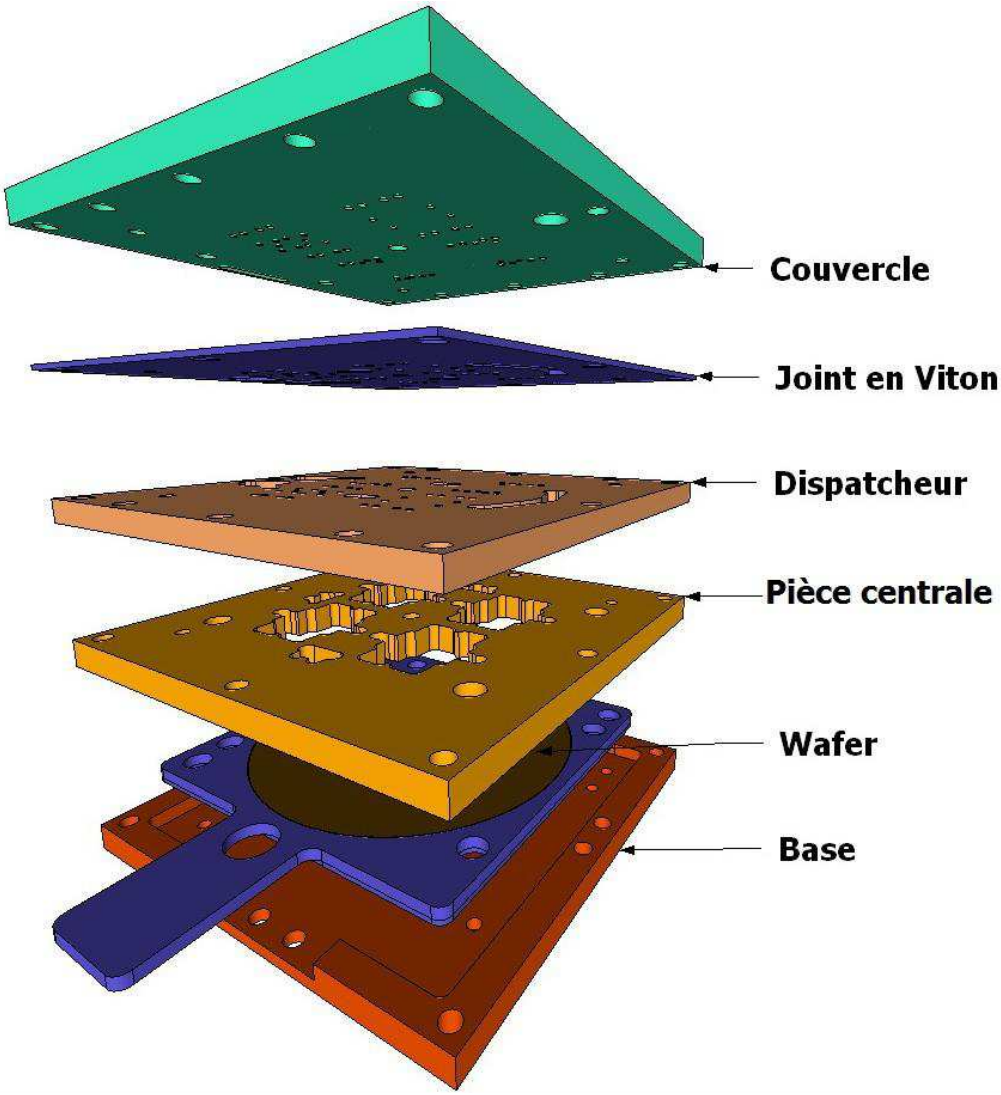


Figure 3-19 Vue éclatée du quatrième moule en aluminium

Nous avons développé un protocole de réalisation des motifs SU8 en salle blanche adapté en termes de paramètres mécaniques et thermiques par rapport aux outils disponibles, afin d'assurer:

- une bonne définition des motifs (25 µm);
- une hauteur régulière des motifs ;
- une bonne adhérence de la résine SU8 sur le substrat de silicium ;
- une bonne maîtrise des cycles de réchauffement et de refroidissement de la résine afin d'éviter des phénomènes de fissuration.

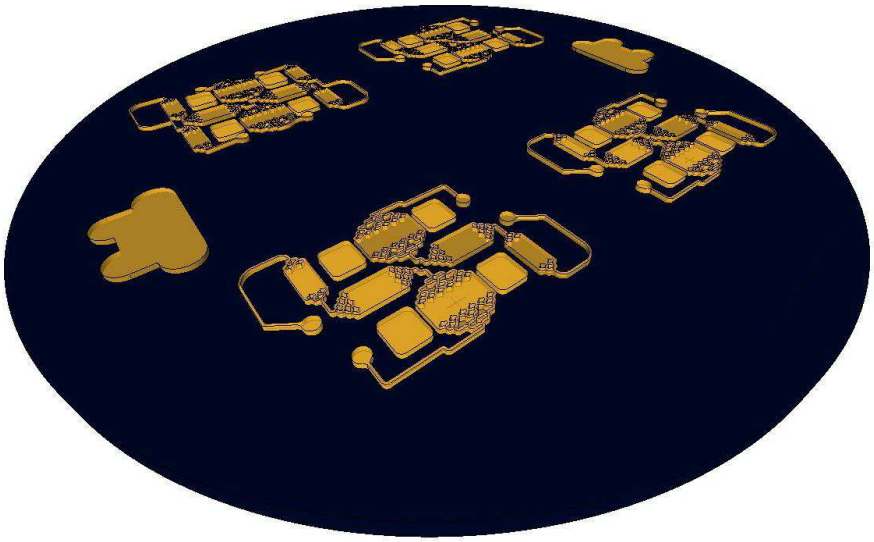


Figure 3-20 « Wafer » de silicium (3 pouces de diamètre et 1000 µm d'épaisseur) avec motifs microfluidiques en SU8

Le matériel utilisé (annexe B) pour la réalisation des motifs en résine négative SU8 2500 comporte une tournette programmable, une insoleuse UV à LED pour révéler les motifs, une plaque chauffante programmable pour contrôler les rampes de chauffage de la résine SU8. Les substrats silicium, de 3 pouces de diamètre et 1000 µm d'épaisseur, sont d'abord nettoyés à l'acétone et à l'isopropanol ou l'éthanol, puis chauffés pendant 20 minutes. La résine est ensuite déposée sur le wafer, à l'aide de la tournette programmable, couvercle fermé. La vitesse et le temps de rotation sont fonction de l'épaisseur de résine désirée : pour obtenir une épaisseur de 250 µm, 2000 tours/min pendant 50 secondes, pour 500 µm, 1000 tours/min pendant 120 secondes. À la fin du cycle de rotation, le wafer est porté une première fois à 95 °C pendant 40 minutes sur une plaque chauffante programmable (de 25°C à 95°C avec une rampe de 5°C par minute, puis 40 minutes lorsque la consigne de 95°C est atteinte). Après refroidissement de la résine à rampe contrôlée pour éviter tout stress thermique pouvant générer des craquelures, voire des décollements de la résine, le wafer et le film transparent comportant les négatifs des motifs microfluidiques sont positionnés dans l'insoleuse UV, pour une insolation de cinq minutes à 50 % de la puissance maximale, soit une dose de totale de d'énergie typique de 26mJ. Le wafer est ensuite chauffé une seconde fois à 65°C pendant 10 minutes pour durcir les motifs révélés, puis refroidi selon une rampe contrôlée, et placé dans un bain de révélateur pour faire apparaître les motifs. La durée de révélation dépend de plusieurs paramètres : date de péremption de la résine, complexité des motifs, uniformité, puissance et distance de l'éclairage UV, propriété du film transparent (absorbance et diffusion de la lumière). Dans notre cas, la révélation nécessite 30 minutes au bain-marie. Dès que

l'étape de révélation est terminée, le wafer est nettoyé à l'acétone puis à l'isopropanol avant stockage. Toutes ces valeurs, ainsi que celles relatives à la suite du protocole, ont été déterminées de manière empirique à partir de tests de calibration au préalable. Un des motifs en résine SU8 obtenu par ce procédé est illustré sur la Photo 3-5.

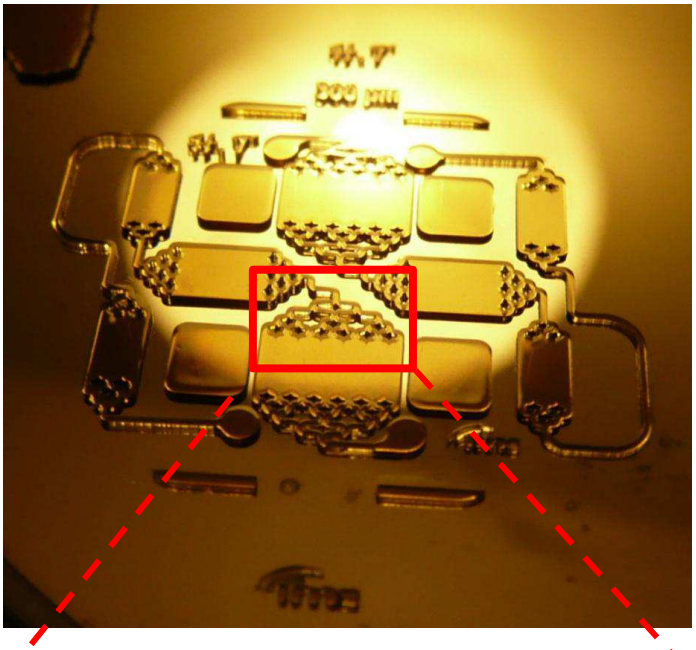


Photo 3-5 Négatif SU8 d'un double réseau microfluidique PHD2.

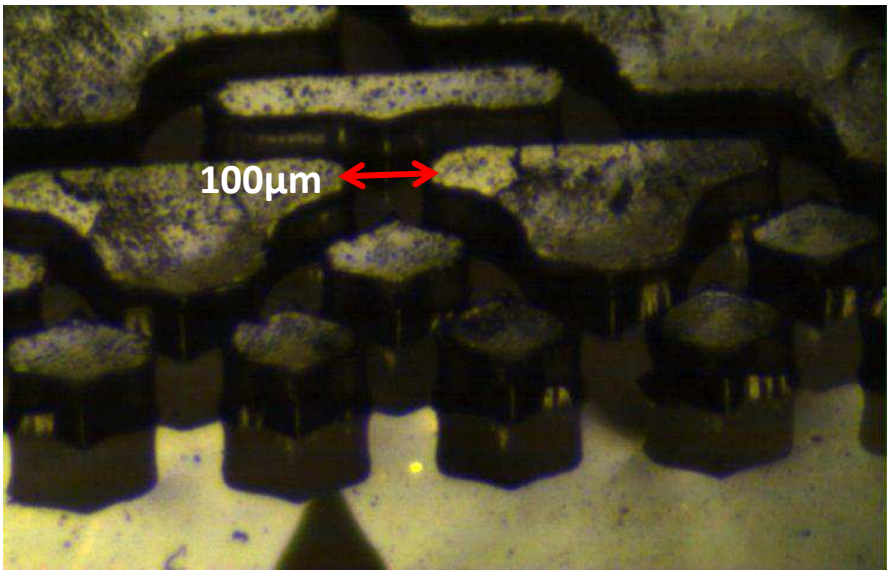


Photo 3-6 Zone de haute résolution des motifs microfluidiques d'une puce PDMS PHD2

Les dessins des négatifs ont été conçus sur © Sketchup Pro 3D et imprimés sur films transparents avec une résolution de 5000 DPI par impression sur flasheuse monochrome,

résolution suffisante pour nos motifs, comme en témoignent les motifs précis visibles sur l'image grossie d'une partie de la puce PDMS sur la Photo 3-6.

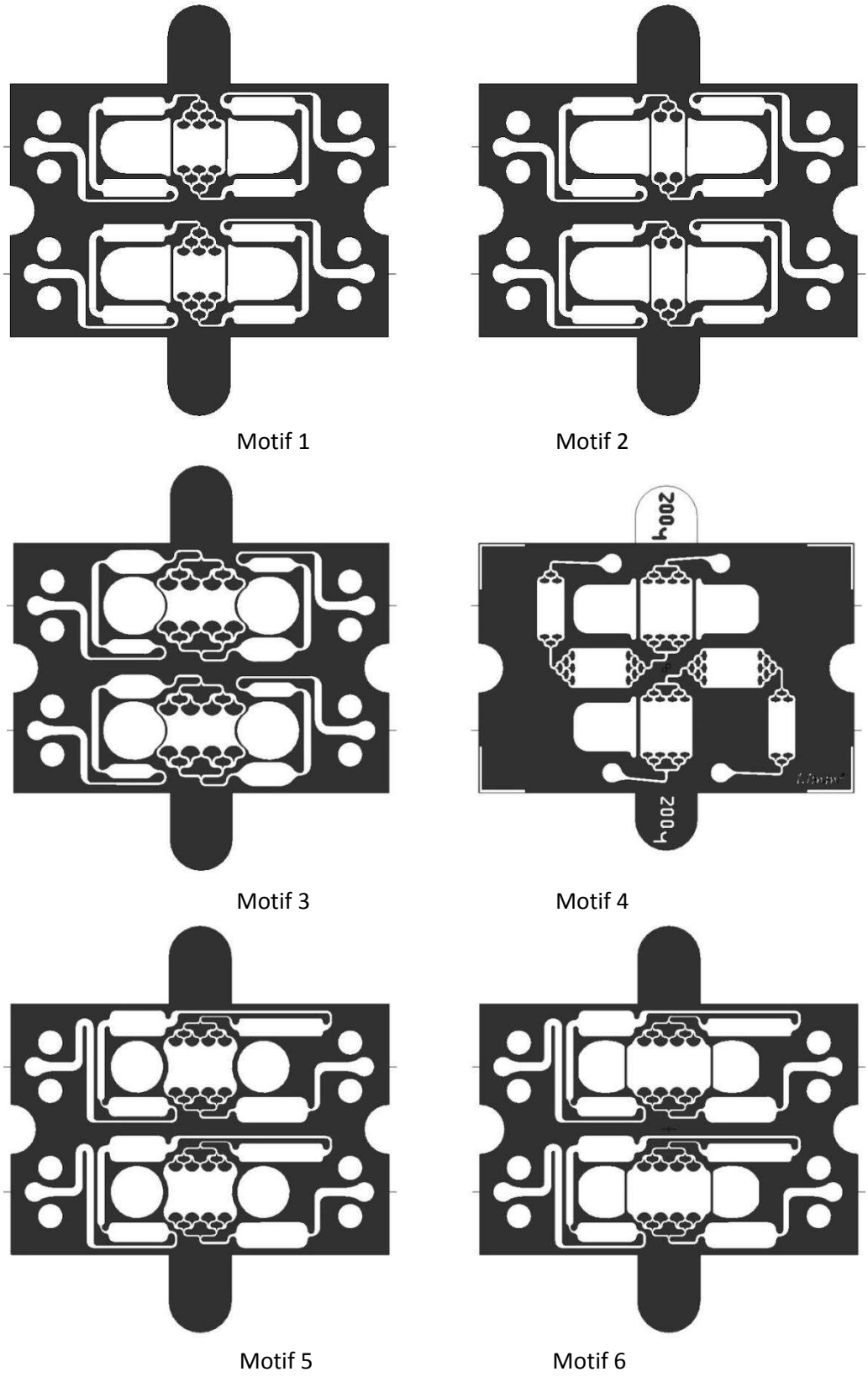


Figure 3-21 a) Motifs des réseaux microfluidiques

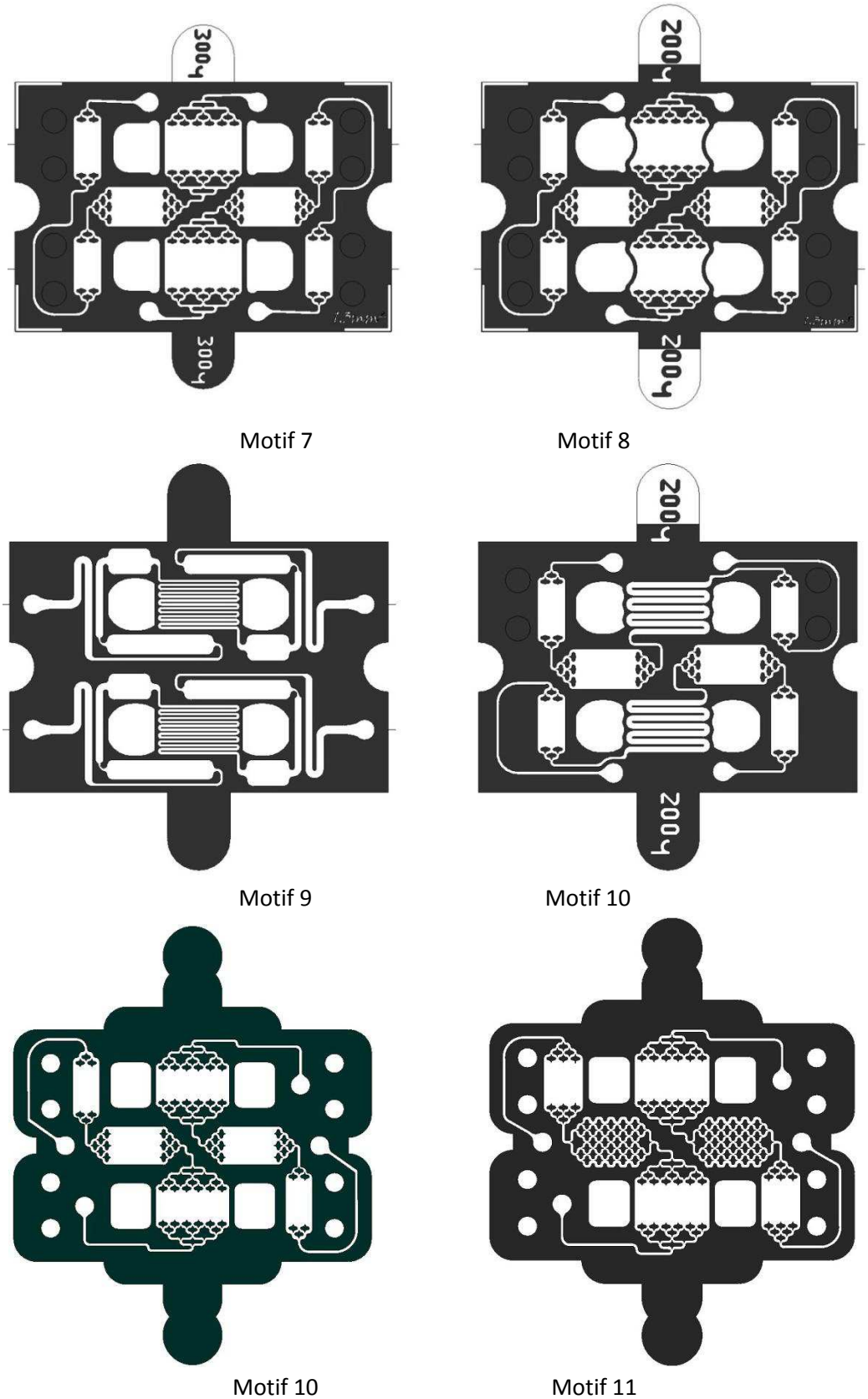


Figure 3-21 b)Motifs des réseaux microfluidiques

Plusieurs motifs ont été imaginés (exposés sur la Figure 3-21). Ces différents motifs ont permis de tester plusieurs configurations afin de quantifier leur impact sur l'étanchéité et sur les pertes acoustiques, tout en privilégiant une circulation optimale des liquides. À titre d'exemples, avec le motif n° 2, les cavités d'air protectrices de la silice au-dessus des IDTs sont trop grandes, induisant un affaissement pour des cavités de faible hauteur (≤100µm). Tous ces tests nous ont permis de mettre au point un réseau adapté à notre étude, celui de la puce microfluidique représentée sur la Figure 3-22.

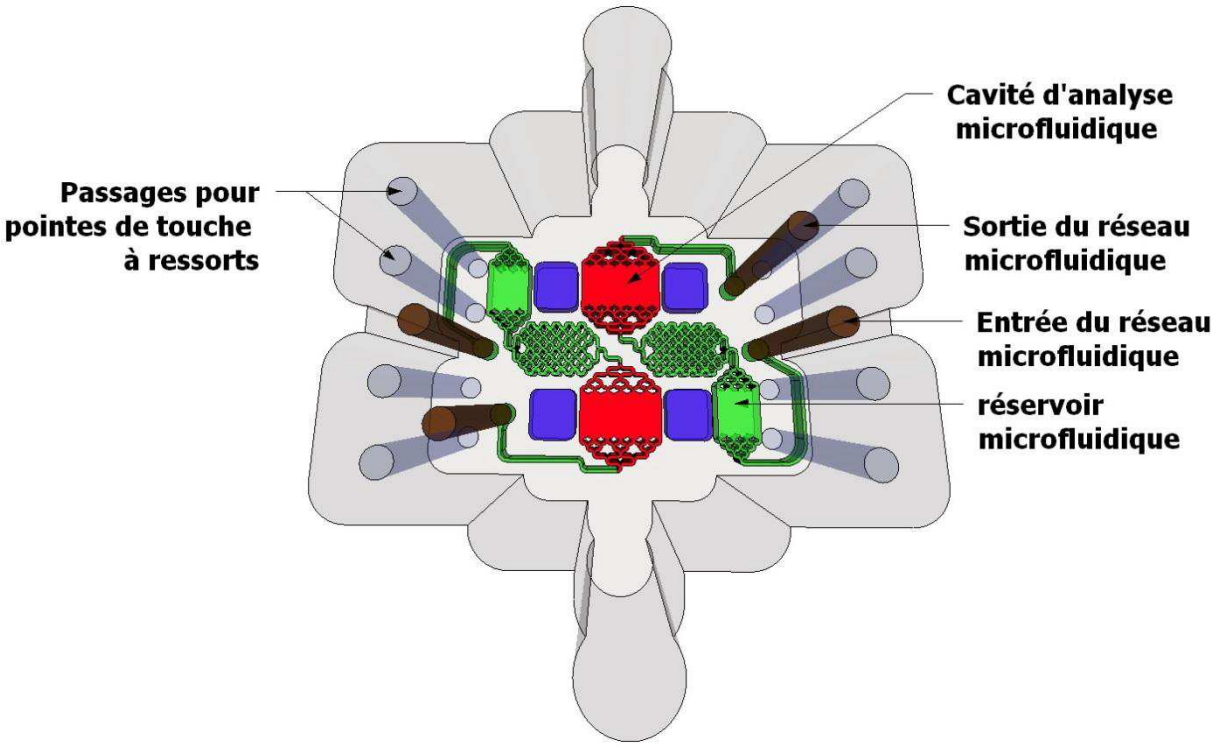


Figure 3-22 Puce PDMS PHD2 avec réseaux microfluidique

Cette puce microfluidique PHD2 comporte trois parties principales: des cavités d'air protégeant la surface de silice au-dessus des IDTs, la chambre d'analyse au-dessus du chemin acoustique, et les réseaux microfluidiques, avec ici, en amont de la cavité d'analyse, des réservoirs d'homogénéisation, de mise en température, susceptibles d'être utilisés également pour assurer une étape d'incubation.

Nous avons effectué des tests d'écoulements avec une puce collée sur une lame de verre. Le collage est réalisé à l'aide d'un traitement de la puce PDMS sous UV-Ozone durant 30 secondes, directement après le démoulage, et de la lame de verre durant 25 minutes. Cette procédure permet d'activer les liaisons silicium du PDMS et de la lame de verre, et permet un collage fort, irréversible des deux éléments. Ainsi sur la Photo 3-7, un fluide, de type encre, s'écoule à travers le réseau microfluidique avec un débit de 10 mL/min. Plusieurs tests avec

différents débits, et avec les structures microfluidiques représentées sur la Figure 3-21, ont été effectués avec des débits allant de 5µL/min à 25 µL/min. Ces tests ont prouvé que ces réseaux microfluidiques homogénéisent les écoulements de deux façons :

- ils évitent les zones mortes (zones au sein desquelles le liquide ne circule pas après remplissage initial) ;
- ils annulent les gradients de vitesses en imposant des écoulements plans dans les réservoirs et au sein de la chambre d'analyse, avec des longueurs d'écoulement identiques entre les entrées et sorties des bifurcations.

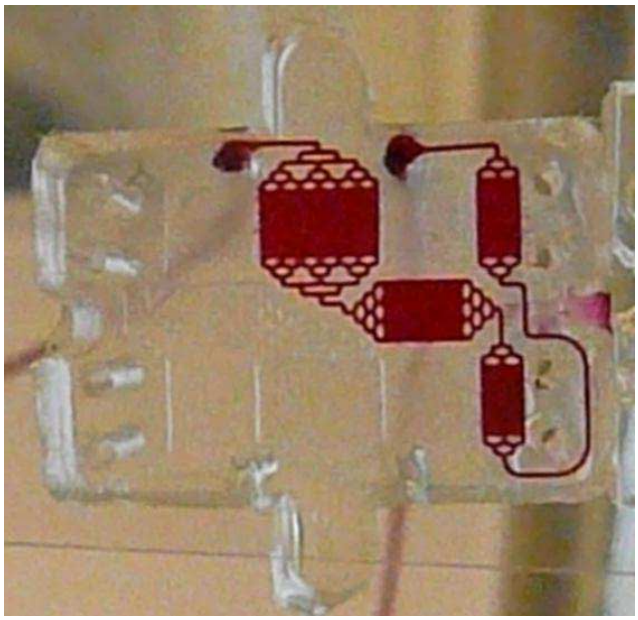


Photo 3-7 Test de validation de l'écoulement à travers le réseau microfluidique. Puce PDMS PHD2, motif n° 7, collée sur lame de verre, circulation d'encre, débit de 10mL/min.

Ceci a pour conséquence de répartir de manière homogène et continue le liquide dans toute la chambre d'analyse, permettant ainsi d'alimenter continuellement et rapidement la surface active du capteur et de présenter simultanément les espèces à détecter. Le temps total de greffage des anticorps ou d'immobilisation des bactéries peut ainsi être minimisé, comme nous le constaterons au dernier chapitre, celui dédié à la détection des bactéries en régime dynamique avec puce PHD2 (§ 4.4.3).

Les vues sur la Photo 3-8 montrent la progression de l'écoulement à travers les deux réseaux avec une puce PHD2 sur capteur, l'intervalle entre chaque photo est de 1 seconde. Le comportement électrique du dispositif représenté sur la Photo 3-8 est identique à celui du dispositif utilisé avec la puce PDMS PHD1 (Figure 3-13).

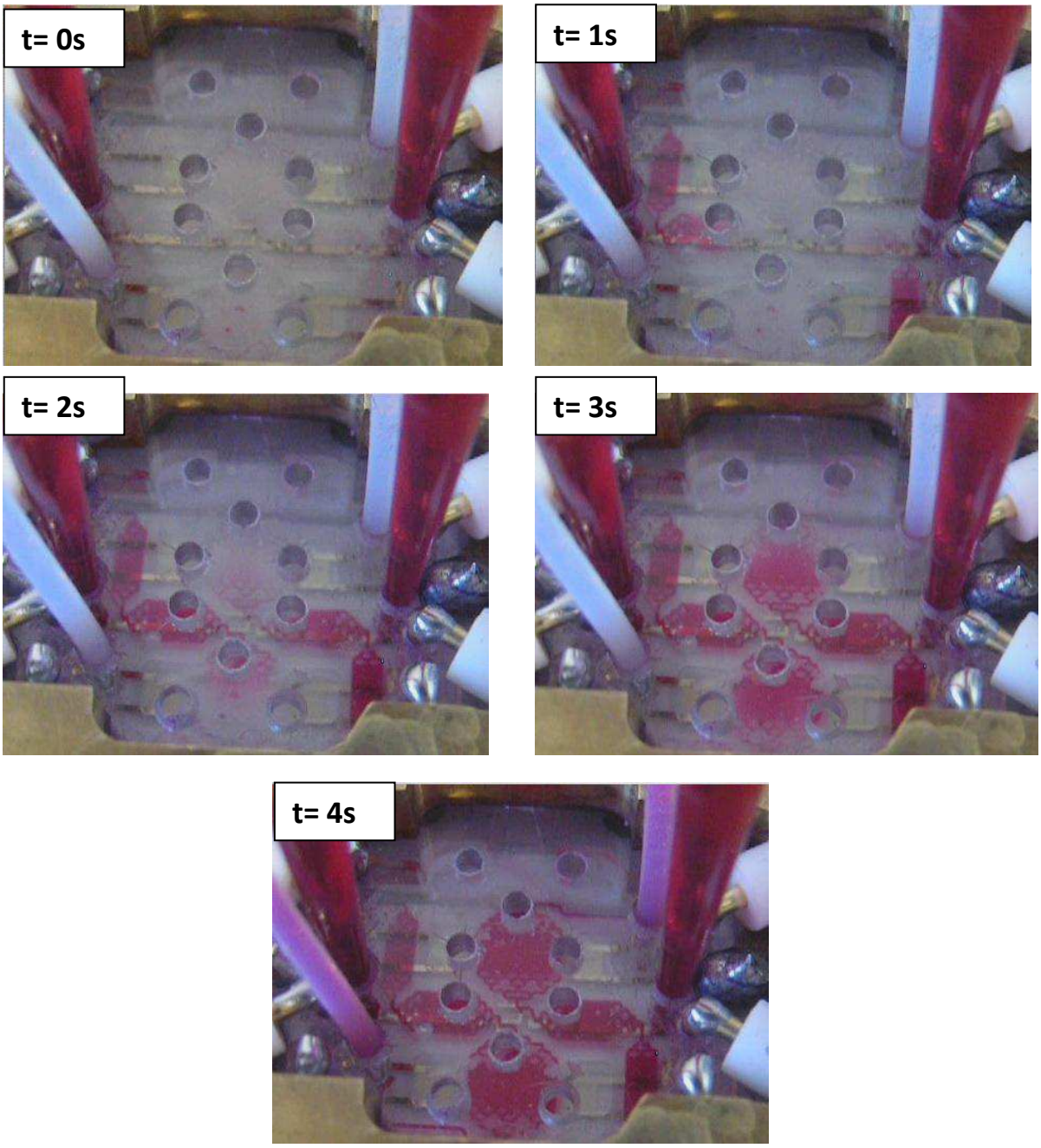


Photo 3-8 Écoulement à travers les réseaux de la puce PHD2 (motif n° 11).

3.4. Banc de mesure

3.4.1. Ensemble du dispositif expérimental

Pour le greffage des anticorps et la détection des bactéries, un banc de mesure dédié a été réalisé et installé dans les locaux du laboratoire d'immunologie et parasitologie de l'université de Bordeaux 2. Un aperçu de ce dispositif expérimental est illustré sur la Photo 3-9.

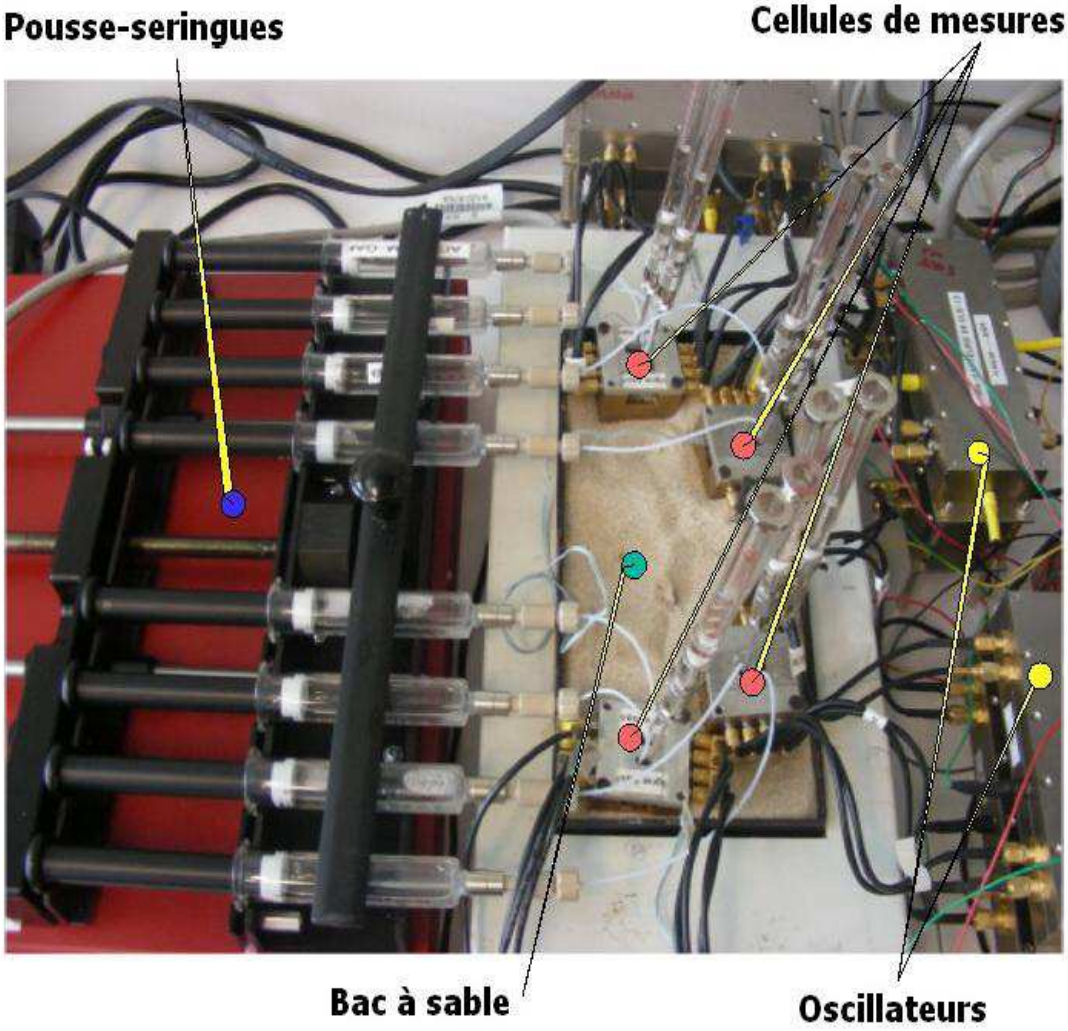


Photo 3-9 Banc de mesures

Ce banc comporte dans sa configuration de base (Photo 3-9) :

- trois à quatre cellules de mesure thermostatées dans un bac à sable;
- pour certains essais, une cellule de mesure avec régulation thermique intégrée (§ 3.3.3.2 et 3.4.2);
- un ordinateur d'acquisition pour les fréquences et la température ;
- huit montages électroniques de conditionnement pour oscillateurs;
- cinq fréquencemètres à deux voies;
- un pousse-seringues avec une capacité de 8 seringues.

Pour le protocole hydrostatique, des micropipettes sont utilisées pour remplir et vider les chambres d'analyse des différents liquides comportant les espèces à greffer ou à détecter. Le nettoyage des chambres d'analyse s'effectue aussi à l'aide de la pipette.

Pour la configuration hydrodynamique, plus simple à mettre en œuvre, divers essais utilisant les puces PHD1 et PHD2 ont permis de retenir le protocole suivant:

- Des cônes à pipette sont directement insérés dans les accès d'entrée de chaque réservoir (Figure 3-23), ces cônes serviront de réservoirs intermédiaires pour la puce de PDMS. Tous les liquides à étudier y seront pré-déposés, ces réservoirs évitent d'emprisonner des bulles d'air dans la chambre d'analyse malgré les faibles quantités de liquide mises en jeu et permettent d'éviter les chocs lors de l'injection car ces chocs, présents et inévitables dans le cas des tests en statique, sont parfois à l'origine de variations de fréquence similaires à celles représentatives d'une immobilisation et susceptibles de se traduire par une alerte erronée.
- Chaque accès de sortie des réservoirs de la puce est relié à un tube en téflon (Figure 3-23) connecté à une seringue, elle-même pilotée par le pousse-seringue programmable. Ce positionnement du pousse-seringue en extraction (en sortie) favorise l'étanchéité du dispositif.

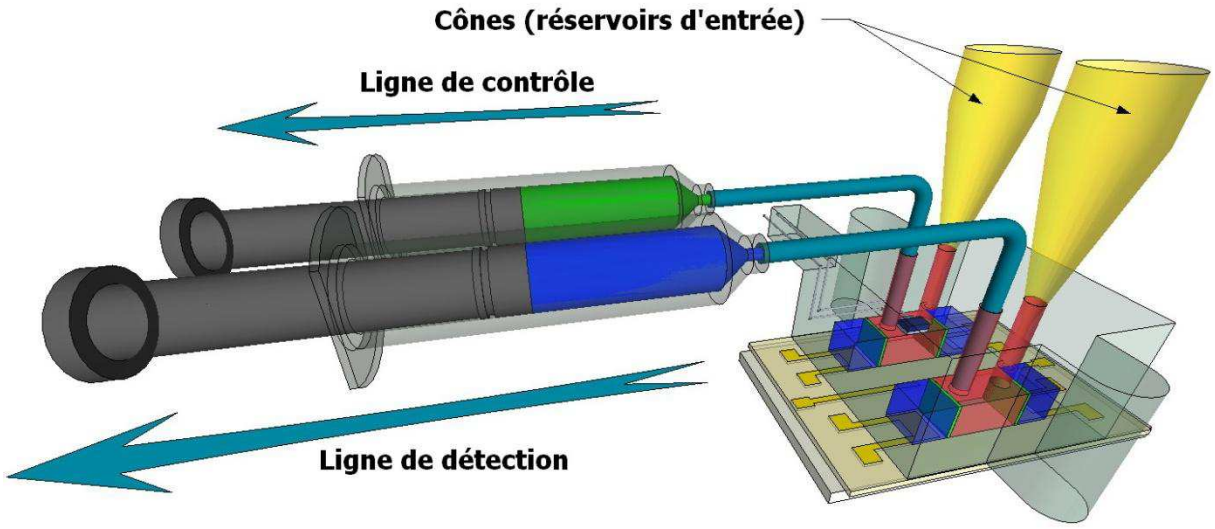


Figure 3-23 Insertion des cônes et des tuyaux pour l'acheminement des liquides dans la chambre d'analyse

Il suffit ensuite d'injecter successivement et avec précaution les différents liquides à l'intérieur du réservoir d'entrée pour effectuer toutes les étapes de la détection (dans nos travaux : nettoyage, greffage des anticorps et détection des bactéries).

3.4.2. Développement d'une cellule de test adaptée aux puces PDMS PHD2

Comme nous l'avons vu, les puces PDMS PHS1, PHS2 et PHD1 sont utilisées avec la cellule de mesure légèrement adaptée de la cellule initiale (Figure 3-7). Une nouvelle cellule de mesure a été conçue pour l'utilisation de ces puces PHD2, dont les dimensions latérales ont été légèrement augmentées afin d'intégrer des fonctions microfluidiques au sein même du composant, ainsi que des éléments pour un contrôle de température. Cette nouvelle cellule de mesure, pour laquelle modularité, facilité d'utilisation et robustesse ont été privilégiées, comporte sept pièces (vue éclatée Figure 3-24):

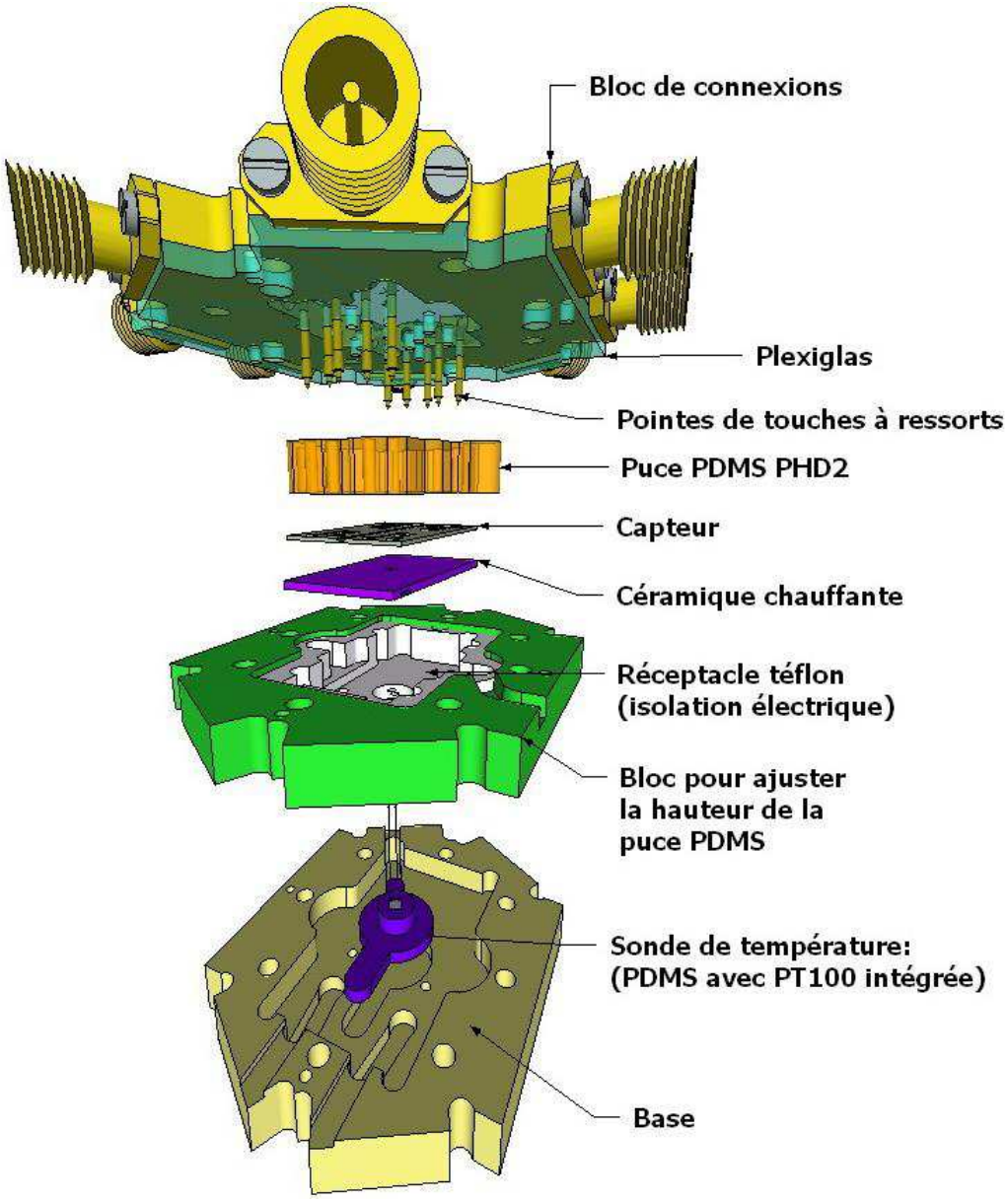


Figure 3-24 Nouvelle cellule de mesure en vue éclatée

- La base en aluminium, mise au point pour contenir la sonde de température et le bloc de positionnement en téflon, comporte aussi des passages pour les fils de la sonde Pt100 et ceux de l'alimentation de la céramique chauffante avec résistance sérigraphiée. Elle est représentée de manière détaillée sur la Figure 3-25.
- La puce PDMS PHD2 avec une sonde Pt100 intégrée, est détaillée sur la (Figure 3-26). Elle est réalisée à partir du moule prévu pour les cellules PHD2 (Figure 3-19) et peut ainsi être réalisée en même temps.
- La céramique chauffante, dont deux échantillons sont représentés sur la Figure 3-27 est décrite plus loin.
- Le positionneur en téflon, assure un alignement successif de la céramique chauffante, du capteur et de la puce PDMS, et permet d'isoler la céramique du reste de la structure métallique de la cellule (Figure 3-28).
- Le bloc de calibration en aluminium permet le calibrage de la hauteur et du taux de compression des puces PDMS de test (Figure 3-29).
- Le bloc de connexions, est équipé de connecteurs SMA vissés pour une meilleure tenue mécanique dans le temps, et de pointes de touche à ressort (Photo 3-10).
- Le couvercle en plexiglas fixé sous le bloc de connexions SMA assure le maintien avec une pression homogène contrôlée de la puce de PDMS sur le capteur, tout en autorisant la visibilité de l'écoulement (Photo 3-10).

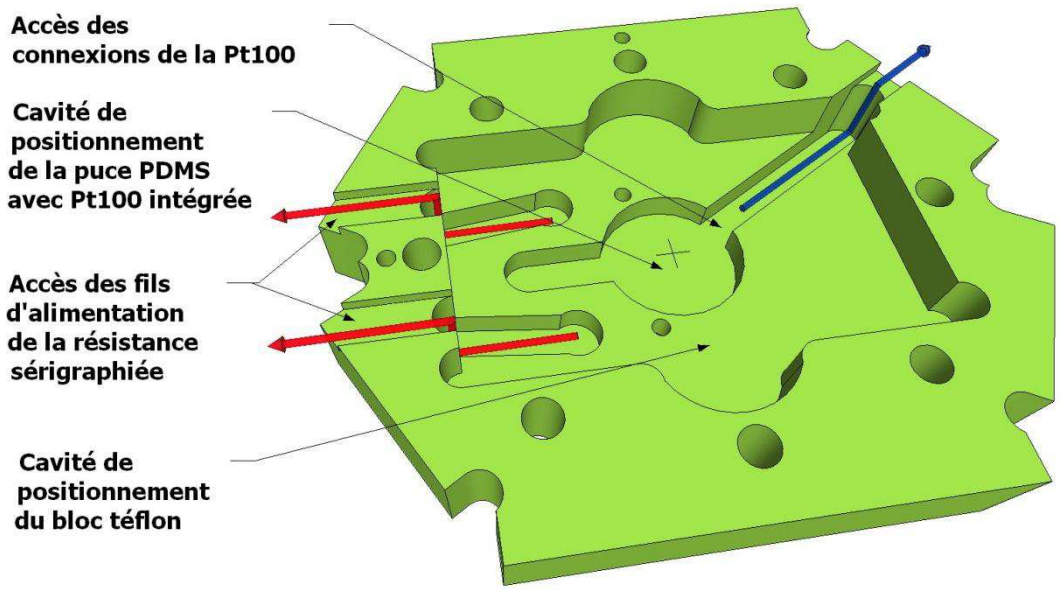


Figure 3-25 Base aluminium de la cellule de mesures

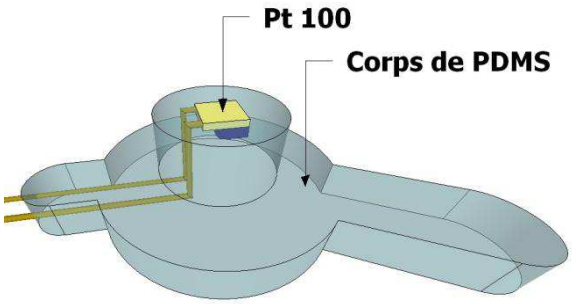
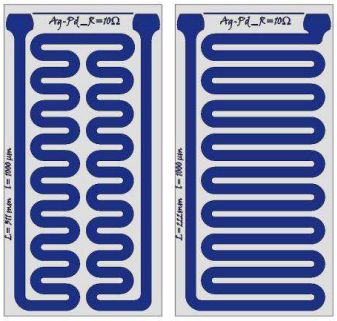
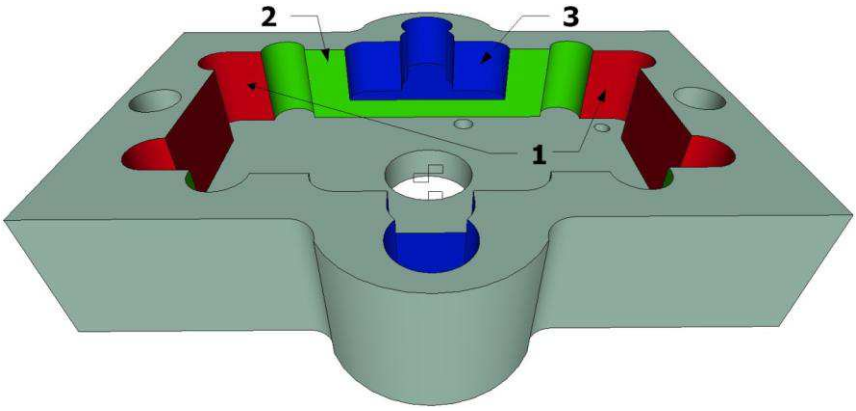


Figure 3-26 Puce PDMS avec Pt100 intégrée

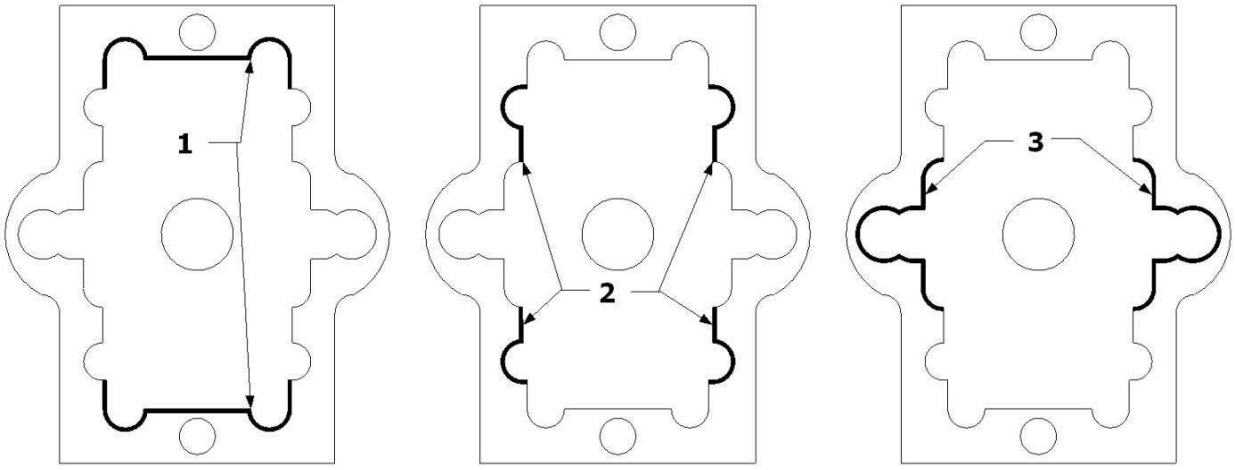


(a) *(b)*

Figure 3-27 Céramiques chauffantes



(a)



(b)

Figure 3-28 Réceptacle téflon, en vue iso (a) et vues de dessus (b) conçu pour auto-aligner successivement la céramique chauffante, le capteur et la puce PDMS, respectivement à l'aide des surfaces numérotées 1, 2 et 3.

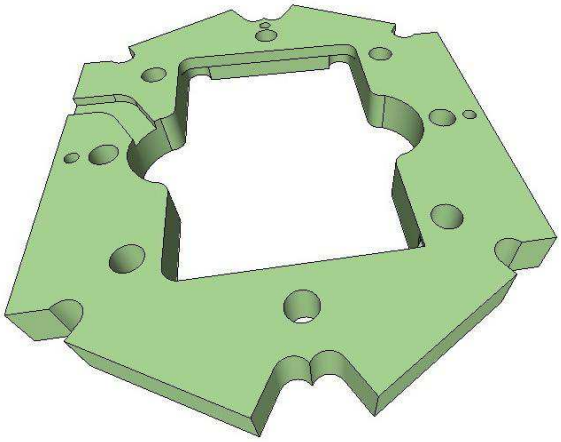


Figure 3-29 Ajusteur de la hauteur de la puce PDMS

Photo 3-10 Bloc de connexions et couvercle en plexiglass

Sur la Photo 3-11 ci-dessous est illustré l'assemblage de la base (Figure 3-25) comportant la puce PDMS avec Pt100 intégrée (Figure 3-26), du réceptacle en téflon (Figure 3-28), de la céramique avec résistance chauffante, du capteur SAW, de la puce PDMS PHD2 et de l'ajusteur de la hauteur de la puce PDMS.

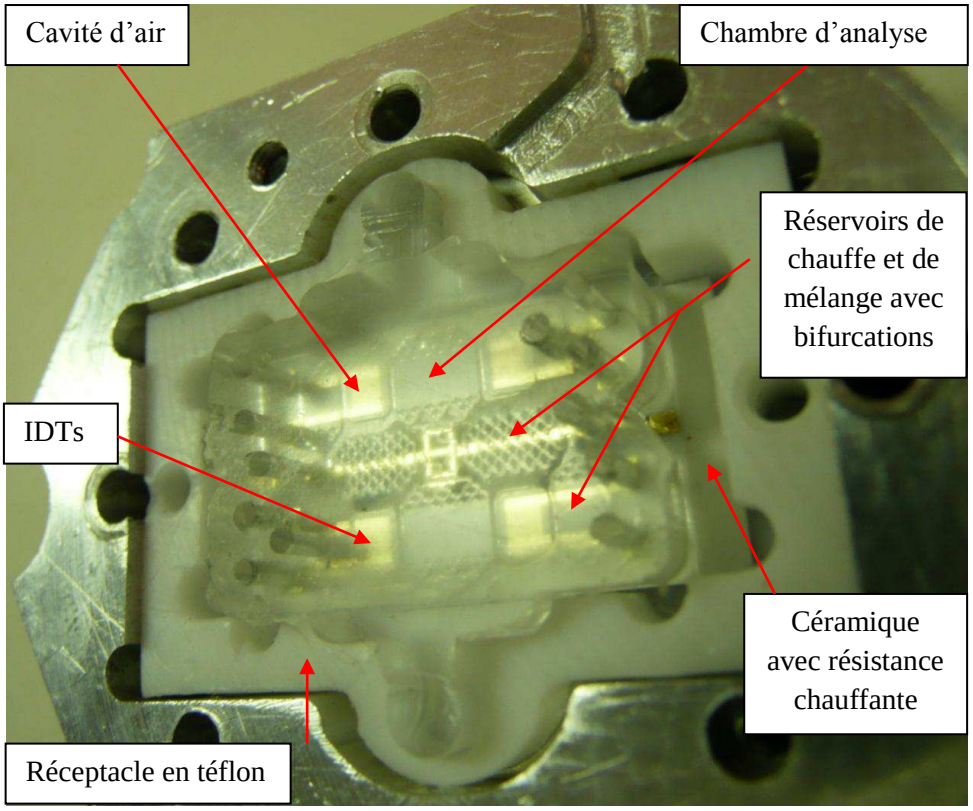


Photo 3-11 Puce microfluidique PHD2 sur capteur SAW dans la cellule de test: on distingue par transparence les différentes parties de la puce et son bon positionnement sur le capteur

3.4.3. Système de contrôle en température, céramiques chauffantes

Pour assurer le chauffage du capteur, des pistes métalliques à base d'encres résistives d'argent-palladium, ont été sérigraphiées sur des substrats céramiques (alumine Al_2O_3) afin d'obtenir une résistance de 10 Ω ajustée par polissage (épaisseur environ 100µm). Deux motifs ont été retenus pour leur intérêt en termes de bonne répartition du chauffage sur le substrat de céramique (Figure 3-27 (a) et (b)). Les motifs définis à l'aide du logiciel ©Sketchup Pro 3D occupent ainsi une surface importante, 48 % (a) et 52% (b). Une Pt100 intégrée dans du PDMS (Figure 3-26) et placée sous la céramique, permet de mesurer la température. Un module comportant une PWM est utilisé pour maintenir la température à une valeur de consigne. Ce système a permis une régulation du système à 37°C, avec une précision de ± 0,05°C.

3.5. Conclusion

Ce chapitre a démontré la possibilité de coupler un capteur à onde de Love et des structures PDMS calibrées, pouvant intégrer une sonde de température et divers motifs millimétriques et micrométriques, dans le but de concevoir une nouvelle plateforme de détection à ondes de Love. Au travers de ce chapitre, l'importance et la nécessité de travailler à l'aide d'outils et de technologies complémentaires (CAO, FAO, softlithographie) a clairement été établie dans les processus de mise au point des nouvelles puces PDMS et des nouvelles cellules de mesure. Les différentes caractérisations à l'analyseur de réseaux attestent du bon fonctionnement des puces PDMS (PHS2, PHD1 et PHD2), et ceci quel que soit le milieu de test utilisé (air, eau, PBS, TBS). Tous ces nouveaux dispositifs ont permis plusieurs avancées importantes par rapport aux travaux précédents **[169-156]**:

- Mise au point d'un système de test étanche
- Remplacement du bac à sable par intégration d'une résistance sérigraphiée pour un contrôle en température précis et rapide (± 0,05°C)
- Séparation des deux lignes à retard du dispositif à ondes de Love, permettant ainsi d'effectuer sur une même plateforme un test et son contrôle associé
- Diminution des volumes de liquides utilisés
- Possibilité de mise au point rapide (24-48H) de nouvelles puces PDMS adaptées en fonctions des utilisations grâce à la mise au point de nouveaux procédés de fabrication des puces PDMS (moulage combiné à la softlithographie)

- Conditions de pression et de débits reproductibles grâce à la calibration des puces PDMS (10µm de précision)
- Conception d'une cellule démontable entièrement pour nettoyage et réutilisation des puces PDMS et des capteurs SAW
- Meilleure stabilité des connectiques (mesures moins parasitées)
- Mises au point de nouveaux protocoles de test

Ainsi, forts de la validation du bon fonctionnement des nouvelles cellules de mesure et puces PDMS, nous les avons utilisées pour des tests biologiques, exposés au chapitre suivant, traitant de la partie expérimentale de ces travaux.

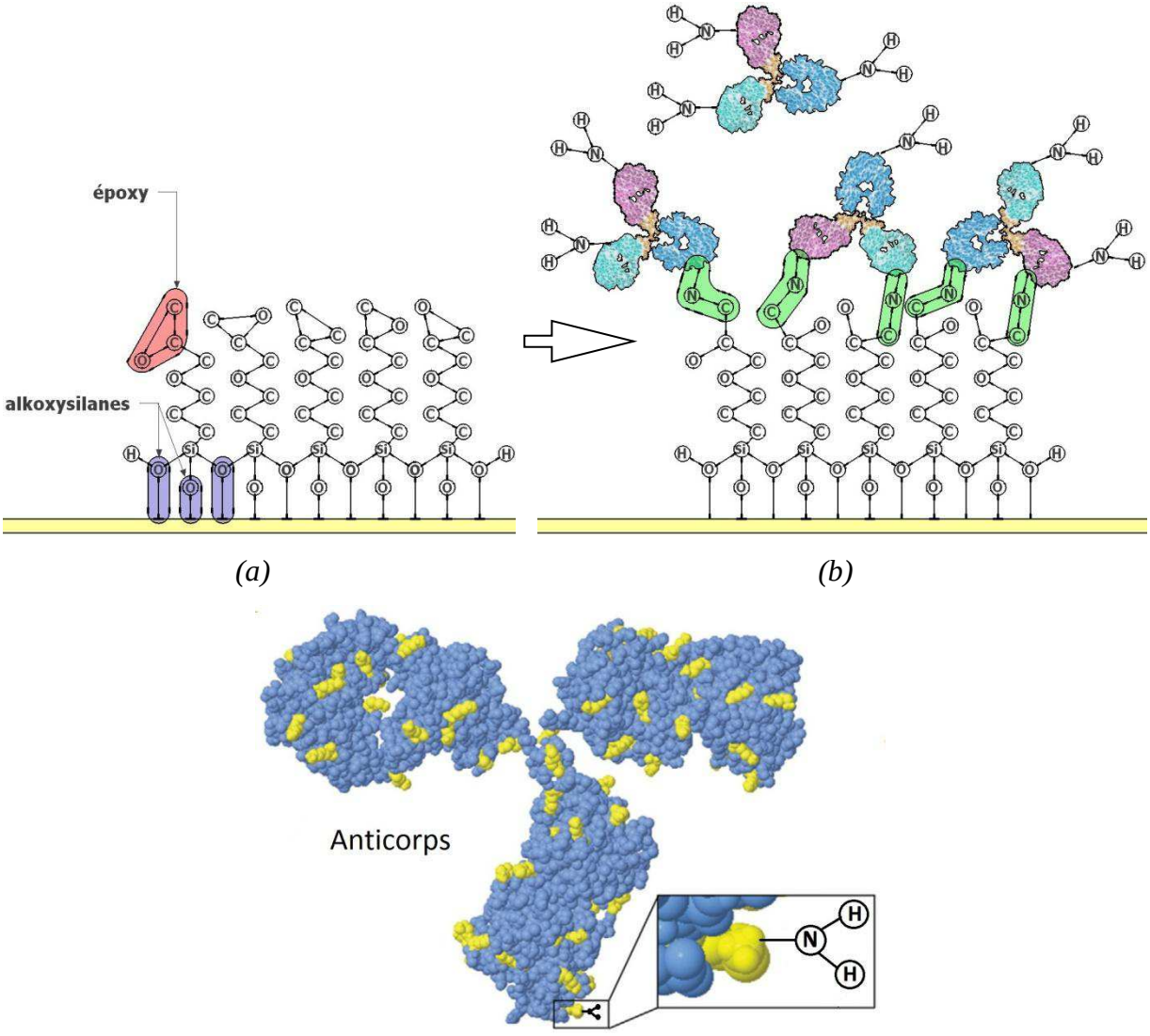
4. Application à la détection biologique

Ce chapitre est consacré à la partie expérimentale sur l'application des dispositifs mis au point à la détection, dans le cadre de nos travaux visant des espèces cibles de type bactéries. Nous décrirons d'abord succinctement le procédé de fonctionnalisation chimique du capteur, permettant l'immobilisation des anticorps de reconnaissance spécifique. Ensuite, nous décrirons la préparation des échantillons de test et des différents protocoles de détection (hydrostatique et hydrodynamique). Nous continuerons en exposant nos résultats expérimentaux pour le greffage d'anticorps puis la détection de bactéries *Escherichia Coli* (*E. coli*). Pour terminer ce chapitre, nous apporterons des explications sur les différentes cinétiques de détection obtenues, en nous aidant de simulations numériques réalisées sous Comsol Multiphysics® 3.5.

4.1. Préparation et utilisation des capteurs

4.1.1. Greffage de l'agent de liaison

La surface du biocapteur à ondes de Love est constituée d'une couche de silice d'environ 4 micromètres. Pour les tests biologiques, les surfaces des capteurs ont été modifiées à l'aide d'un agent de couplage silylé. Pour ces travaux, un agent de liaison commercial a été retenu par nos collègues chimistes, le (3-glycidoxypropyl) triméthoxysilane, ou GPTS **[171]**. La mise en œuvre du GPTS permet ainsi d'assurer une double liaison covalente : sur le capteur, par interaction entre les groupements silanols de la surface et alkoxysilanes du GPTS (Figure 4-1 (a)), et au niveau des anticorps de reconnaissance **[122-172],** par liaisons des fonctions époxy du GPTS avec les groupements amines présents en grande quantité sur les anticorps (Figure 4-1 (a) et (b)).



(a) *(b)*

(c)

Figure 4-1 (a) liaison du GPTS à la surface de silice par l'intermédiaire des groupements silanols de la surface et alkoxysilanes du GPTS
(b) liaisons des anticorps au GPTS par l'intermédiaire des groupements amines des anticorps et des groupements époxy activés du GPTS
*(c) vue détaillée de la répartition des sites amines , reliés à l'anticorps via les lysines, en jaune (inspiré de **[173]**)*

4.1.2. Utilisation et stockage des capteurs

Un protocole de suivi systématique des capteurs a été mis en place dans le cadre de ces travaux. Malgré un temps important dédié à ces suivis, ces étapes nous sont apparues nécessaires à une meilleure compréhension des phénomènes observés, ce, d'autant plus du fait du caractère technologique et pluridisciplinaire du dispositif. Ainsi, à réception des lots, les

capteurs sont caractérisés à l'analyseur de réseaux pour vérifier leur bon fonctionnement, sous air, eau dé-ionisée et tampon salin (PBS et/ou TBS). Ils doivent satisfaire des conditions de pertes (paramètres S21 >- 33 dB) et la pente de la phase doit être régulière pour assurer une bonne stabilité en montage oscillateur.

Par la suite, et à chaque utilisation, les pertes minimales et la fréquence correspondante sont contrôlées. Un protocole de nettoyage a été élaboré avec les partenaires (cf. Annexe C), il est appliqué après chaque utilisation en biologie et avant chaque caractérisation ou fonctionnalisation de surface. Les capteurs propres ou greffés sont stockés systématiquement à l'abri de la lumière.

4.1.3. Phénomène de dérive

Après chaque utilisation des capteurs pour les tests biologiques et après nettoyage, il a été observé une dérive des fréquences d'oscillation sous air (Figure 4-2). Sur la Figure 4-2 et en ordonnée leurs fréquences, chaque courbe correspond aux utilisations successives: de la première utilisation (courbe inférieure) à la quatrième (courbe supérieure).

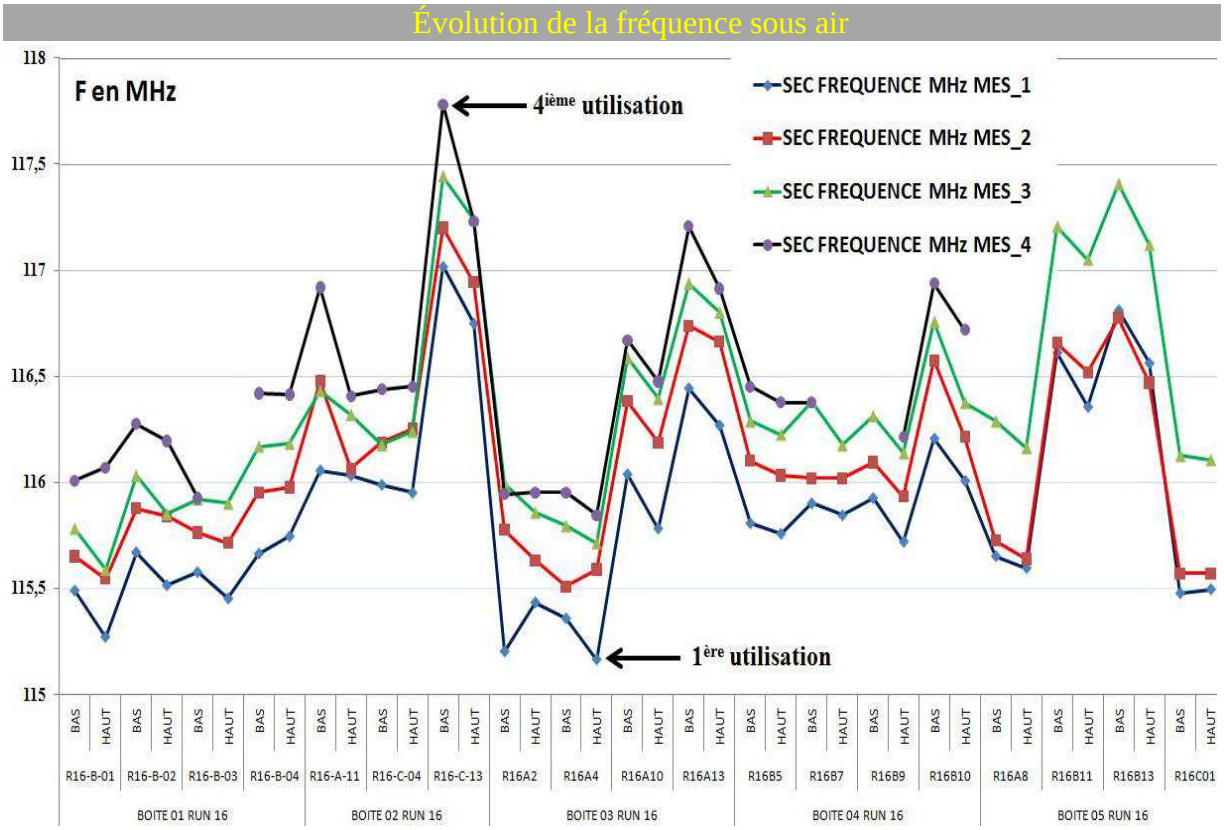


Figure 4-2 Dérives des capteurs au cours des utilisations successives

Ces dérives sont imputées aux traitements chimiques de surface que subissent les capteurs lors des différentes étapes : nettoyage (dont UV-ozone et ultrasons), fonctionnalisations, tests avec utilisation des tampons salins.

Malgré une augmentation importante de fréquence, de l'ordre du mégahertz, après quatre utilisations, aucune diminution significative de l'épaisseur de la couche guidante n'a été mise en évidence. Une hypothèse sur les phénomènes mis en jeu à l'origine de cette dérive systématique est une augmentation de la porosité de la silice **[174]**, modifiant les propriétés mécaniques de la couche guidante (notamment densité, rigidité) et affectant ainsi les conditions de propagation de l'onde acoustique. Afin de limiter l'influence de ce paramètre, un nombre maximum d'utilisations des capteurs a été fixé à 3.

4.2. Greffage des anticorps

4.2.1. Nature des anticorps

Comme mentionné en introduction générale, les anticorps sont utilisés dans ces travaux comme élément de reconnaissance spécifique d'espèces comportant des sites antigéniques cibles. Ces immuno-réactions sont à la base d'un grand nombre de systèmes, notamment les tests ELISA classiquement utilisés en biologie, où les immunocapteurs comme ici, visant une détection intégrée des réactions. Les propriétés des anticorps et les principes mis en jeu dans les réactions immunologiques sont largement décrits dans de nombreux ouvrages ; quelques éléments fondamentaux et proches de nos préoccupations sont exposés dans le mémoire de thèse de *N. Moll* **[169]**. Rappelons seulement ici la structure générale d'un anticorps, Figure 4-1, constitué d'une partie constante, intéressante pour la mise au point d'un protocole de greffage générique, et de deux sites de reconnaissance, où se produiront les réactions de captures spécifiques d'un antigène.

Trois types d'anticorps ont été utilisés dans le cadre de ces travaux (annexe B 2 - Composés biologiques):

- GAM-γ: anticorps de chèvre anti-souris (Goat Anti Mouse) typiquement utilisés comme anticorps de reconnaissance greffés sur la surface du capteur (liaison covalente sur l'agent de liaison GPTS).
- GAM-Po: anticorps de chèvre anti-souris, Po car ces anticorps sont couplés à la peroxydase utilisée comme marqueur.

- ACM4: anticorps monoclonaux de souris spécifiques de bactéries *E. coli* (délivrés par le Centre d'Études du Bouchet – Direction Générale de l'Armement – France).

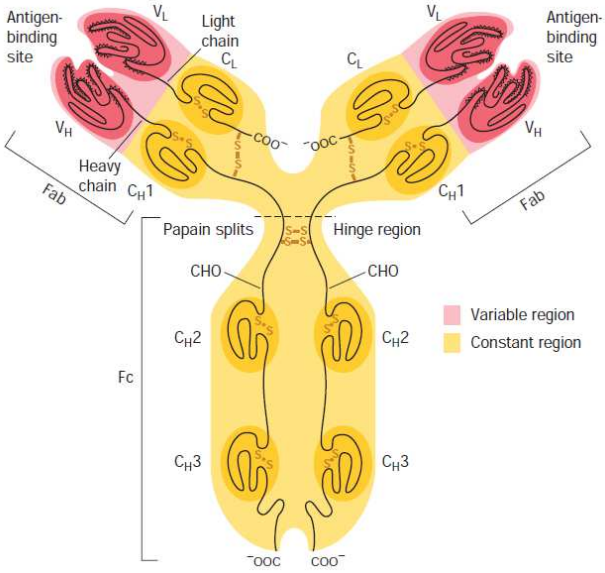


Figure 4-1 Représentation d'un anticorps. ***[175]***

Ces anticorps sont ceux utilisés dans le cadre des travaux de thèse de *N. Moll* **[169]**. Nous les avons repris ici pour une application présentant le même objectif de réalisation d'un immunocapteur pour la détection de bactéries, afin d'évaluer par comparaison, la pertinence des dispositifs proposés. Pour utilisation, ces anticorps sont placés dans une solution de tampon salin à une concentration définie en fonction de l'application.

Avant le greffage des anticorps, la couche de fonctionnalisation est activée (déprotection des groupements époxys) pour permettre les réactions covalentes avec un groupement amide d'anticorps. Le greffage des anticorps en régime statique a également été exposé de manière approfondie en **[169]**, où il est clairement montré qu'il est ainsi possible d'obtenir une couche fonctionnelle stable et dense; il est à noter cependant que l'orientation des anticorps reste aléatoire.

4.2.2. Suivi par le capteur de l'immobilisation des anticorps en régime statique

L'injection des anticorps en régime statique s'effectue ici à l'aide des puces PDMS PHS2. Le protocole expérimental est le suivant :

- **Nettoyage de la surface au TBS :** un volume de 200 µl de TBS est injecté dans chaque cavité de la puce PDMS, ce volume est aspiré et réinjecté trois fois de suite et la cavité est ensuite vidée. Cette opération est elle-même effectuée trois fois.
- **Ligne de base** : dépôt de 125 µL de TBS à la micropipette.
- **Anticorps** : dépôt de 125 µL d'anticorps à une concentration de 90 µg/mL, en solution dans le tampon TBS (ou PBS), à la micropipette.

Au final, chaque cavité contient 250 µL de solution avec des concentrations en anticorps divisées par 2, soit 45 µg/mL, ce qui correspond à une saturation apparente de la surface, comme indiqué dans la thèse de *N. Moll* **[169]**. Sur la Figure 4-2 est présenté un schéma illustrant le protocole de dépôt. Pour chaque capteur, une ligne peut ëtre réservée à un contrôle, avec dans ce cas ajout de 125 µL de TBS (ou PBS) à la place de la solution d'anticorps.

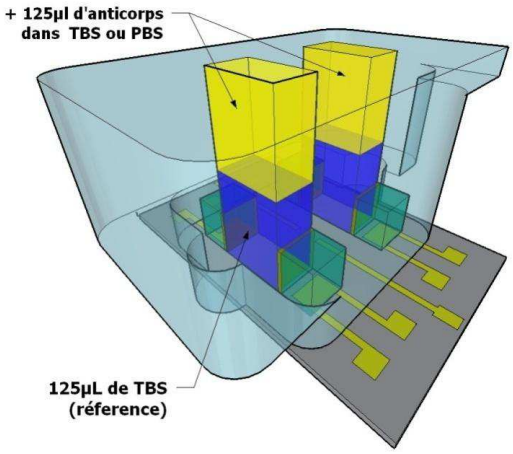
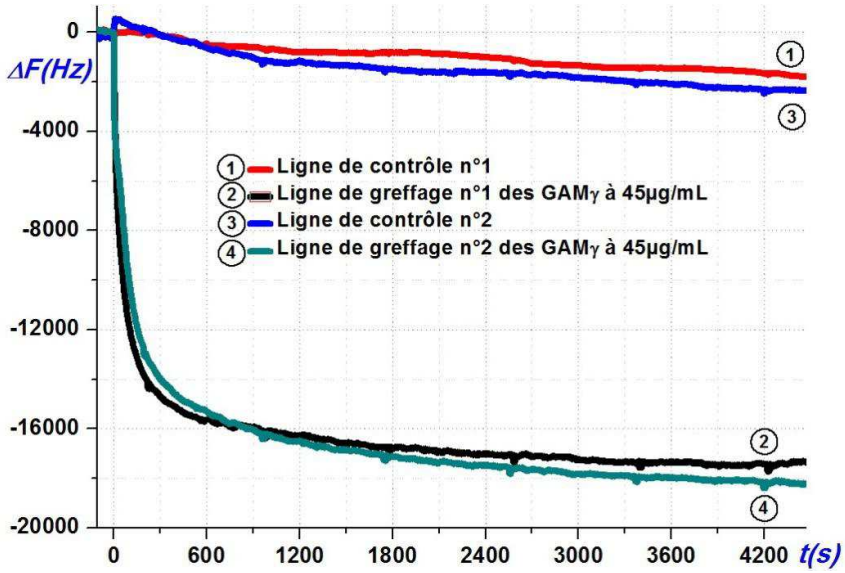


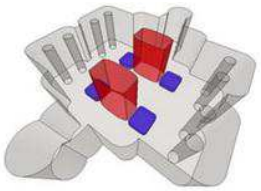
Figure 4-2 Protocole de dépôt des anticorps en statique avec la puce PHS2.

Les variations de fréquence obtenues pour le greffage d'anticorps GAM-γ (tampon PBS), pour deux capteurs différents, sont superposées sur la Figure 4-3. Sur ces courbes, il apparaît nettement une réponse des capteurs à l'immobilisation des anticorps, avec une diminution de la fréquence de l'ordre de 18 kHz, et un régime permanent atteint au bout de quelques dizaines de minutes à 1 heure environ. Des résultats similaires sont obtenus avec l'utilisation de la première cellule de mesure (utilisée lors des travaux de thèse de *N. Moll* **[169]**) lors de tests effectués en parallèle, avec comme avantages par rapport à cette dernière, la séparation des deux lignes à retard, permettant ainsi d'effectuer une ligne de contrôle et la localisation des espèces sur la zone sensible du capteur en diminuant la surface utile dédiée à la détection. Par ailleurs, les lignes de contrôle font apparaître une dérive lente, monotone, atteignant environ 2 kHz après 1 heure. Nous avons pu montrer que cette dérive était en grande partie liée à

l'homogénéisation de la température au niveau de la surface du capteur, celle-ci se faisant de manière diffusive au sein du liquide, comme il a été démontré au § 3-2.

Ces tests de greffage ont également permis de valider la fonctionnalité des puces en PDMS comme réservoirs de test amovibles et réutilisables pour les détections en milieu biologique, avec des résultats assez reproductibles.





Cellule PDMS PHS2

Figure 4-3 Variations de fréquences obtenues lors de l'immobilisation d'anticorps GAM-γ, en régime statique avec la puce PHS2, après fonctionnalisation de surface par le GPTS

4.2.3. Influence du protocole dynamique sur la cinétique de greffage des anticorps

Nous avons également étudié la cinétique d'immobilisation des anticorps avec des puces PHD (PHD1 et PHD2), afin de vérifier leur intérêt, notamment en termes de dynamique de détection. Ces essais visaient également à mettre au point un protocole d'utilisation, en particulier en termes de concentrations des espèces et de débit de l'écoulement.

Le protocole dynamique de greffage des anticorps, réalisé en débit continu, est le suivant:

- **Ligne de base :** du tampon salin est déposé dans les cônes d'entrée et aspiré à l'aide du pousse-seringue jusqu'à remplir la chambre d'analyse. Cette purge initiale est essentielle et permet d'éviter d'emprisonner ultérieurement des bulles d'air dans la cavité. Par la suite, afin de maintenir cette absence de bulles, on veillera à ne pas vider complètement les cônes entre les injections.
- **Anticorps :** après la purge et la stabilisation de la fréquence, toujours sous écoulement, à un débit de 25 µL/min, est injectée la solution d'anticorps à greffer. Les

quantités (250µL) et les concentrations utilisées sont identiques à celles sur le capteur dans le cadre du protocole statique (45µg/mL).

Ligne de base et nettoyage : à la fin de chaque test, la cavité est généralement mise en présence de tampons de référence puis nettoyée avec du détergent, de l'eau courante, de l'eau distillée et de l'éthanol. La cavité est ensuite vidée et la cellule de mesure démontée. Le capteur et la puce PDMS sont alors séchés et exposés aux U.V dans une insoleuse (modèle Gelaire BSB4) pendant quinze minutes, puis stockés dans des boîtes en inox en attente d'une prochaine utilisation.

Le débit optimal de 25µL/min et une concentration, minimum, de 45µg/mL, ont été déterminés à partir d'une série de tests réalisée avec les puces PHD1, avec des débits de 1µL/min à 50 µL/min et avec des concentrations en GAM-γ allant de 5µg/mL à 50 µg/mL.

Des puces PHD1 avec deux hauteurs de chambre d'analyse ont été utilisées lors de ces greffages : 250µm et 1250µm. Avec une hauteur de 1250µm, le temps nécessaire à la saturation de la surface est identique à celui obtenu en régime statique avec la puce PHS2, et plus long que celui obtenu avec une hauteur de 250µm. En effet, en mesurant les temps caractéristiques de réponses du capteur à l'immobilisation des anticorps à 50% et à 90% des valeurs de saturation, on voit que le temps nécessaire pour atteindre les mêmes valeurs intermédiaires est divisé par quatre environ (Figure 4-4).

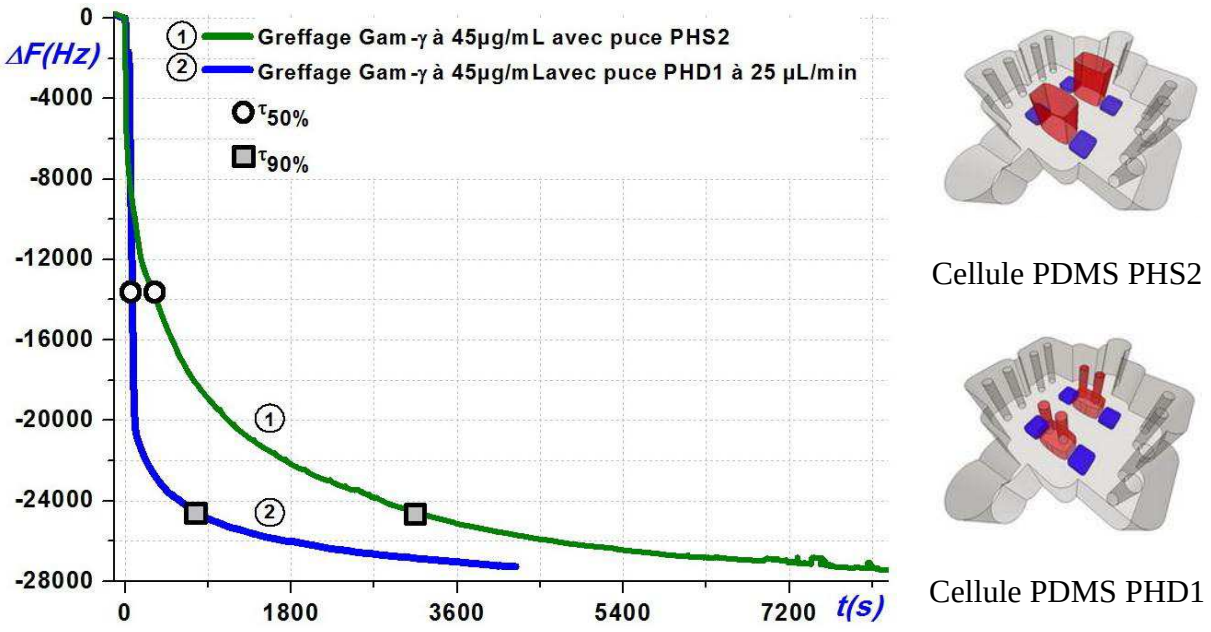


Figure 4-4 Comparatif des réponses fréquentielles aux anticorps entre les deux protocoles, statique et dynamique

L'inefficacité de la puce PHD1 avec une hauteur de cavité de 1250 µm est cohérente avec les éléments théoriques et expérimentaux présentés au § 2.3.4.2. En effet, avec une cavité de hauteur importante, la zone de circulation est éloignée de la surface du capteur, tandis que la zone à proximité du capteur est caractérisée par un régime diffusif. De plus, le film réalisé en collant une puce PHD1 (hauteur de cavité de 1250 µm) sur une lame de verre et en filmant l'écoulement successif d'un liquide incolore et d'une encre bleue a montré que le liquide mettait plusieurs minutes pour remplir à 90% la chambre d'analyse et commencer à atteindre la surface du capteur.

Une seconde série de tests a permis de montrer l'intérêt des puces PHD2, avec des chambres d'analyse encore plus petites (100 à 300 µm de hauteur), et une meilleure distribution des liquides pour améliorer de nouveau les temps de réponse et dans certains cas le seuil de détection. Ainsi, un exemple typique des variations de fréquence obtenues avec ces puces PDMS PHD2 est représenté sur la Figure 4-5.

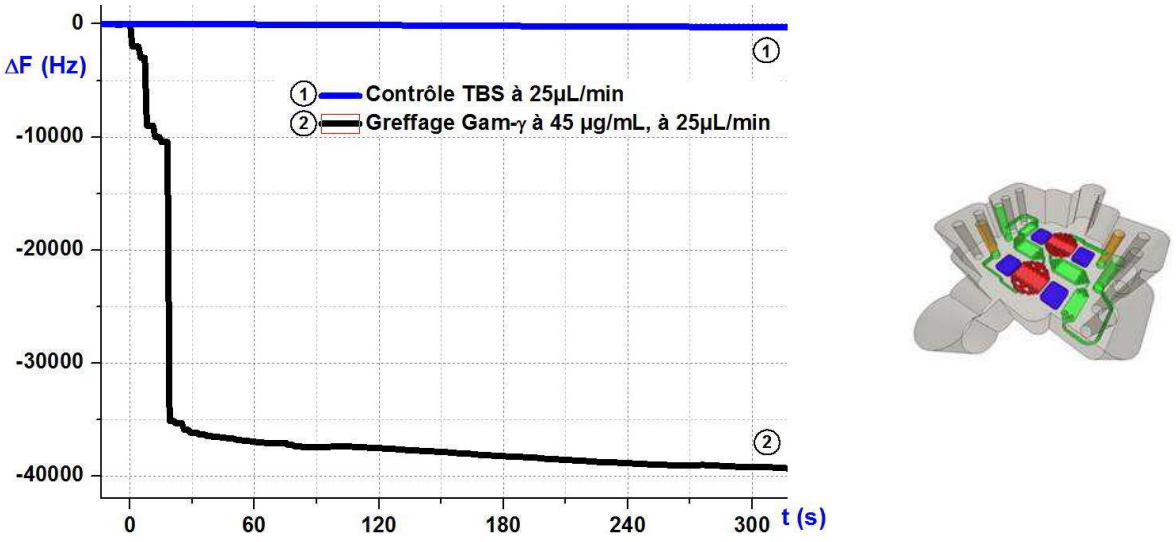


Figure 4-5 Réponses du capteur aux anticorps GAM-γ en régime dynamique avec une puce PDMS PHD2 (avec le motif n° 10)

Ces résultats ont été obtenus avec un débit de 25 µL/min et une concentration en anticorps GAM-γ égale à 45 µg/mL. Lors de ces tests, nous avons pu déterminer un débit optimal de 25µL/min avec les puces PHD2. Il apparaît ainsi une nouvelle diminution importante du temps nécessaire à l'immobilisation des anticorps de deux heures à moins de deux minutes, soit 25 fois plus rapide.

L'amélioration de la vitesse de réponse peut s'expliquer assez facilement. En effet, les anticorps sont acheminés par l'écoulement et non par diffusion, les distances parcourues par

ceux-ci sont plus grandes durant le même laps de temps et ils arrivent plus rapidement et de manière plus proche à la surface du capteur, ce qui favorise les interactions avec la surface sensible. De plus, cette surface est continuellement alimentée en anticorps libres et l'écoulement du fluide à travers le réseau microfluidique limitent la formation d'agglomérats d'anticorps.

Il apparaît nettement sur la Figure 4-5, que le signal de contrôle est très propre, sans variation de fréquence, contrairement aux réponses observées en statique. Au-delà de l'augmentation de sensibilité potentielle espérée dans certains cas, ce nouvel élément est particulièrement important puisqu'il va déterminer le seuil de détection du capteur.

Ces résultats démontrent l'importance de réaliser les tests en régime dynamique. De plus, la manière d'injecter et d'acheminer les liquides vers la surface sensible du capteur, ainsi que la forme des écoulements, vont conditionner de manière importante l'efficacité des interactions entre les espèces à immobiliser et la couche sensible, et par conséquent, la durée de l'expérience.

Comme le démontre la comparaison de la Figure 4-6, l'approche dynamique a permis de diminuer le temps nécessaire à l'accroche des anticorps et à la saturation de la couche sensible, particulièrement lors de l'utilisation de la puce PHD2 où celle-ci démontre son efficacité en diminuant le temps de greffage tout en augmentant la sensibilité du capteur.

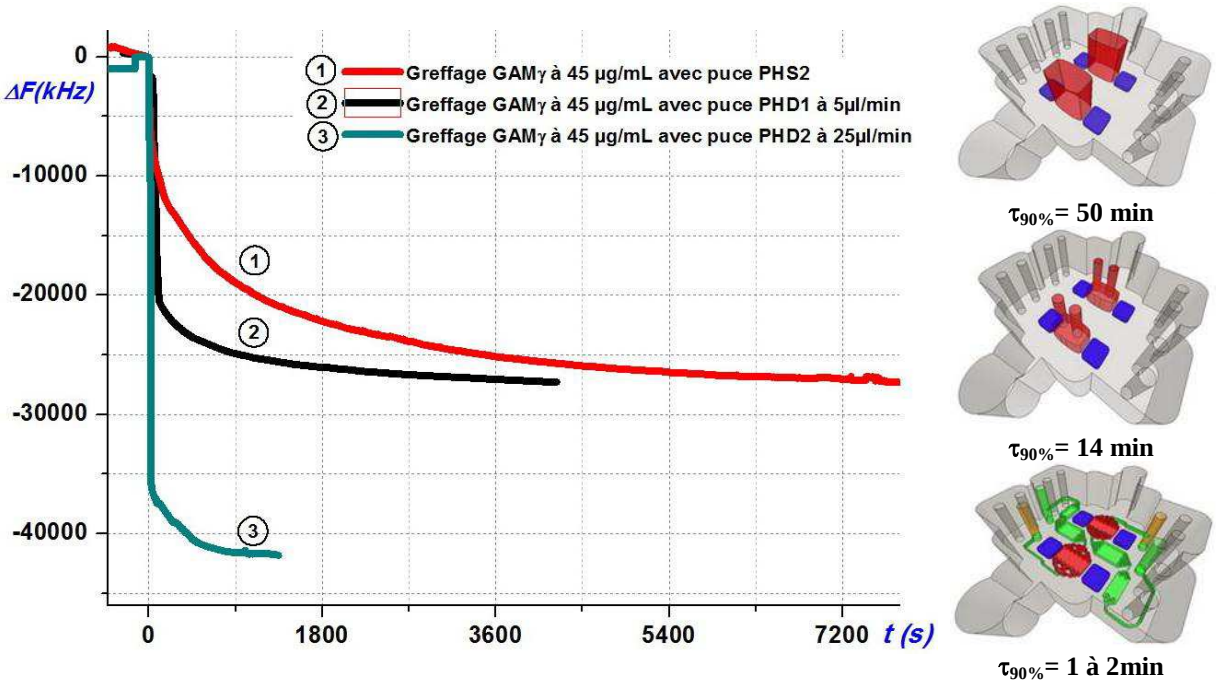


Figure 4-6 Comparaison des différentes cinétiques d'accroche des anticorps Gamγ obtenues à l'aide des cellules PDMS

4.3. Détection des bactéries *E. Coli* en régime statique

4.3.1. Introduction

Les bactéries sont des procaryotes à structure simple, de taille caractéristique entre 0,5 µm et 5µm. Généralement elles peuvent présenter trois types de formes : sphériques nommées coques; spiralées nommées spiridilles ou en bâtonnet nommées bacilles. Leur métabolisme énergétique est basé sur des réactions d'oxydoréduction créées par des substances organiques. En général, les bactéries se rassemblent de diverses manières : par paires comme les diplocoques ou diplobacilles, par tétrades ou en amas comme les staphylocoques. L'observation microscopique de leurs formes individuelles et de l'aspect de plusieurs bactéries (amas, grappes, chaines, palissades) sont encore des éléments utiles pour les identifier. Dans notre cas, l'espèce cible est la bactérie *E. coli* représentée en Photo 4-1.

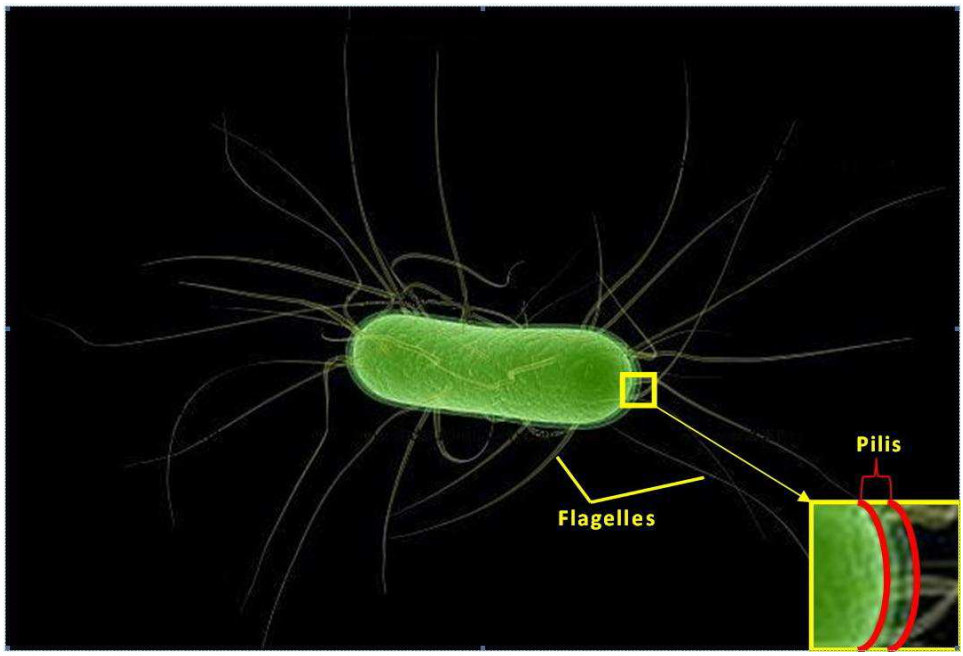


Photo 4-1 Bactérie E. coli vue au microscope. La bactérie est de forme cylindrique, des flagelles lui permettent de se mouvoir. Le très léger halo visible à la surface de la bactérie est le tapis de pilis (cils jouant un rôle dans les phénomènes de conjugaison et d'adhésions)

La souche utilisée a été fournie par le CEB (Centre d'Étude du Boucher, DGA MRE 162) avec l'anticorps monoclonal ACM4 introduit précédemment. Nous rappelons ici que l'objectif visé est la détection de bactéries entières vivantes (l'anticorps de capture doit être spécifique d'antigènes situés à l'extérieur de la paroi). La fonctionnalisation des capteurs est effectuée

par greffage d'anticorps selon des protocoles similaires à ceux présentés précédemment au §***4-2***. De manière générale, après le greffage d'anticorps sur la surface GPTS (et nettoyage pour éliminer les espèces non immobilisées), un agent saturant, le starting Block^{TM} buffer (SBBB) (annexe B 1) est utilisé pour bloquer les sites de reconnaissance non spécifiques (Figure 4-7).

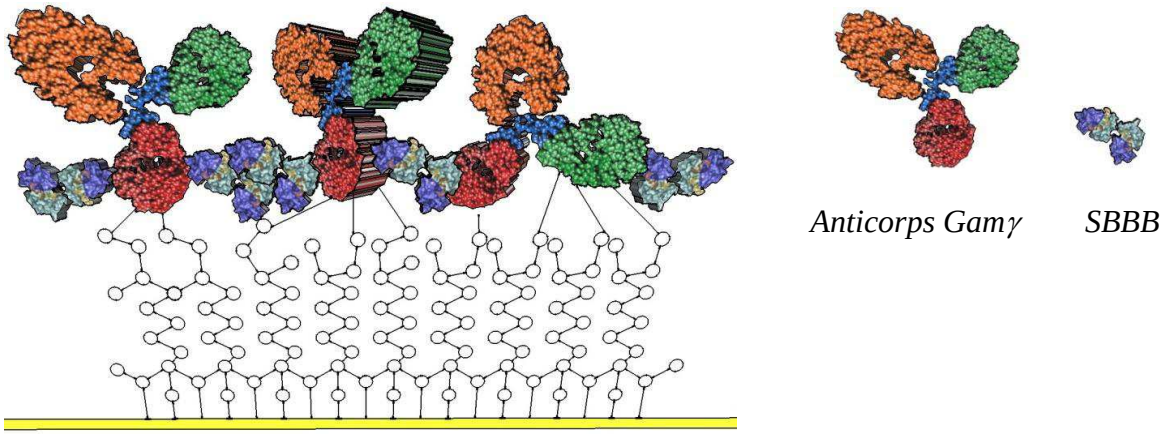


Figure 4-7 Représentation schématique de l'assemblage agent de liaison GPTS-anticorps de reconnaissance-saturant de surface SBBB

Le SBBB est constitué de protéines de plusieurs tailles en solution afin de saturer efficacement la surface du capteur à différentes échelles. Après un nouveau rinçage avec le liquide de référence, le dispositif est prêt pour l'étape de détection elle-même : ligne de base avec liquide de référence puis mesure avec l'échantillon de test. Différentes stratégies de détections, indirectes ou directes, sont présentées dans cette partie, l'objectif final étant l'amélioration de la sensibilité et du seuil de détection du capteur, la diminution du temps nécessaire à la détection et l'optimisation des protocoles de détection.

4.3.2. Détection indirecte en régime statique

Les protocoles typiquement utilisés pour la détection d'espèces par un immunocapteur consistent à greffer en surface du capteur l'anticorps spécifique de l'espèce cible, puis l'immobilisation de celle-ci par réaction Ag-Ac (réaction antigène-anticorps) est détectée par le microcapteur. Toutefois, les expériences sur les capteurs à ondes de Love avaient montré que cette manière de détection ne fonctionnait pas correctement pour les bactéries entières et ne permettait pas d'obtenir un signal utile **[169]**. Une méthode indirecte avait alors été proposée et validée. Pourtant, elle comportait encore quelques lacunes que nous avons

palliées en séparant les deux lignes du capteur et en diminuant la surface utile de détection (voir § 3.3.3.2) afin de concentrer les anticorps sur la surface sensible du capteur et non plus sur toute la surface de silice. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons étudié comparativement l'intérêt des puces en PDMS par rapport à l'ancienne configuration, validant ainsi la nouvelle puce PDMS pour la suite des expérimentations en statique.

La détection indirecte en régime statique comporte trois étapes principales qui sont :

1. le greffage d'anticorps anti-souris de capture,
2. la saturation des sites non spécifiques,
3. l'immobilisation et détection d'un complexe bactérien *E. coli*-anticorps monoclonal de souris spécifique.

Le protocole complet pour ces tests en régime statique, incluant la séparation des deux lignes est le suivant :

1. **Nettoyage :** dans chaque cavité du réservoir est injecté un volume de 200µL de TBS à la micropipette. Ce liquide est ensuite retiré en deux ou trois fois, toujours à la micropipette. Cette opération est réalisée trois fois de suite pour un nettoyage optimal.
2. **Ligne de base :** dans **chaque** cavité vide est injecté un volume de 200µL de TBS.
3. **Anticorps de capture :** après **stabilisation** de la fréquence est ajouté un volume de 50 µL de solution d'anticorps GAM-γ dans du TBS à 225µg/mL. Cela permet d'obtenir un volume final de l'ordre de 250µL de GAM-γ à 45 µg/mL.
4. **Préincubation des bactéries :** environ une heure et demie après l'injection des GAM-γ, des bactéries *E. coli* sont placées en incubation dans une solution de TBS avec l'anticorps spécifique ACM4 à 37°C durant une heure. La concentration en ACM4 souhaitée, de 2 µg/mL, est obtenue en mélangeant 125 µL de bactéries *E. coli* à 125µL d'anticorps ACM4 à 4 µg/mL en TBS.
5. **Lavage :** après stabilisation de la variation de la fréquence due aux anticorps GAM-γ, les cavités sont rincées trois fois.
6. **Ligne de base :** dans les cavités vides est injecté un volume de 125µL de TBS.
7. **Saturation :** après stabilisation de la fréquence, un volume de 125 µL de saturant SBBB est ajouté.
8. **Lavage :** un nouveau lavage est assuré après saturation de la surface en SBBB.
9. **Ligne de base :** dans les cavités vides est injecté ensuite un volume de 125µL de TBS.
10. **Détection du complexe bactérien :** après stabilisation de la fréquence, un volume de 125 µL de suspension de bactéries *E. coli* incubées avec des anticorps ACM4 est

ajouté. Le contrôle consiste à introduire une solution de l'anticorps ACM4 à la même concentration.

11. **Arrêt :** après stabilisation de la fréquence, le contenu des cavités est placé dans des poubelles spéciales pour déchets biologiques ;
12. **Nettoyage :** les cavités sont nettoyées trois fois avec du détergent, vidées de manière à ne laisser aucun liquide susceptible d'entrer en contact avec les parties métalliques ou les pointes de touches à ressorts de la cellule de mesure ;
13. **Nettoyage et stockage des capteurs :** les capteurs et les puces PDMS sont nettoyés au détergent, puis à l'eau distillée, et enfin placés sous rayonnement U.V. durant quinze minutes pour décontamination avant d'être rangés dans leurs boîtes métalliques opaques à la lumière.

Ce nouveau protocole permet un contrôle et une détection simultanés. Les courbes typiques de réponse en fréquence ainsi obtenues lors des phases successives des détections indirectes en statique avec les puces PHS2, et plus spécifiquement la réponse à la détection du complexe bactérien en indirect, sont respectivement représentées sur la Figure 4-8 et la Figure 4-9.

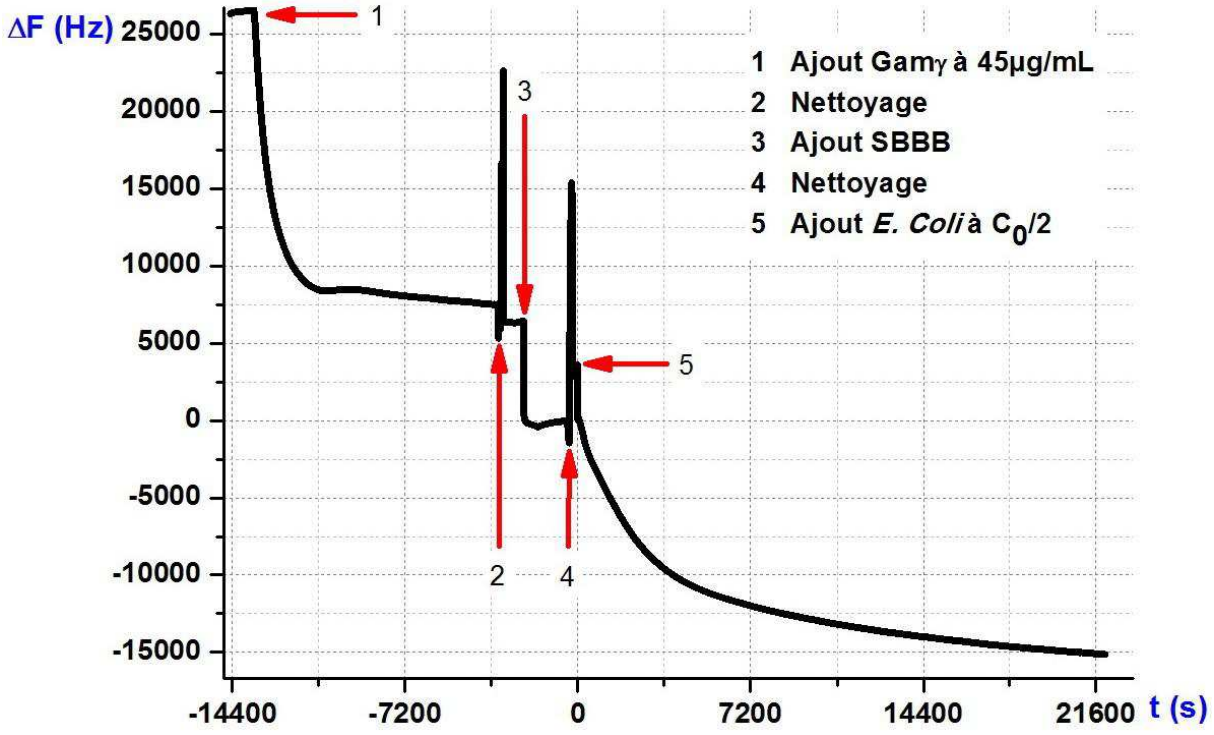


Figure 4-8 Réponse typique complète en temps réel des trois phases successives nécessaires à la détection des bactéries E. coli avec le protocole statique (puce PDMS PHS2)

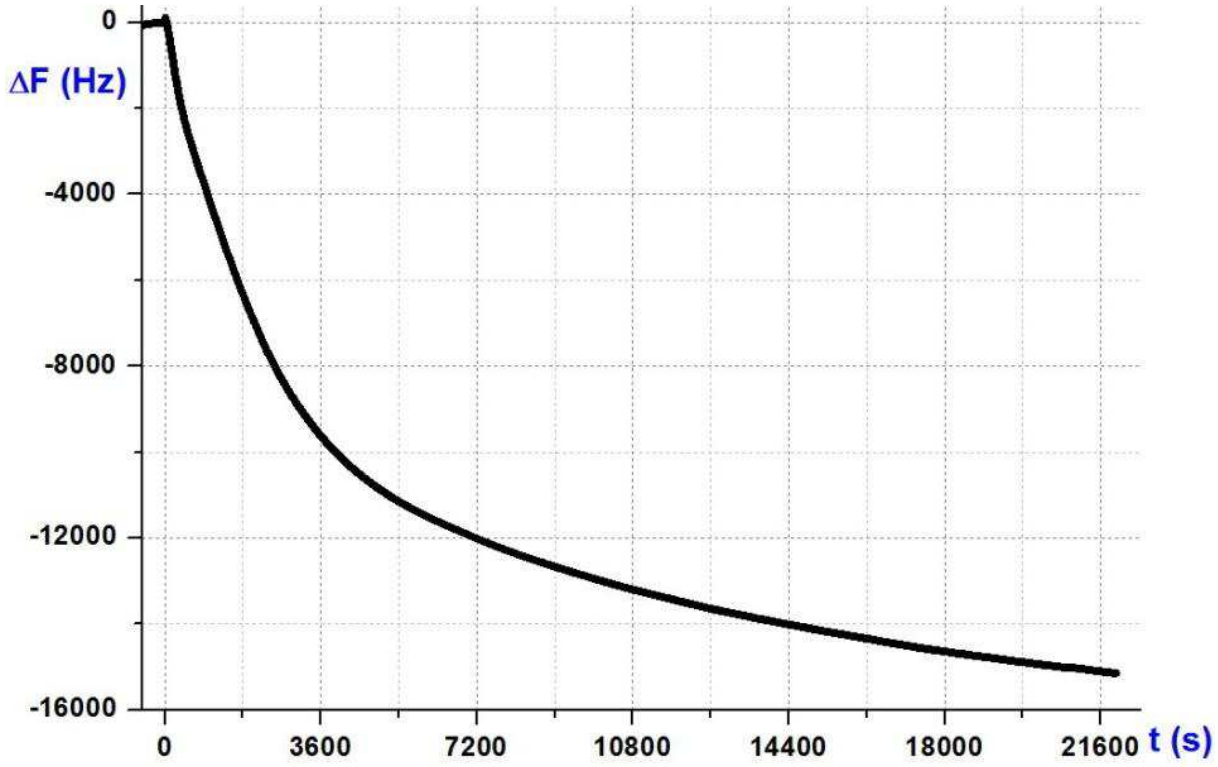


Figure 4-9 Réponse typique en temps réel lors de l'immobilisation des bactéries E. coli avec le protocole statique (puce PDMS PHS2)

Notons que cette réponse est obtenue pour une densité optique initiale D.O=0,6, soit une concentration C_0 d'environ 10^7*E. coli*/mL en solution initiale, ou encore une concentration équivalente sur le capteur de C_0 /4 (après dilution par 2 pour incubation avec les anticorps ACM4 et par 2 lors de l'ajout à la ligne de base pour la détection). Cette figure montre le bon fonctionnement global de ces cellules, avec des résultats en termes de sensibilité et de temps de réponse, similaires à ceux obtenus avec la cellule métallique initiale, comme c'était le cas pour les anticorps.

En conséquent, l'intérêt de cette configuration est d'utiliser un plus petit volume de liquide déposé sur le capteur, avec contrôle et détection simultanées sur un même substrat. Le seuil de détection reste limité par la nature du contrôle (anticorps anti-*E. coli* seuls).

4.3.3. Nouvelle stratégie : utilisation de PEG (polyéthylène glycol) pour la détection directe et indirecte en régime statique

Avec l'utilisation des puces PHS2 en statique, le temps nécessaire à la détection des bactéries est resté le même (Figure 4-8), et la diminution espérée du seuil de détection, fondée

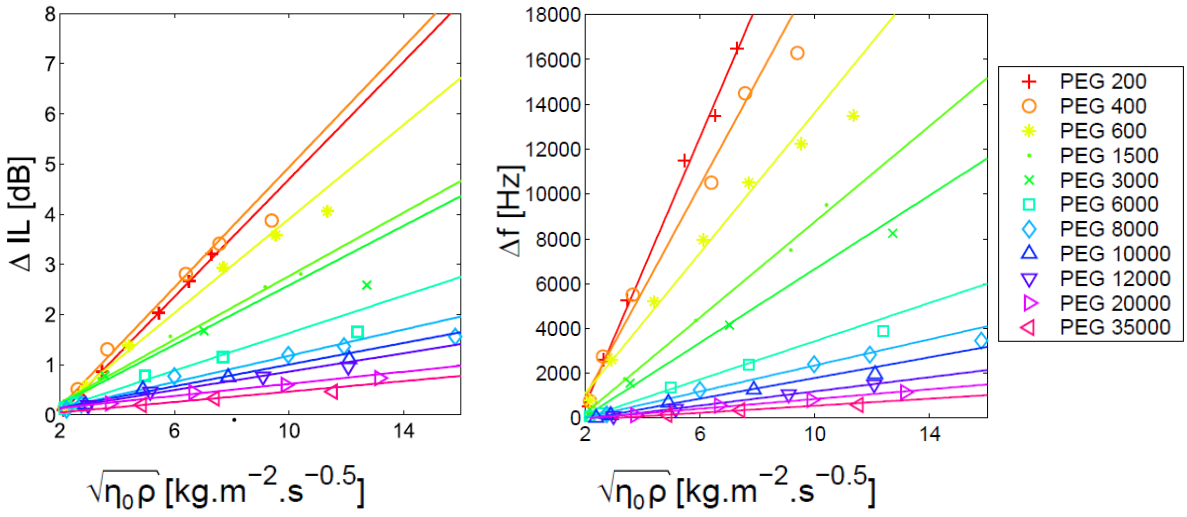
sur l'hypothèse d'une « densification » des bactéries sur la surface sensible du capteur augmentant l'effet surfacique, n'a pu être observée de manière notable.

Aussi, d'autres hypothèses ont été formulées et d'autres pistes ont été proposées et explorées. Le capteur détectant toutes modifications intervenant dans l'épaisseur de la couche de liquide qu'il cisaille, nous avons réfléchi en particulier au fait que, en assimilant le système couche sensible-anticorps-bactéries à des éléments reliés entre eux de manière non rigide, il est possible que le mouvement lié à la propagation de l'onde sous ou au niveau de la couche fonctionnalisée, ne se transmette pas jusqu'aux bactéries, car plus la rigidité augmente, plus grande est la profondeur de pénétration de l'onde. Ainsi, en ne les mettant pas en mouvement, l'onde ne serait pas modifiée par leur présence, sauf à partir d'un seuil, important, au-delà duquel les différents éléments seraient suffisamment denses et donc proches pour constituer un tapis présentant une certaine rigidité pour être mis en mouvement.

Dans ce cas, l'utilisation d'additifs visant à modifier les propriétés viscoélastiques du fluide, pour augmenter notamment la profondeur de pénétration de l'onde et ainsi améliorer la sensibilité du capteur et diminuer son seuil de détection, a été envisagée. Afin d'éprouver cette hypothèse, nous avons effectué dans un premier temps des tests d'influence de solutions de PEG (Poly Ethylène Glycol), déjà étudiées dans la thèse de *V. Raimbault* **[156]** et dont les effets sur les ondes acoustiques sont désormais connus. Notre but était d'augmenter la profondeur de pénétration de l'onde acoustique sans perturbation du signal et surtout sans générer de pertes incompatibles avec le fonctionnement en oscillateur. Ainsi, comme le démontre l'étude théorique du chapitre 2 (équation (2- 57)) une augmentation de la viscosité du milieu entraîne une pénétration plus profonde de l'énergie acoustique, permettant ainsi de solliciter une plus grande épaisseur de liquide et de diminuer le seuil de détection du capteur. De plus, une étude sur l'impact de différentes solutions de PEG (masses moléculaires comprises entre 200 et 35000 g/mol) sur la réponse des capteurs, en termes de variations des pertes par insertion et de variations de fréquences en mode oscillateur, a été réalisée par *V. Raimbault* (*Figure 4-10*) **[156]**. Elle démontre qu'à viscosité identique, les PEG de masses moléculaires élevées influencent moins la réponse du capteur en termes de pertes par insertion et de fréquences en mode oscillateur.

S'il semble ainsi plus intéressant d'utiliser une solution de PEG visqueuse avec un PEG de masse moléculaire élevé, il est cependant nécessaire de déterminer l'impact de ces solutions sur les espèces biologiques en solution, leurs interactions mutuelles et leur cinétique d'accroche sur la couche fonctionnalisée du capteur et sur les cinétiques. Un compromis doit en effet être trouvé entre une solution assez visqueuse pour augmenter la profondeur de

pénétration de l'énergie acoustique, et une longueur des chaînes du PEG pas trop longue afin de favoriser les déplacements des espèces en solution.



a) *b)*

Figure 4-10 Variations expérimentales a) de pertes d'insertion b) de fréquence, avec le capteur à ondes de Love muni d'un microcanal de 2000 µm de large et de 50 µm de hauteur pour les solutions aqueuses de PEG, en fonction de $\sqrt{\mu_0 \rho}$ ***[156]***

De ce fait, dans un premier temps, par souci de comparaison, nous avons réalisé des tests préliminaires de détection en régime statique en indirect avec différentes solutions de PEG (protocole $DRSI_{PEG}$), puis, dans un second temps, des détections en régime statique en direct (protocole $DRSD_{PEG}$) avec ces mêmes solutions de PEG. Pour ces tests, nous avons préparé des solutions de PEG de masses moléculaires et de concentrations massiques différentes, obtenues en dissolvant des copeaux de PEG dans une solution de tampon TBS:

- PEG 6000 à 5%, 10%, 15% ;
- PEG 12000 à 10%, 20%;
- PEG 20000 à 2,5%, 5%, 10%, 20%;
- PEG 35000 à 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 4%.

Le nouveau protocole $DRSI_{PEG}$ est le suivant:

Les étapes 1 à 8 sont identiques à celles du protocole statique en indirect du *§ 4.3.2*, avec greffage d'anticorps GAM γ et saturation par SBBB, ainsi que préparation de bactéries pré incubées avec anticorps ACM4.

9. **Ligne de base avec PEG:** dans les cavités vides est injecté un volume de 125µL d'une solution de PEG dans du TBS à la concentration massique Cm voulue.

10. **Préparation des bactéries dans une solution avec PEG**: on prépare une solution de PEG à une concentration massique de $2C_m$, on en prélève 68µL que l'on mélange à 68 µL de solution de bactéries *E. coli* préincubées, ce qui permet d'obtenir une solution de bactéries préincubées (protocole précédent) avec une concentration massique en PEG égale à C_m et une concentration en *E. coli* égale à $C_0/2$ (5.10^6 *E. coli*/mL). Le contrôle consiste en un mélange de 68 µL d'une solution de PEG à une concentration massique de $2C_m$ et 68 µl d'une solution contenant des ACM4 en même concentration que celle utilisée en incubation des bactéries, soit 2µg/mL.
11. **Détection des bactéries :** après stabilisation de la fréquence, un volume de 125 µL de bactéries *E. coli* préincubées avec PEG est ajouté sur la ligne de mesure. Le contrôle consiste à injecter. Le contrôle consiste à introduire une solution de PEG à la même concentration massique que celle contenant les bactéries, et, contenant des ACM4 en même concentration que celle utilisée en incubation des bactéries, soit 125µL à 2µg/mL.
12. **Arrêt, nettoyage et stockage des capteurs** (voir protocole du §4.3.2).

Le nouveau protocole $DRSD_{PEG}$ est le suivant:

1. **Lavage :** dans chaque cavité du réservoir est injecté un volume de 200µL de TBS à la micropipette. Ce liquide est ensuite retiré en deux ou trois fois, toujours à la micropipette. Cette opération est réalisée trois fois de suite pour un nettoyage optimal.
2. **Ligne de base :** dans chaque cavité vide est injecté un volume de 200µL de TBS.
3. **Anticorps de reconnaissance spécifiques :** après stabilisation de la fréquence, est ajouté un volume de 50 µL de solution d'anticorps ACM4 à 100µg/mL. Ceci permet d'obtenir un volume final de 250µL d'anticorps ACM4 à 20 µg/mL.
4. **Rinçage des anticorps :** après stabilisation de la variation de la fréquence due au greffage des anticorps ACM4, les cavités sont nettoyées et vidées trois fois de nouveau.
5. **Ligne de base :** dans les cavités vides est injecté ensuite un volume de 125µL de TBS.
6. **Saturation :** après stabilisation de la fréquence, un volume de 125 µL de saturant SBBB est ajouté.
7. **Lavage :** un nouveau lavage est assuré après saturation de la surface en SBBB.
8. **Ligne de base :** dans les cavités vides est injecté un volume de 125µL de solution $S_{PEG\text{-}TBS}$, solution tampon de PEG à une concentration massique voulue dans une matrice de TBS.

9. **Détection des bactéries :** après stabilisation de la fréquence, une suspension de bactéries dans 125 µL de solution $S_{PEG\text{-}TBS}$ est préparée et injectée.
10. **Arrêt, nettoyage et stockage des capteurs.**

4.3.3.1. Réponses typiques obtenues avec le protocole $DRSI_{PEG}$

Les résultats obtenus avec le nouveau protocole indirect $DRSI_{PEG}$ avec PEG (6000 à 10%, 20000 à 10% et 35000 à 1%) pour la détection de bactéries *E. Coli* (C_0/4, soit $2.5.10^6$ *E. coli*/mL) sont représentés sur la Figure 4-11 et ceux obtenus avec des PEG 35000 à 2% sur la Figure 4-12. Ces résultats nous amènent à considérer comme bon candidat le PEG 35000 avec une concentration massique comprise entre 1% et 2%. Nous pouvons également remarquer sur la Figure 4-12, le bon comportement du capteur placé dans la cellule de mesure avec céramique chauffante.

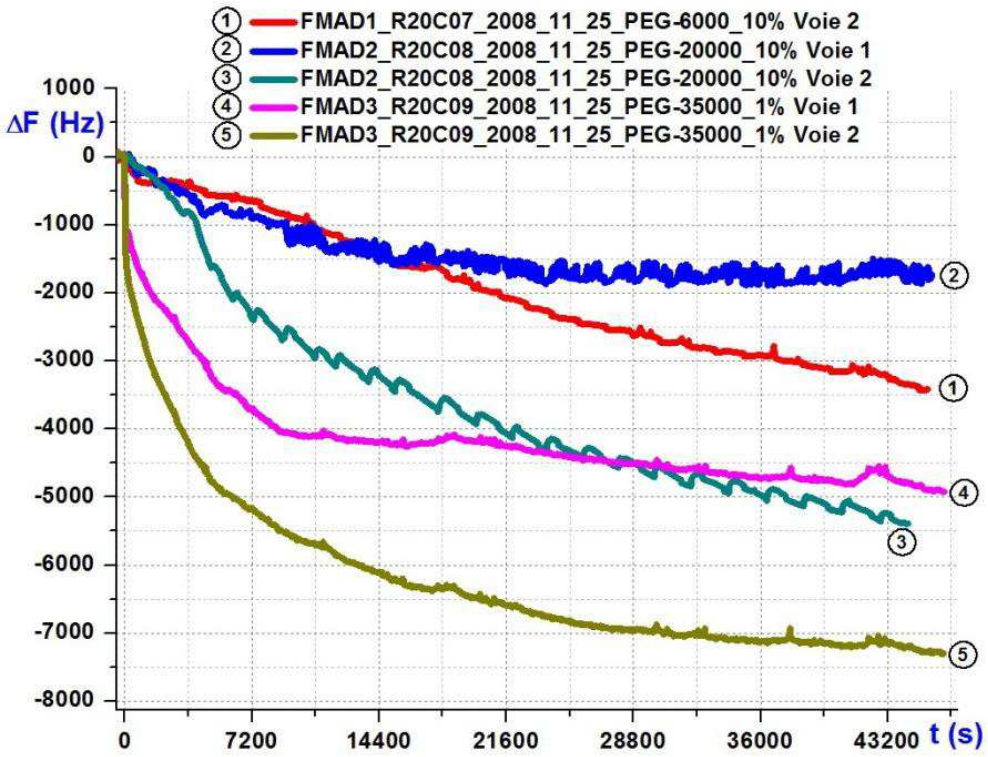


Figure 4-11 Variations de fréquences lors de détection de bactéries en régime statique en indirect avec solutions de PEG 6000 et 20000 à 10% et 35000 1% (puce PDMS PHS2)

Une courbe typique de réponses en fréquence obtenue lors des phases successives des détections indirectes en statique avec les puces PHS2 est représentée sur la Figure 4-13. On y observe le greffage des anticorps récepteurs, puis l'étape de saturation, enfin, la différence

entre contrôle et détection, démontrant l'efficacité de la séparation sur un temps expérimental long (20 heures environ).

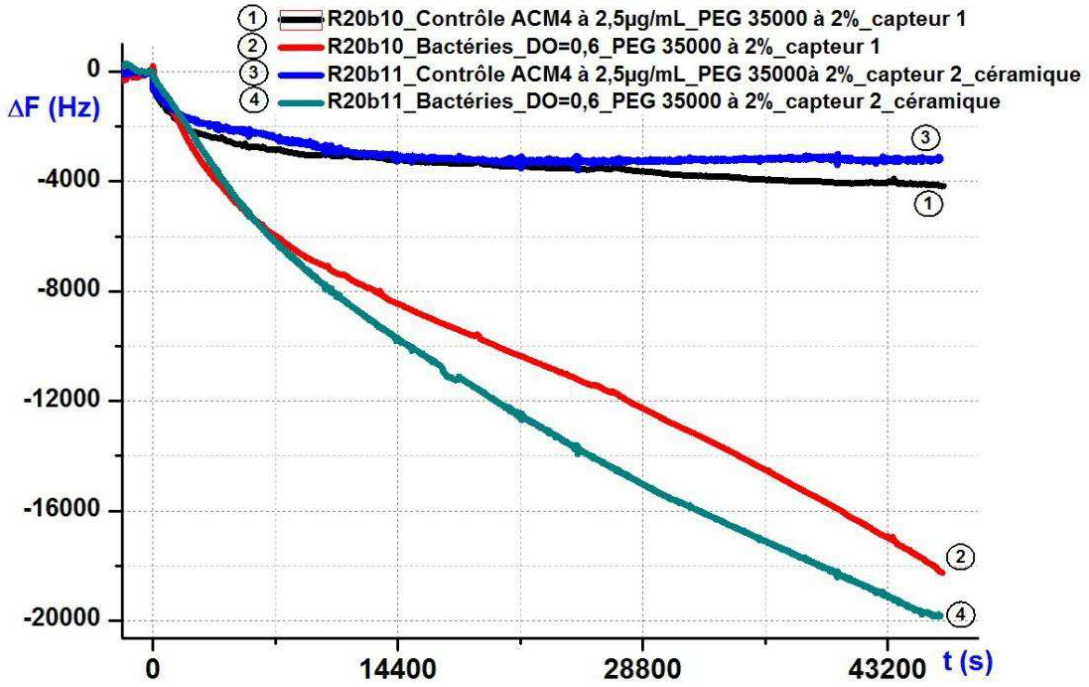


Figure 4-12 Variations de fréquences lors de détection de bactéries en régime statique en indirect avec des solutions de PEG 35000 à 2% (puce PDMS PHS2)

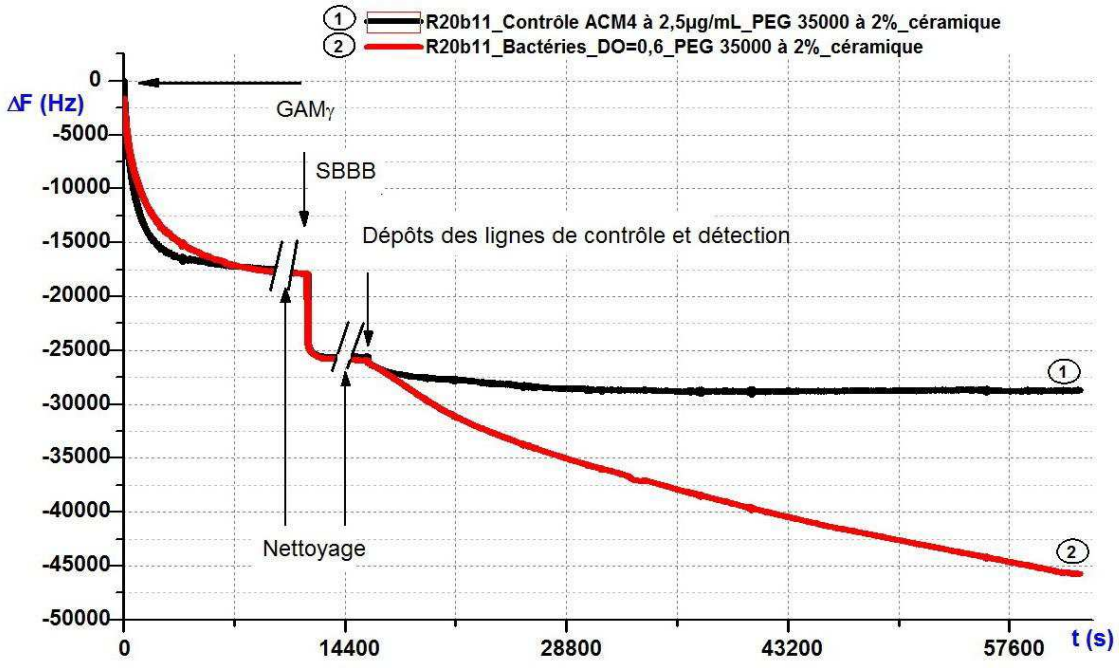


Figure 4-13 Variations de fréquences successives dues au greffage des anticorps, à la saturation de la surface greffée et à la détection de bactérie.
En régime statique en indirect avec des solutions de PEG 35000 à 2% (puce PDMS PHS2)

4.3.3.2. Réponses typiques obtenues avec le protocole $DRSD_{PEG}$

Les résultats obtenus avec le nouveau protocole direct $DRSD_{PEG}$ avec PEG (6000 à 5% et 10%, 20000 à 2,5 et 5%, et 35000 à 0,25%, 0,5%, 1% et 2%) pour la détection de bactéries *E. Coli* sont exposés sur la Figure 4-14.

Comme pour le protocole $DRSI_{PEG}$, ces résultats nous amènent à considérer comme bon candidat le PEG 35000 avec une concentration massique comprise entre 1% et 2%. Des courbes typiques de détection de bactéries *E. Coli* en direct, ainsi que leur contrôles, avec des PEG 35000 à 2%, sont représentées sur la Figure 4-15. Ainsi, si la sensibilité obtenue en indirect (Figure 4-12) est améliorée par rapport aux tests précédents, il apparaît que l'ajout du PEG permet la détection directe des bactéries (Figure 4-14 à Figure 4-16). Ce n'était pas le cas dans les travaux précédents réalisés sans PEG **[169]**, à moins de réaliser un traitement de surface avec une longue chaîne carbonée comme agent de couplage à la place du GPTS, avec les difficultés et inconvénients supplémentaires inhérents.

De plus, le seuil de détection du capteur est amélioré. En effet, la concentration en bactéries *E. Coli* dans la matrice de TBS avec PEG est ici deux fois plus faible et on observe une variation de fréquence deux fois plus importante. Il faut noter cependant que comme avec le protocole $DRSI_{PEG}$, le temps de stabilisation de la variation de fréquence est typiquement multiplié par trois au moins, soit environ 15 heures, contre cinq avec les tests sans PEG : la viscosité du liquide étant plus importante, les temps de diffusion s'en trouvent augmentés. De plus ces tests sont moins reproductibles en termes de variations de fréquence.

Une courbe typique de réponse en fréquence obtenue lors des phases successives des détections directes en statique avec les puces PHS2 est représentée sur la Figure 4-16.

Ainsi, cette nouvelle stratégie permet la détection directe de bactéries sans incubation préalable. Dans ce cas, les anticorps spécifiques sont greffés sur la surface fonctionnalisée par le GPTS. Cette méthode permet de diminuer le seuil de détection, qui n'est alors pas limité par un contrôle correspondant à l'immobilisation des anticorps libres (non greffés sur des bactéries). Par contre, la détection directe nécessite une plus grande quantité d'anticorps spécifiques, plus onéreux que des anticorps commerciaux de type Gam-γ. De plus, pour le protocole hydrostatique utilisé, le temps de détection est élevé par rapport à celui obtenu avec le protocole de détection indirecte sans PEG. Cet allongement du temps de réponse est attribué à une plus grande difficulté de mouvement pour les bactéries, du fait de la viscoélasticité du matériau. De nouveaux essais ont été envisagés après validation pour la détection des cellules de quatrième génération (présentées en suivant), les temps de réponse

pourraient alors revenir à des valeurs compatibles avec nos besoins, après optimisation des différentes étapes du protocole, notamment en termes de concentrations et débits.

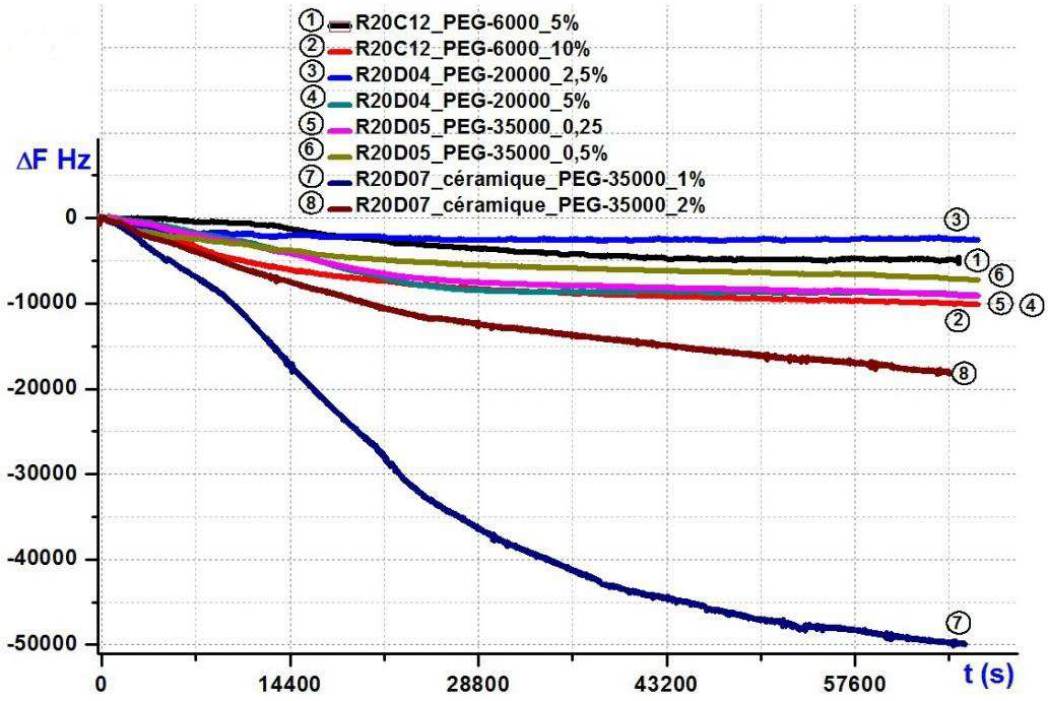


Figure 4-14 Variations de fréquences lors de détection de bactéries en régime statique en direct avec différentes solutions de PEG 6000, 20000, et 35000 (puce PDMS PHS2)

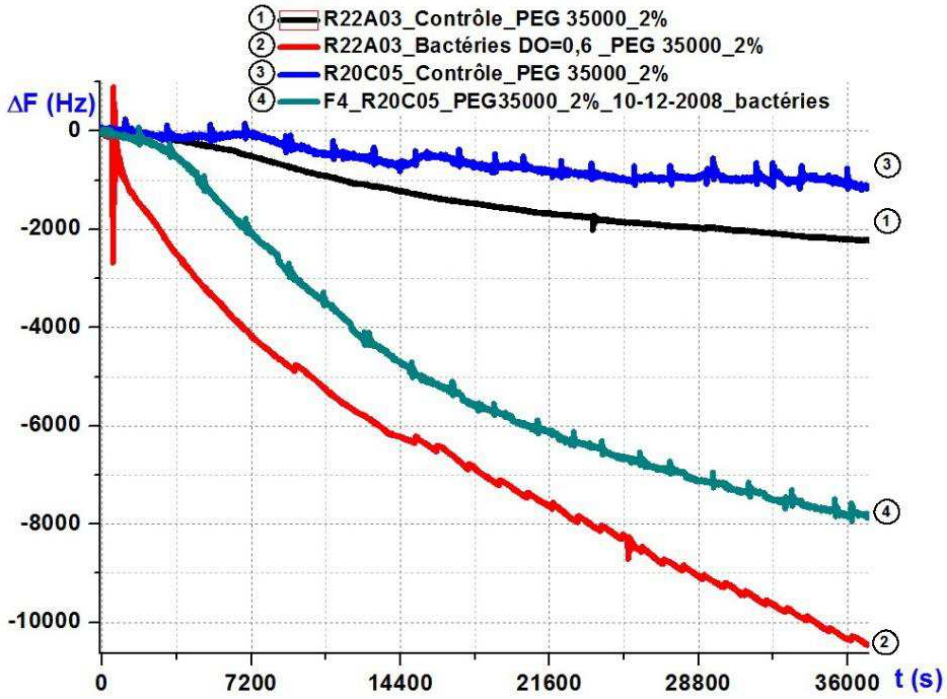


Figure 4-15Variations de fréquences lors de détection de bactéries en régime statique en direct avec des solutions de PEG 35000 à 2% (puce PDMS PHS2)

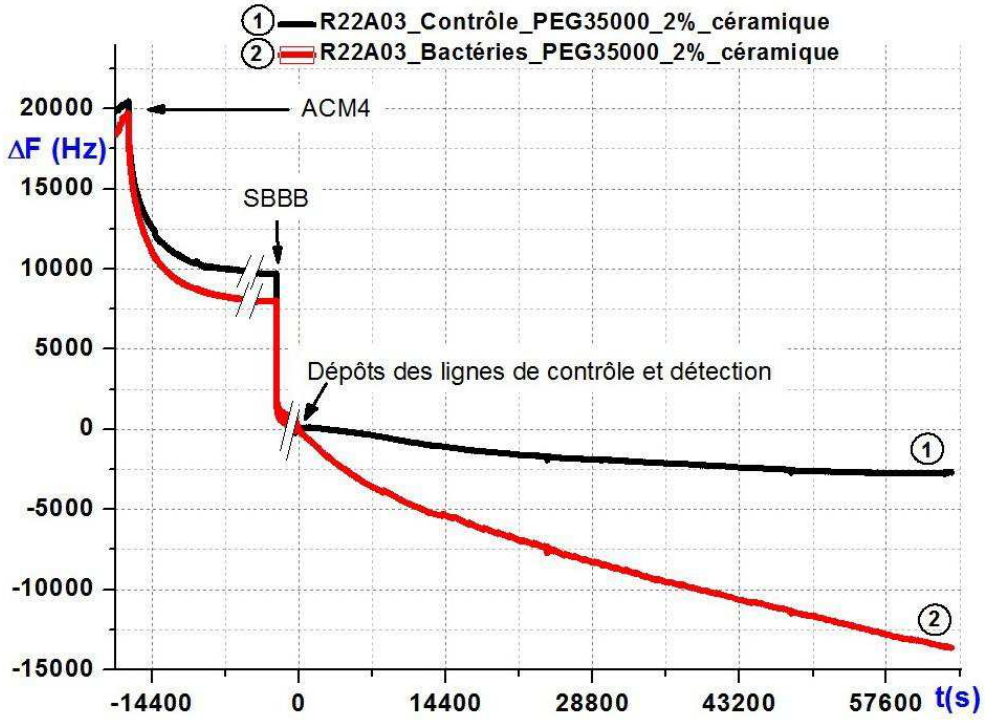


Figure 4-16 Variations de fréquences successives dues au greffage des anticorps, à la saturation de la surface greffée et à la détection de bactéries
En régime statique en direct avec des solutions de PEG 35000 à 2% (puce PDMS PHS2)
courbe n° 1 : ligne de contrôle, courbe n° 2: ligne de détection

4.4. Détection des bactéries *E. Coli* en régime dynamique

4.4.1. Détection indirecte en régime dynamique avec puce PHD2

Comme pour l'accroche des anticorps, utilisant les versions successives des puces, des tests de détection de bactéries *E. coli* en indirect ont été réalisés avec des puces PHD1 et PHD2. Une fois de plus, comme pour les anticorps, il existe une différence de détection en termes de rapidité entre les deux puces. C'est pourquoi, les tests avec la puce PHD2 étant plus significatifs, nous avons choisi de présenter uniquement les résultats obtenus avec cette puce.

Les tests de détection indirecte de bactéries *E. coli* en régime dynamique ont permis de mettre au point un nouveau protocole simplifié et beaucoup plus rapide :

1. **Incubation des bactéries :** à la différence des tests réalisés en statique, la durée du greffage des anticorps et de la stabilisation de l'accroche est ici sensiblement plus courte, ceci nécessite d'incuber d'abord les bactéries avant de commencer le cycle de détection. Les bactéries *E. coli* sont incubées avec des anticorps ACM4 selon le

protocole déjà indiqué en régime statique *(§ 4.3.2* étape 4) pour une concentration d'ACM4 finale égale à 2µg/mL.

2. **Rinçage :** du TBS est injecté à 50µL/min durant 5 minutes (nettoyage des chambres d'analyse).
3. **Ligne de base :** après rinçage des chambres le débit est diminué de 50 à 25 µL/min.
4. **Anticorps de capture (étape illustrée en Figure 4-17):** lorsque le volume de TBS dans le cône d'entrée n'est plus que de 5 µL environ, est injecté un volume de 250 µL de solution d'anticorps GAM-γ à 45µg/mL avec un débit de 25 µL/min. Le dépôt du liquide dans le cône doit être réalisé délicatement afin de ne pas diluer les liquides et ainsi maîtriser les concentrations à chaque étape (Photo 4-2), et surtout pour ne pas provoquer l'apparition de microbulles.

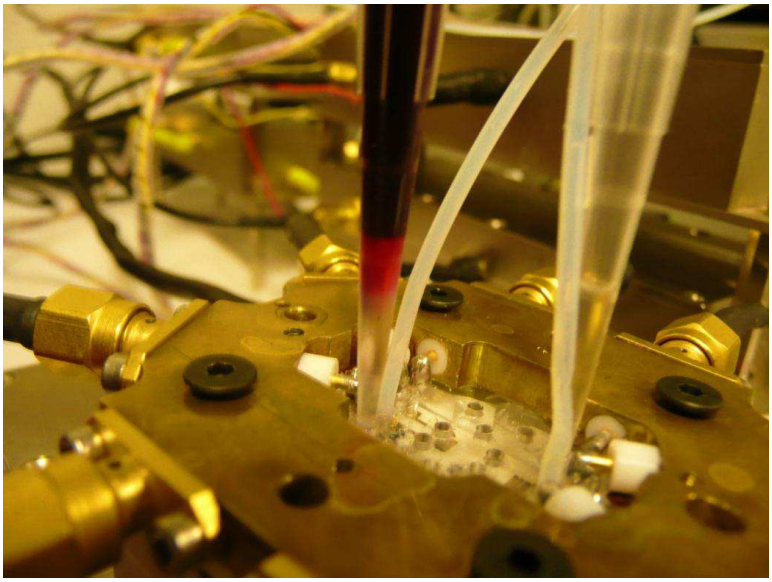


Photo 4-2 Photo du cône après ajout d'un liquide différent. On aperçoit très distinctement la limite entre les deux liquides. Plusieurs minutes après, une très légère diffusion du liquide peut être notée

5. **Lavage :** cette étape, réalisée à un débit de 25 µL/min, permet notamment l'élimination des anticorps libres. Lorsque le volume de TBS dans le cône d'entrée n'est plus que de 5 µL, un volume de 400 µL de solution de TBS est injecté à deux reprises. Cette étape de rinçage permet d'obtenir un signal de référence (ligne de base du capteur, elle sera reprise à l'identique pour l'ensemble des tests en dynamique.
6. **Saturation (étape illustrée en Figure 4-18) :** lorsque le volume de TBS dans le cône d'entrée n'est plus que de 5 µL, est injecté un volume de 250 µL de SBBB à un débit de 25µL/min.

7. **Lavage du saturant :** la même étape que l'étape 5 ci-dessus permet d'assurer l'élimination des composants non immobilisés du saturant SBBB et la référence du capteur.
8. **Détection du complexe bactérien (étape illustrée en Figure 4-19):** lorsque le volume de TBS dans le cône d'entrée n'est plus que de 5 µL, est injecté un volume de 250 µL de bactéries *E. Coli* incubées à un débit de 25µL/min. Comme en statique, un contrôle consiste à injecter 250 µL d'ACM4 à 2µg/mL dans le TBS avec un débit de 25 µL/min.
9. **Arrêt, nettoyage et stockage des capteurs :** lorsque le volume de solution dans le cône d'entrée n'est plus que de 5 µL, est injecté un volume de 400 µL d'eau dé-ionisée à deux reprises, puis un volume de 400µL de détergent à deux reprises. Dès que les réseaux microfluidiques sont complètement vidangés, les capteurs sont extraits puis irradiés aux U.V pendant 15 minutes et enfin rangés dans leur boîte.

Désormais, la chambre d'analyse est constamment immergée, aussi les variations de fréquence ne sont dues qu'aux interactions des différents liquides avec la surface du capteur, permettant de s'affranchir des perturbations dues au changement de milieu (sec/liquide) entre chaque étape de l'expérience et aux perturbations mécaniques lors de l'injection des liquides à la pipette.

Les réponses typiques obtenues avec la puce PHD2 pour le contrôle effectué avec anticorps ACM4, et la détection du complexe bactérien sont représentées sur la Figure 4-22.

Le débit optimal pour cette détection a été déterminé de manière empirique après plusieurs séries de tests, en faisant varier le débit de 5 µL/min à 50 µL/min. Les détections de bactéries E. Coli avec les puces PHD2 sont réalisées à un débit de 25 µL/min. La réponse complète typique de ces tests en régime indirect est représentée sur la Figure 4-23.

En comparant les variations de fréquences et les temps de saturation lors de la détection de bactéries obtenus avec les trois puces différentes (PHS1, PHD1, PHD2) il apparaît de nouveau, comme avec les anticorps, que les temps de détection diminuent de manière très significative. En effet, de 150 minutes avec la puce PHS1, le temps de réponse à 95% (temps nécessaire à la stabilisation de la fréquence) passe à 60 minutes avec la puce PHD1 et à quelques dizaines de secondes avec la puce PHD2. Comme il pouvait être prévisible, la sensibilité du capteur n'a pas augmenté de manière significative aux fortes concentrations, pour lesquelles la surface était déjà saturée avec les tests en régime statique. Par contre, des variations de fréquences significatives ont été obtenues pour des concentrations de $2{,}5.10^{6}$

bactéries, plus faibles que celles correspondant au seuil de détection en régime statique (1.107).

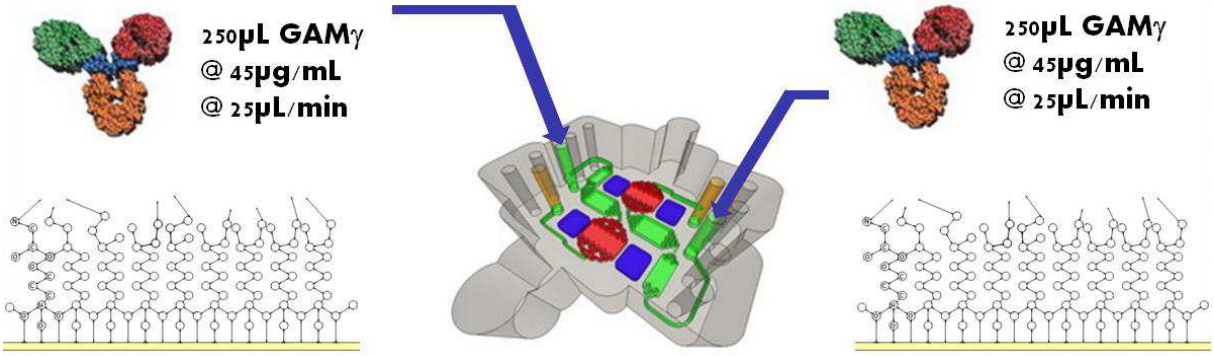


Figure 4-17 Étape d'injection des anticorps GAMγ

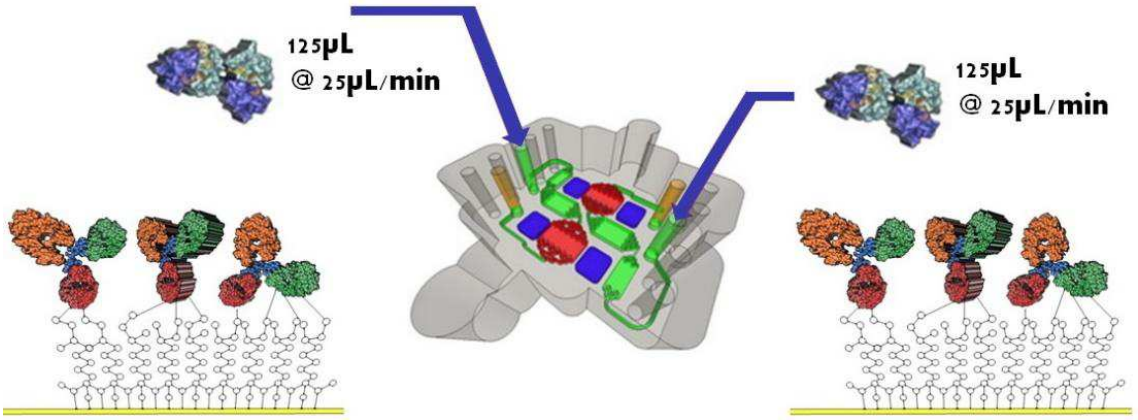


Figure 4-18 Étape de saturation de la surface avec du SBBB

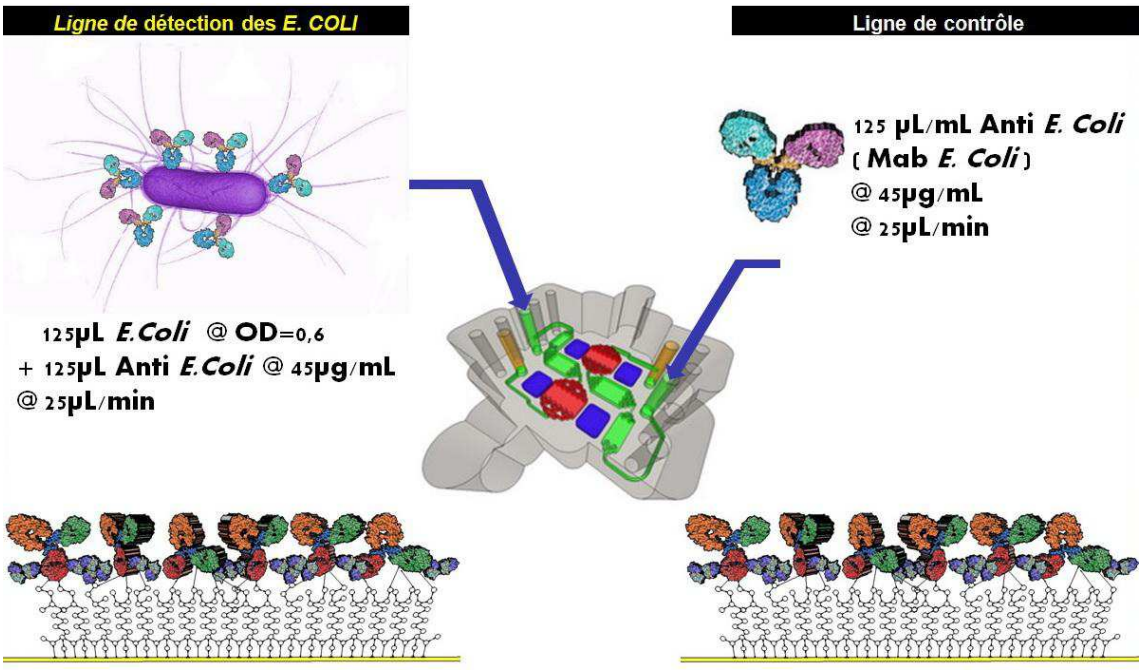


Figure 4-19 Étape de détection du complexe bactérien avec ligne de contrôle

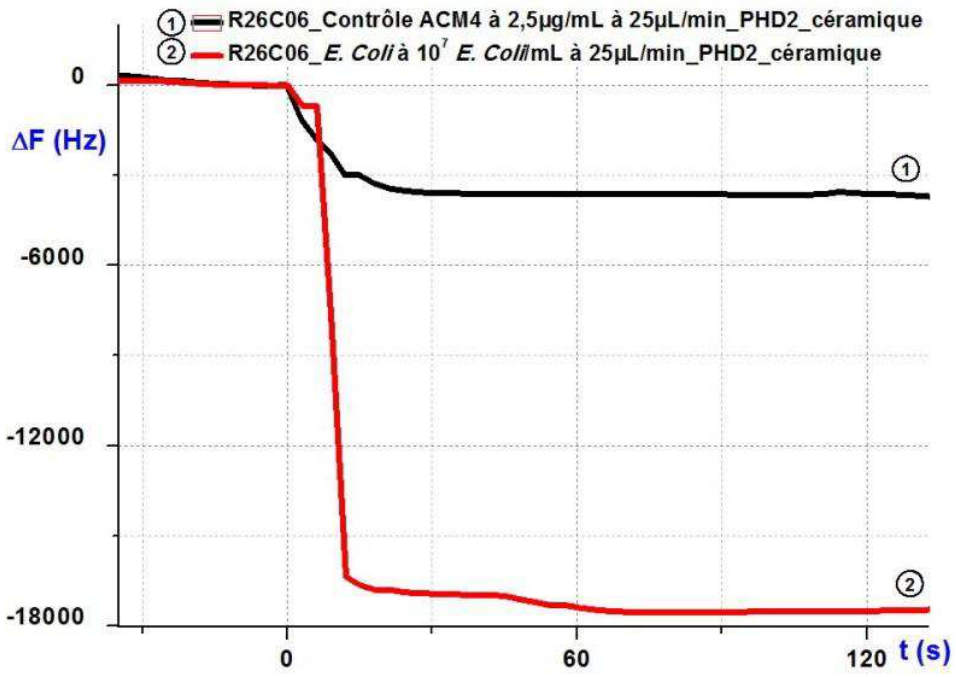


Figure 4-20 Réponse en régime dynamique en indirect avec puce PHD2

Courbe 1 : contrôle ACM4

Courbe 2 : détection E. Coli

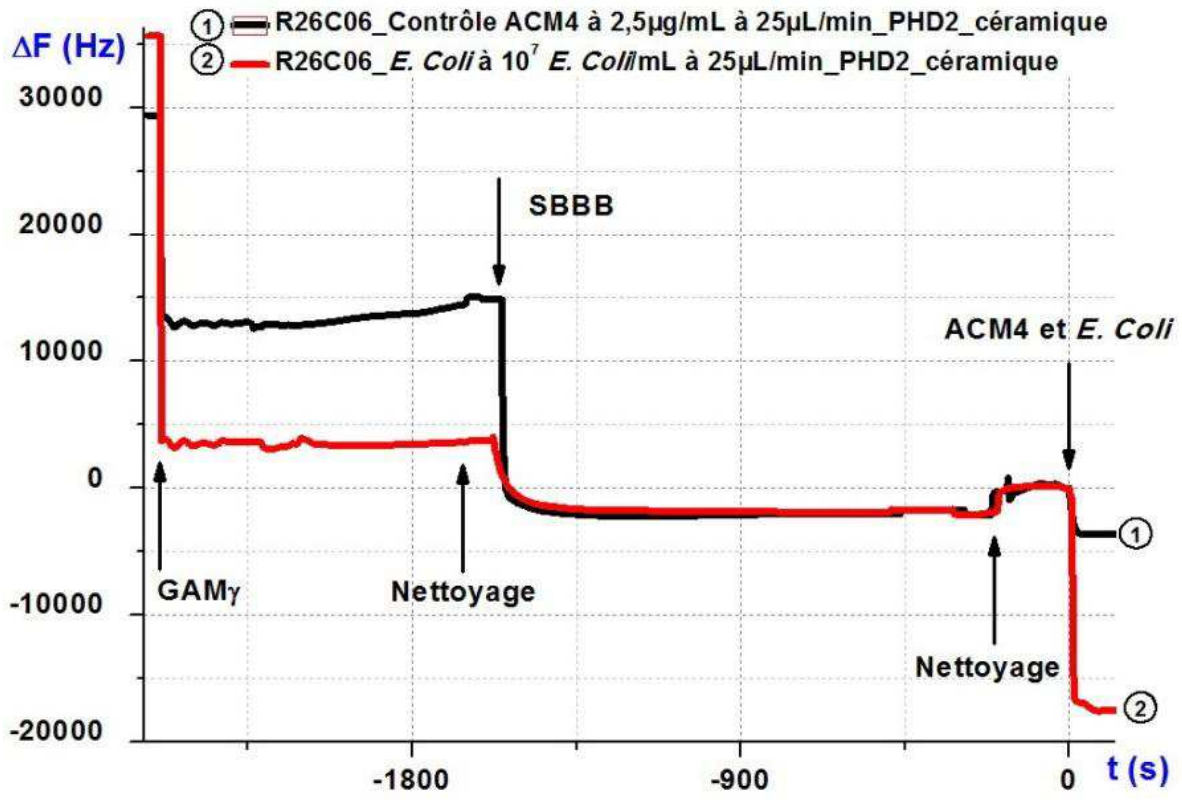


Figure 4-21 Détection indirecte de bactéries E. Coli, puce PHD2

4.4.2. Détection directe en régime dynamique avec puces PHD1avec PEG

Forts des tests d'accroche des anticorps en régime dynamique, ayant prouvé leur efficacité en termes de rapprochement et de mise en interactions des espèces au niveau de la surface sensible du capteur, nous avons réalisé des tests de détection en régime direct, pour pouvoir s'affranchir du contrôle systématique avec les anticorps ACM4 et ainsi tenter de diminuer le seuil de détection.

Nous avons donc souhaité évaluer l'influence du régime dynamique avec la cellule PHD1 sur la possibilité de détecter les bactéries *E. coli* avec un protocole direct. Rappelons qu'aucune détection significative en direct n'avaient pu être obtenue en régime statique, exceptée avec l'utilisation d'un agent de surface à chaîne longue carbonée (couches SAM mises au point lors des travaux de *Duy Hai Dinh* **[176]**) ou à l'aide d'un additif de type PEG pour ajuster les paramètres viscoélastiques de la solution et augmenter ainsi la profondeur de pénétration de l'onde (*§ 4.3.3*).

Le nouveau protocole expérimental de détection en régime dynamique est le suivant :

1. **Rinçage :** du TBS est injecté à 50µL/min durant 5 minutes.
2. **Ligne de base :** après nettoyage des chambres, le débit est diminué progressivement de 50 µL/min à 25 µL/min.
3. **Anticorps de reconnaissance (étape illustrée en Figure 4-22):** lorsque le volume de TBS dans le cône d'entrée n'est plus que de 5 µL, est injecté un volume de 250 µL de solution d'anticorps ACM4 à 20µg/mL avec un débit de 25 µL/min.
4. **Lavage :** Cette étape d'élimination des anticorps libres est identique à l'étape de lavage utilisée pour la détection indirecte en régime dynamique (*§ 4.4.1*).
5. **Saturation (étape illustrée en Figure 4-23):** lorsque le volume de TBS dans le cône d'entrée n'est plus que de 5 µL, est injecté un volume de 250 µL de SBBB à un débit de 25µL/min.
6. **Lavage du saturant :** de nouveau cette étape d'élimination des composés de SBBB non immobilisés est identique à l'étape 4 de nettoyage suite au greffage des anticorps de capture.
7. **Ligne de base :** après nettoyage des chambres est injecté une solution de PEG 35000 à 2% et le débit est positionné à 25 µL/min.
8. **Détection des bactéries (étape illustrée en Figure 4-24) :** lorsque le volume de la solution de PEG dans le cône d'entrée n'est plus que de 5 µL, est injecté un volume de

250 µL de bactéries *E. Coli* dans une solution de PEG 35000 à 2% (de concentration $C_0/2$ correspondant à 5.10^6 bactéries par mL, issue d'une solution de bactéries de concentration C_0 avec une densité optique D.O=0,6), à un débit de 25µL/min.

9. **Arrêt, Nettoyage et stockage des capteurs :** nous utilisons la même procédure que celle du protocole employé pour la détection indirecte en régime dynamique (*§ 4.4.1*).

Les réponses typiques obtenues lors de ces trois étapes avec la puce PHD1 sont représentées sur la Figure 4-25 pour les anticorps ACM4, sur la Figure 4-26 pour le saturant SBBB, et sur la Figure 4-27, pour le contrôle effectué avec du tampon salin TBS (ou PBS), et la détection des bactéries E. coli.

Ainsi, contrairement aux études antérieures **[169]**, la détection directe de bactéries *E. coli* en régime dynamique est possible, comme le démontrent nos réponses typiques de différentes phases de la détection en régime dynamique avec les puces PHD1.

La réponse complète typique de ces tests en régime direct est représentée sur la (Figure 4-28). Comme pour la détection indirecte en régime dynamique, le débit optimal pour cette détection est de 25 µL/min.

Le temps total de l'expérience (du greffage des anticorps à la détection des bactéries) est désormais inférieur à 2h30, avec un temps de détection des bactéries inférieur à 45 minutes pour atteindre le régime permanent, beaucoup moins si la dynamique de la réponse est exploitée. Notre configuration dynamique a ainsi permis de diviser par dix le temps total de la détection directe par rapport à la configuration en statique avec PEG (pour rappel, le temps total de la détection directe en régime statique avec PEG est de 20 heures en moyenne, avec un temps de détection des bactéries de 15 heures en moyenne). De plus, l'incubation des bactéries n'étant plus nécessaire, nous avons un gain de temps supplémentaire et surtout un signal de contrôle très faible, permettant de diminuer le seuil de détection.

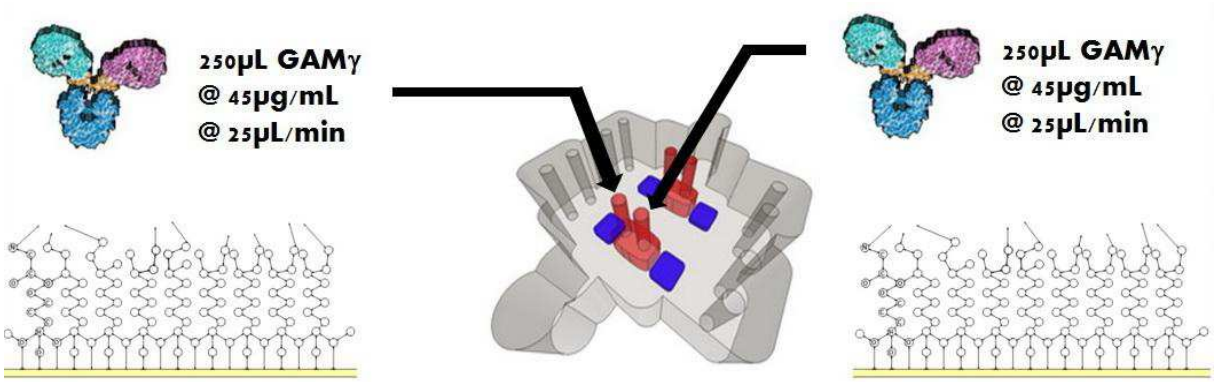


Figure 4-22 Étape d'injection des anticorps ACM4

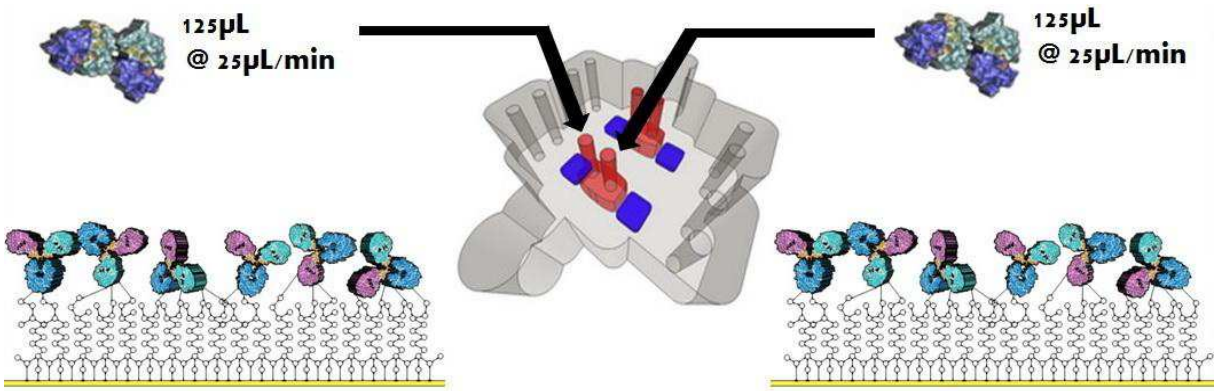


Figure 4-23 Étape de saturation de la surface avec du SBBB

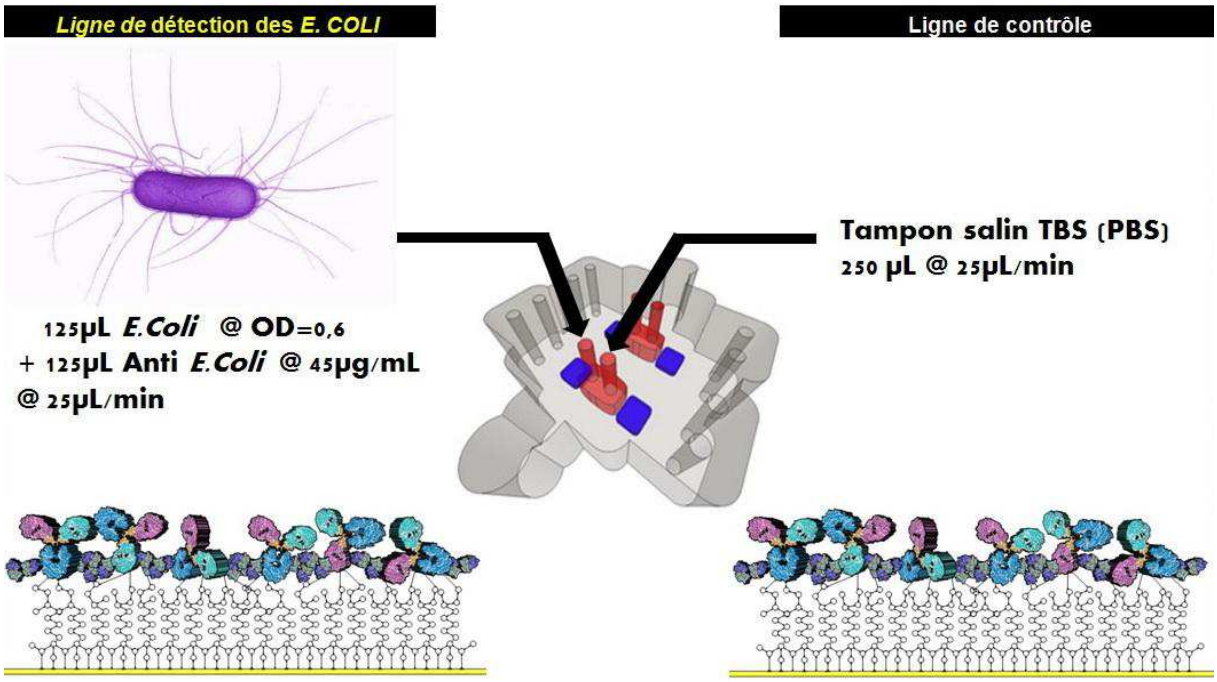


Figure 4-24 Étape de détection du complexe bactérien avec ligne de contrôle, le tampon salin ainsi que la solution de bactéries contienent du PEG 35000 à 2% en concentration massique

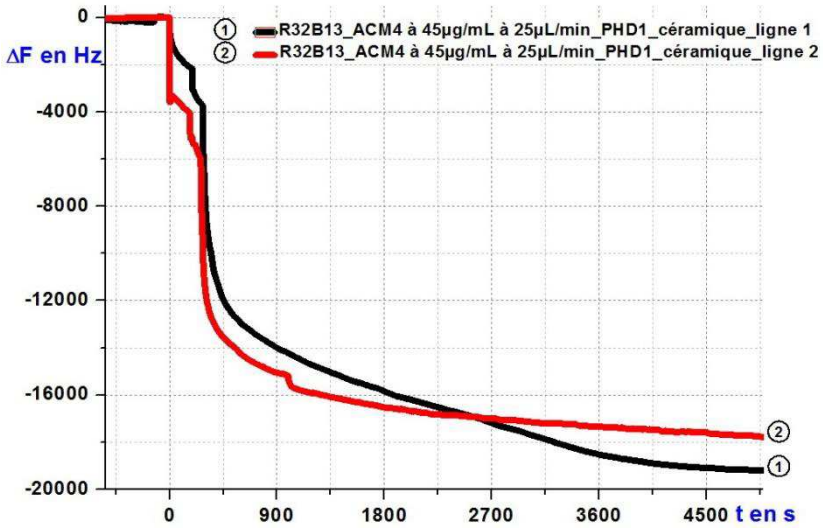


Figure 4-25 Courbes d'accroche des anticorps ACM4 à 200µg/mL avec puce PHD1

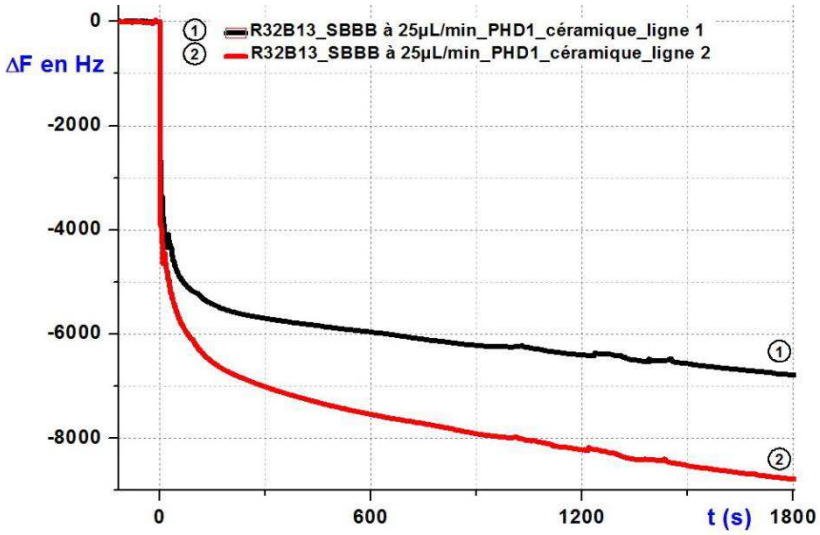


Figure 4-26 Courbes de saturation avec SBBB avec puce PHD1

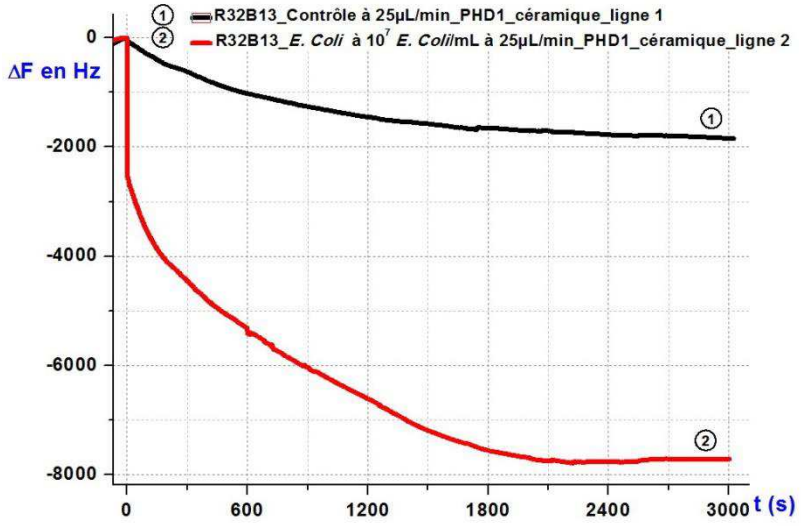


Figure 4-27 Courbes de détection des bactéries et du contrôle avec puce PHD1 en direct avec PEG 35000 à 2%,

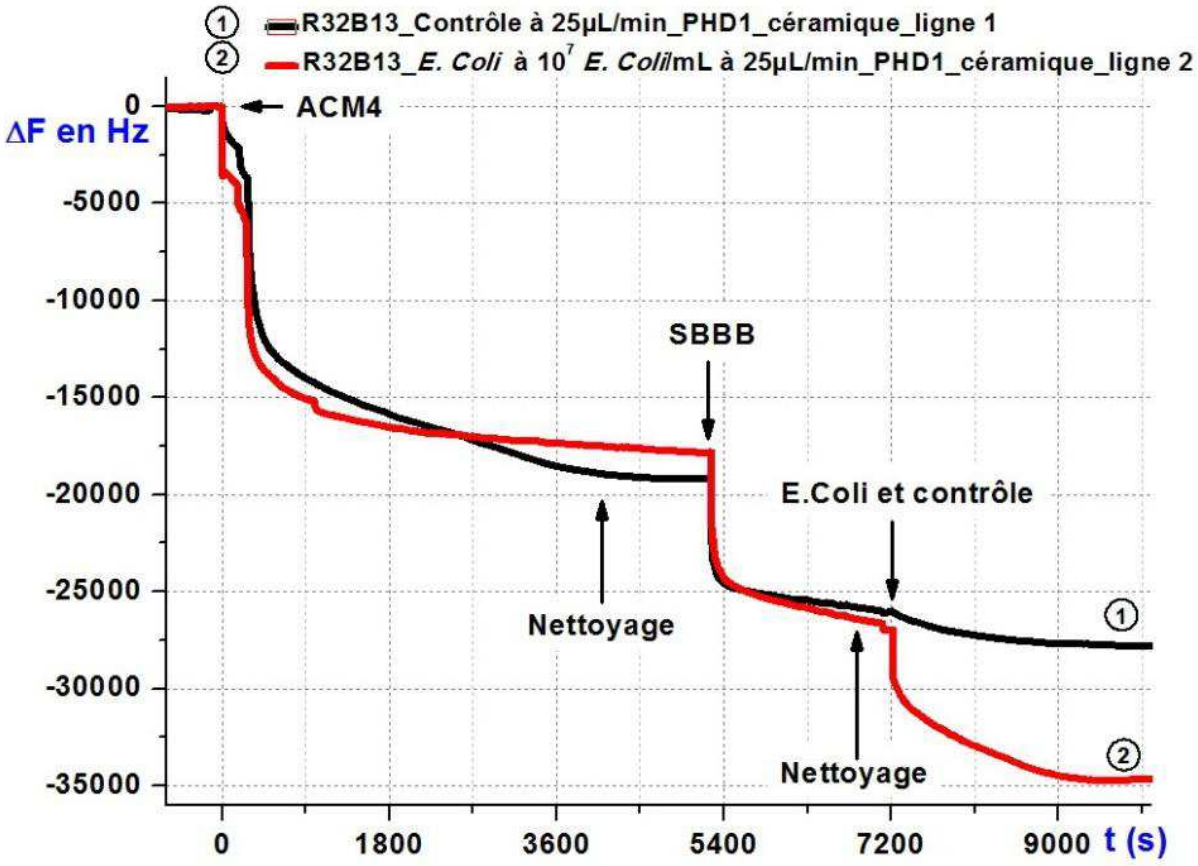


Figure 4-28 Courbes complète de la détection des bactéries en direct avec PEG 35000 à 2% avec puce PHD1;courbe n° 1 : ligne de contrôle, courbe n° 2: ligne de détection

4.4.3. Détection directe en régime dynamique avec puces PHD2

Enfin, pour améliorer encore le temps de détection des bactéries *E. coli* en direct, nous avons évalué l'influence du régime dynamique avec la cellule PHD2. Ces essais de détections directes en configuration hydrodynamique avec les puces microfluidiques PHD2 (Figure 4-29) qui ont pu être réalisés, sont novateurs et très concluants. Le protocole de détection est basé sur celui de § 4.4.2 (détection en direct avec PEG avec la puce PDMS PHD1), cependant, il est encore plus simple que ce dernier et présente par rapport à celui-ci un avantage supplémentaire important: l'utilisation du PEG n'est plus nécessaire. Ceci permet de diminuer significativement le temps total de détection, comme le démontrent les réponses complètes représentées sur la Figure 4-29.

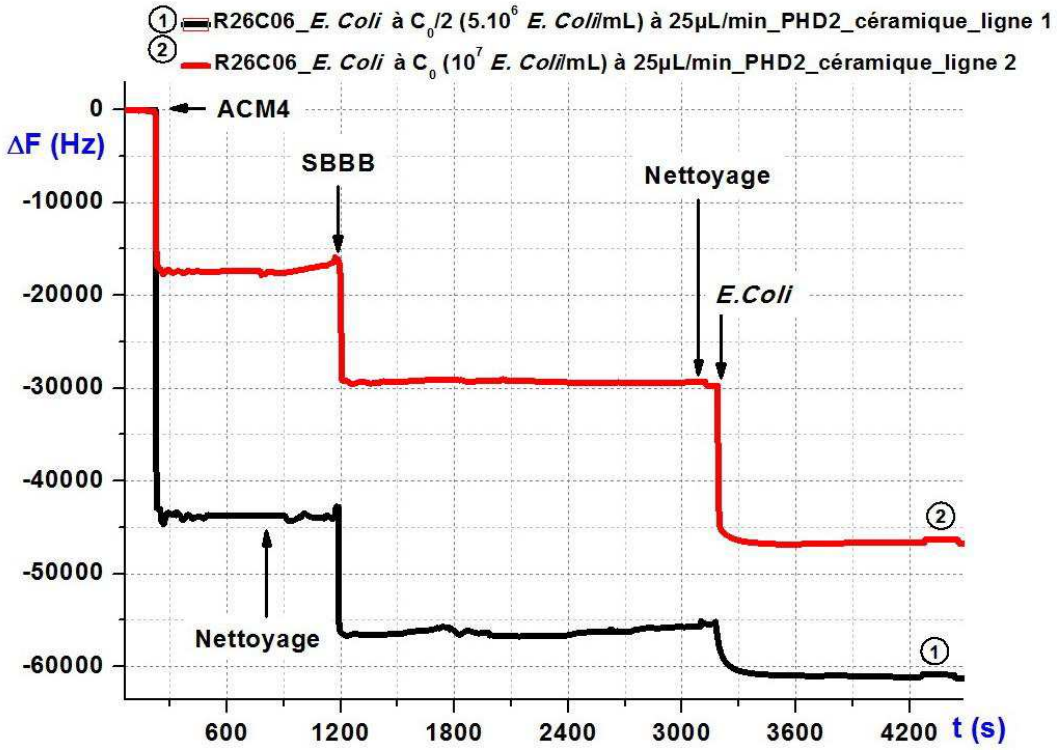


Figure 4-29 Courbes complète de détections des bactéries E. Coli
Détection d'E. Coli à $C_0=10^7$ (courbe n° 1) et 5.10^6 (courbe n° 2) bactéries/mL

Les réponses typiques obtenues lors de chaque étape avec la puce PHD2 sont représentées sur la Figure 4-30 pour les anticorps ACM4, sur la Figure 4-31 pour le saturant SBBB, et sur la Figure 4-32 pour la détection des bactérien *E. coli* à deux concentrations différentes (C_0 et $C_0/2$, avec $C_0=10^7$ *E. coli*/mL).

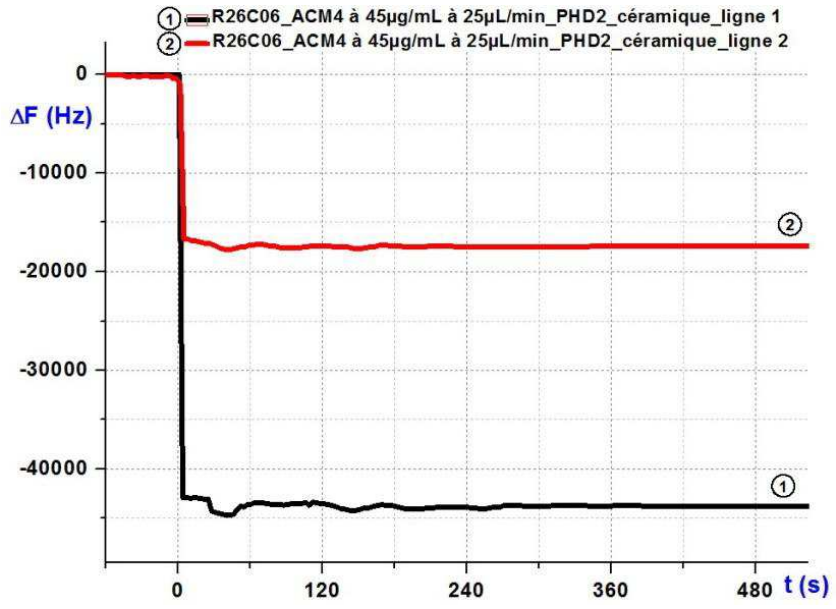


Figure 4-30 Réponses aux anticorps ACM4 (40 µg/m) avec puce PHD2 (débit de 25µL/min)

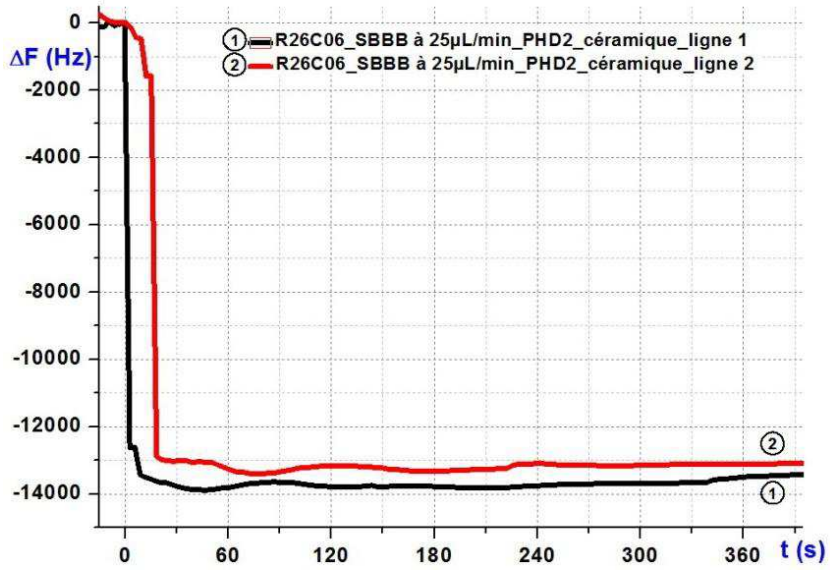


Figure 4-31 Réponses au SBBB avec puce PHD2 (débit de 25µL/min)

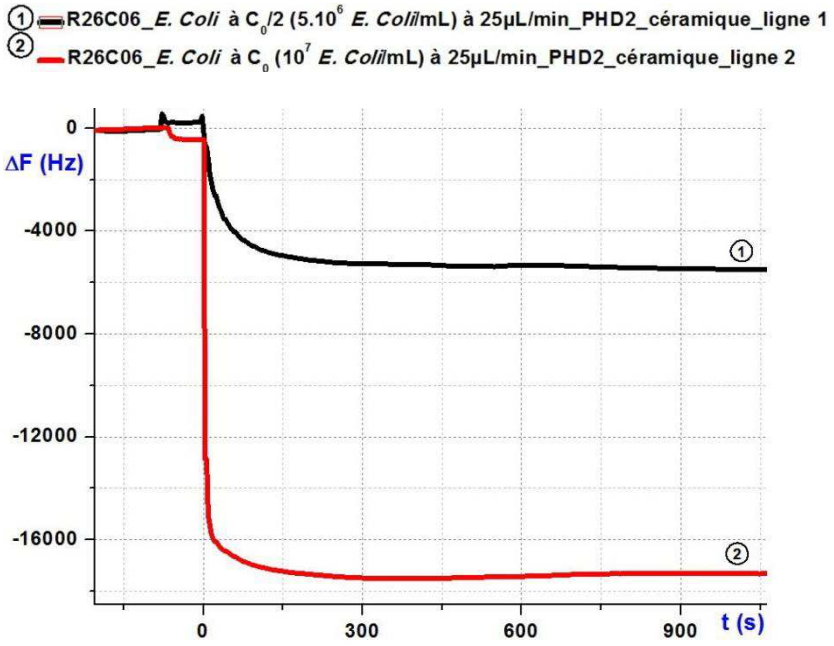
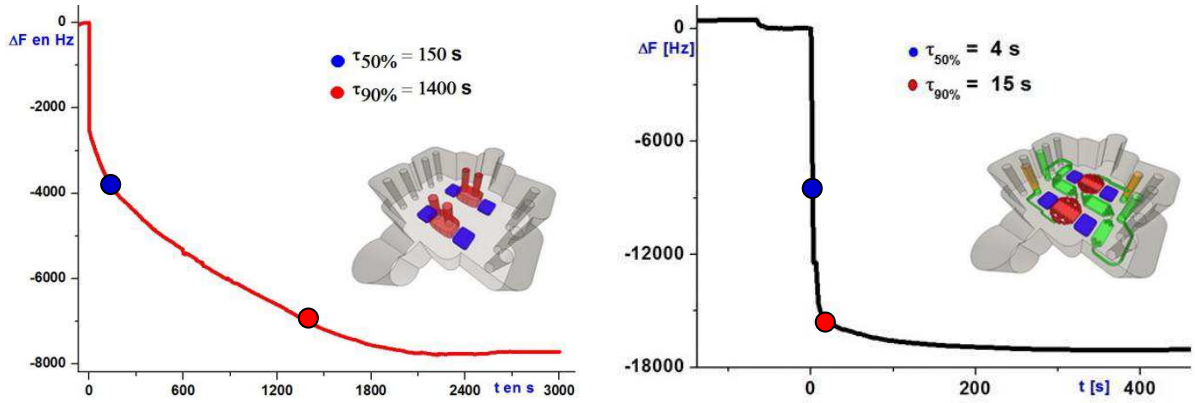


Figure 4-32 Réponses aux bactéries E. coli à C0 (courbe 2) et C0/2(courbe 1), C0=10^7 bactéries/mL, avec puce PHD2 (débit de 25µL/min)

Ainsi, le temps total de l'expérience (du greffage des anticorps à la détection des bactéries) est inférieur à 30 minutes, avec un temps de détection des bactéries inférieur à 3 minutes. Comme le démontre le comparatif de la Figure 4-33 des temps de détection des bactéries *E. coli* en régime dynamique obtenus avec la puce PHD1 (Figure 4-33 (a)) et la puce PHD2 (Figure 4-33 (b)), la configuration microfluidique permet de diminuer de manière significative le temps nécessaire à la détection, comme nous l'avons déjà mis en évidence pour les anticorps.



a) Puce PHD1 *b) Puce PHD2*

Figure 4-33 Comparatif des temps caractéristiques de détection des bactéries E. Coli à 50% et 90% de la variation de fréquence maximale de saturation à un débit de 25µL/min

4.4.4. Influence des géométries sur les cinétiques de réponse

Comme nous avons pu l'observer dans les § 4.2 et § 4.3, les résultats obtenus en termes de cinétique de greffage des anticorps et de détection des bactéries sont fortement dépendants de la géométrie des puces utilisées. L'efficacité de l'acheminement des espèces vers la surface sensible du capteur est quantifiée par le nombre adimensionné de Péclet introduit au chapitre 2. Dans notre cas, nous avons montré que la température était constante sur toute la surface du capteur, aussi le nombre de Péclet correspond au rapport de la quantité de matière apportée par le courant sur la quantité de matière apportée par la diffusion :

$$P_e = \frac{L_c.V}{D} \qquad (4\text{-}1)$$

Où *Lc* est la longueur caractéristique de la cavité, *V* la vitesse du fluide dans la cavité, et D, le coefficient de diffusion de l'espèce considérée.

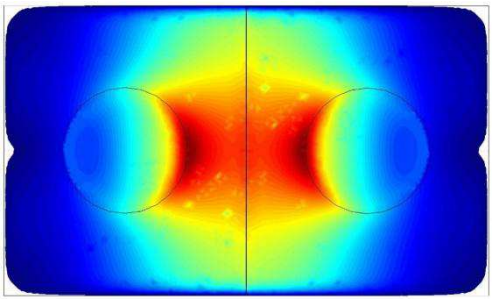
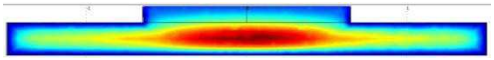
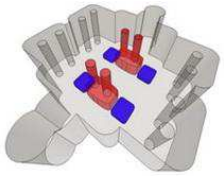
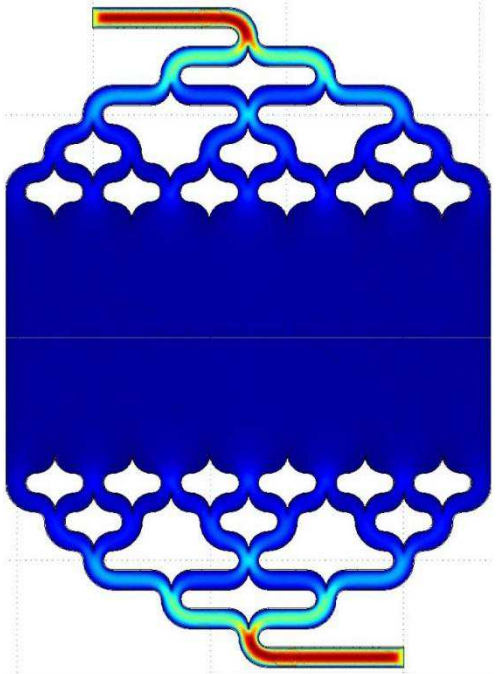
En ce qui concerne la puce PHS1, nous avons un système où le seul mécanisme de transport est la diffusion (§ 2.3.3.2).

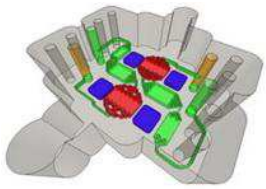
Par contre pour les puces PHD1 et PHD2, les régimes de transport de matière sont différents :

- Pour la puce PHD1, comme on peut l'observer sur le Tableau 4-1, nous avons trois zones d'écoulement distinctes. Une zone centrale rouge-orangée, où les vitesses d'écoulement sont maximales, une zone intermédiaire vert-turquoise, où les vitesses sont moyennes, et le reste de la cavité en bleu clair-bleu foncé, où les vitesses découlement sont faibles.

- Pour la puce PHD2, le fluide s'écoule à la même vitesse à l'intérieur de l'ensemble de la cavité.

Tableau 4-1 Configurations des mécanismes de transport et nombres de Péclet pour les puces PDMS : PHD1 et PHD2

<table>
<tr><td colspan="2">Température</td><td>310 K</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Tailles caractéristiques</td><td>Anticorps</td><td>8.10^{-9} m</td></tr>
<tr><td>E. Coli</td><td>2.10^{-6} m</td></tr>
<tr><td colspan="2">Viscosité µ du tampon salin à 37°C</td><td>0,719 Pa.s</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Coefficients de diffusion D</td><td>Anticorps</td><td>$3,95.10^{-14}$ $m^2.s^{-1}$</td></tr>
<tr><td>E. Coli</td><td>$1,58.10^{-16}$ $m^2.s^{-1}$</td></tr>
<tr><td colspan="3">Puce PHD1</td></tr>
<tr><td colspan="2"> 
Vue de dessus de la cavité
 
Vue en coupe du milieu de la cavité</td><td> 
Longueur caractéristique : 3.10^{-3} m
Plage des vitesses ($m.s^{-1}$)
$2.7.10^{-5} < V < 1.6.10^{-3}$
Plage des P_e des anticorps
$2.5.10^{6} < Pe_{Acs} < 1.22.10^{8}$
Plage des P_e des E. Coli
$5.1.10^{8} < Pe_{E.\ Coli} < 3.10^{10}$</td></tr>
<tr><td colspan="3">Puce PHD2</td></tr>
<tr><td colspan="2"> 
Vue de dessus de la cavité

Vue en coupe du milieu de la cavité</td><td> 
Longueur caractéristique : 3.10^{-3} m
Plage des vitesses ($m.s^{-1}$)
$2.5.10^{-4} < V < 2.5.10^{-2}$
Plage des P_e des anticorps
$1.9.10^{7} < Pe_{Acs} < 1.9.10^{9}$
Plage des P_e des E. Coli
$4.75.10^{9} < Pe_{E.\ Coli} < 4.75.10^{11}$</td></tr>
</table>

Pour ces deux dernières puces PDMS, les vitesses d'écoulement obtenues et les échelles des dispositifs imposent des nombres de Péclet très élevés, et ceci quelle que soit l'espèce transportée. Ce qui signifie, dans nos configurations, que le seul mécanisme de transport de matière est la convection dès lors que le liquide est en mouvement, assurant ainsi une bonne efficacité de transport des espèces vers la surface, et améliorant la cinétique d'immobilisation. De plus, la puce PHD2 permet d'obtenir un gradient de vitesse beaucoup plus faible et une répartition homogène dans la totalité du volume de la cavité, améliorant ainsi la distribution des espèces sur la surface. Nous obtenons ainsi un très bon accord entre les considérations théoriques et les observations expérimentales.

4.5. Conclusion sur les détections de bactéries, perspectives

À partir des réponses précédentes, nous avons atteint nos objectifs en terme d'amélioration des interactions de surface par la mise au point d'un dispositif microfluidique ayant permis de parfaire l'acheminement des espèces biologiques, comme le montre la rapidité de la détection obtenue. Cette évolution significative de la cinétique de la détection à sensibilité équivalente, est un facteur important pour l'amélioration du seuil de détection, limitant l'influence de dérives potentielles.

Par ailleurs, la possibilité de détection directe est également un avantage important, notamment en termes de seuil de détection, alors qu'en protocole indirect, la ligne de référence correspond elle-même à une détection (les anticorps libres).

Néanmoins, la sensibilité même du capteur, évaluée ici à forte concentration d'espèces cibles, lorsque la surface est saturée, n'a pas évolué de manière notable. Ainsi, l'obtention d'un seuil de détection compatible avec les normes en vigueur, nécessite d'améliorer également cette caractéristique.

Conclusion générale

L'objectif initial de nos travaux était l'amélioration d'un immunocapteur à ondes de Love en milieu liquide, et la diminution de son seuil de détection par la mise au point de puces PDMS innovantes.

Dans un premier temps, l'état de l'art nous a permis de contextualiser notre problématique vis-à-vis des recherches actuelles concernant les biocapteurs, et de souligner les avantages et inconvénients des différents types de transducteurs les plus utilisés pour la réalisation de biocapteurs dédiés à la détection d'une multitude d'analytes. Ainsi, en comparaison des travaux existants, nous avons choisi de mettre en place un système simple, sensible, efficace et fonctionnalisable pour la détection d'un spectre large d'analytes, à un moindre coût.

Dans cette perspective, nous nous sommes centrés sur l'élaboration d'une plateforme de biodétection spécifique aux bactéries *E. Coli* vivantes en milieu liquide.

Nos travaux se sont articulés autour de trois axes principaux, à travers la mise au point :

- de puces PDMS biocompatibles calibrées permettant une reproductibilité des conditions expérimentales et une possibilité de parallélisation, tout en améliorant l'efficacité des interactions entre l'analyte et le biorécepteur. De plus la technologie mise au point (moulage par injection) permet d'envisager la production de plusieurs centaines, voire milliers de puces PDMS à l'heure, dont le motif microfluidique est personnalisable grâce à l'utilisation de « wafers » interchangeables ;

- de nouvelles cellules de mesure plus robustes, intégrant un système de contrôle de la température ;

- de nouvelles configurations de tests aboutissant à de nouveaux protocoles de détection hydrodynamique.

Ainsi, dans un second temps, la théorie des fluides nous a permis de comprendre les modes de mouvement des espèces en milieu liquide par diffusion et convection, d'apporter des éléments d'explication des cinétiques de greffage des anticorps et de détection des bactéries en régimes statique et dynamique, et de proposer de nouvelles configurations dynamiques afin de diminuer de manière significative les temps de détection, tout en améliorant le seuil de détection. En effet, la théorie a été confrontée à la pratique à travers le modèle de Kolmogorov et les équations de Navier-Stockes qui ont prouvé la nécessité d'intégrer la

microfluidique dans l'élaboration des biocapteurs. D'ailleurs, la quantification du temps nécessaire à la diffusion des espèces dans notre volume liquide de test en statique a été calculée grâce au modèle de Kolmogorov, et a pu être vérifiée de manière expérimentale grâce à la puce PHS2. Ce résultat ayant validé notre première compréhension des phénomènes d'accroche en statique, nous avons pensé pertinent la configuration de tests en dynamique afin d'optimiser les interactions des espèces au niveau de la surface. Pour ce faire, nous avons mis au point les cellules PHD1 et les tests obtenus ont démontré l'avantage d'utiliser une configuration dynamique. Malgré la diminution du temps, le seuil de sensibilité est resté identique. Pour appréhender ce résultat, le modèle de Navier-Stockes couplé à des simulations numériques a été significatif et a démontré la coexistence de deux régimes (convectif et diffusif) au sein de la puce PHD1, observée d'ailleurs de manière expérimentale. Pour obtenir un régime exclusivement convectif, et ainsi accroître la rapidité de détection, nous avons conçu des puces PDMS PHD2 plus efficaces en termes d'écoulement et de régulation thermique.

En troisième lieu, la compréhension théorique des phénomènes mis en jeu a servi aux innovations techniques exposées dans ces travaux, qui comptent la réalisation d'une cellule de mesure test adaptée utilisant les différentes générations de puces PDMS élaborées dans ce but, grâce aux différents moules créés à cet effet.

La finalité de toutes ces avancées est la mise au point d'un système de détection fiable, efficace, rapide et reproductible. En effet, il est obtenu à chaque protocole de tests, une amélioration croissante et successive de la détection entre les premiers tests de détection indirecte puis directe en régime statique, et les deuxièmes tests de détection indirecte puis directe en régime dynamique.

Ainsi, suite à l'élaboration d'un protocole dynamique et à sa mise en place technologique, les trois nouvelles configurations innovantes au regard de l'unique configuration initiale, aboutissent à:

- la diminution significative des temps totaux de détection; passant d'une détection statique indirecte nécessitant plusieurs heures (~ 10 heures) à une détection dynamique directe simplifiée nécessitant quelques minutes (~ 30 mn).
- la diminution des surfaces utiles corrélée à la réduction du temps de détection.
- la simplification des protocoles de détection.
- l'expérimentation optimisée et simplifiée.
- la résistance accrue de la cellule de mesure.

- une meilleure compréhension des phénomènes sur la réponse de l'électronique, et des mécanismes d'interactions de surface (accroche des bactéries, couche dynamique...).

Ainsi, nous pouvons conclure sur le fait que nous avons répondu à l'objectif principal puisque nous avons mis au point une plateforme de biodétection simplifiée, rapide et pouvant détecter un spectre très large de micro-organismes.

De ces résultats, il est possible de dégager quelques perspectives intéressantes concernant notamment les puces PDMS et les cellules de détection. Plusieurs stratégies complémentaires pourront être associées, en travaillant notamment sur le matériau constituant la couche guidante (et sa structuration), ainsi que sur l'agent de liaison.

Concernant le matériau guidant, des études théoriques ont montré qu'il était possible d'améliorer de manière importante la sensibilité intrinsèque du capteur (*§ 3.2.2*). Ainsi, des solutions commencent à émerger, notamment depuis les travaux de thèse de G. Tortissier **[177]**, suivi de ceux de L. Blanc, menés en collaboration avec C. Boissière, de l'équipe de C. Sanchez (LCMCP, site Collège de France), ainsi que les travaux de P. Masse, en collaboration avec l'ISM dans le cadre de l'ANR Bioalert. Dans ces études, la couche guidante de silice est remplacée par un matériau hybride nanostructuré ou mésoporeux, réalisé par un procédé sol-gel. Au-delà de l'éventuelle possibilité d'augmenter la sensibilité intrinsèque du capteur du fait de la nature du matériau, sa structuration et la nature des surfaces qui en résultent pourraient permettre, en fonction de la taille et des caractéristiques des espèces cibles, d'augmenter la surface de capture (pores) ou l'efficacité du transfert de l'énergie acoustique aux films chimiques ou biologiques en surface et sur une faible épaisseur de liquide adjacent (état de surface). Aussi, d'autres avancées pourront être mises en œuvre par mes successeurs et compléter certainement ces travaux.

Annexe A : Démonstrations des équations

A 1 - Forme adimensionnelle pour la quantité de mouvement

En divisant l'équation de la quantité de mouvement du bilan (2- 41) par ρ et en remplaçant chaque variable par sa variables adimensionnée correspondante du Tableau 2-1, et avec $S_{ij}=\frac{1}{2}\left(\frac{\partial V_i}{\partial x_j}+\frac{\partial V_j}{\partial x_i}\right)$, il vient:

$$\left(\frac{\partial V_i}{\partial t}+V_j\frac{\partial V_i}{\partial x_j}\right)=g_i-\frac{1}{\rho}\frac{\partial P}{\partial x_i}+\frac{\mu}{\rho}\frac{\partial}{\partial x_j}\left(\frac{\partial V_i}{\partial x_j}+\frac{\partial V_j}{\partial x_i}\right)$$

$$\left(\frac{\partial\left(V_0V_i*\right)}{\partial\frac{L_0}{V_0}t*}+V_0V_j*\frac{\partial V_0V_i*}{\partial L_0x_j*}\right)=g_i-\frac{1}{\rho}\frac{\partial P_0P*}{\partial L_0x_i*}+\frac{\mu}{\rho}\frac{\partial}{\partial L_0x_j*}\left(\frac{\partial V_0V_i*}{\partial L_0x_j*}+\frac{\partial V_0V_j*}{\partial L_0x_i*}\right)$$

$$\frac{V_0^2}{L_0}\left(\frac{\partial V_i*}{\partial t*}+V_j*\frac{\partial V_i*}{\partial x_j*}\right)=g_i-\frac{P_0}{\rho L_0}\frac{\partial P*}{\partial x_i*}+\frac{\mu V_0}{\rho L_0^2}\frac{\partial}{\partial x_j*}\left(\frac{\partial V_i*}{\partial x_j*}+\frac{\partial V_j*}{\partial x_i*}\right)$$

En divisant par $\frac{V_0^2}{L_0}$:

$$\frac{\partial V_i*}{\partial t*}+V_j*\frac{\partial V_i*}{\partial x_j*}=\frac{g_iL_0}{V_0^2}-\frac{P_0}{\rho V_0^2}\frac{\partial P*}{\partial x_i*}+\frac{\mu}{\rho V_0L_0}\frac{\partial}{\partial x_j*}\left(\frac{\partial V_i*}{\partial x_j*}+\frac{\partial V_j*}{\partial x_i*}\right)$$

Soit

$$\frac{\partial V_i*}{\partial t*}+V_j*\frac{\partial V_i*}{\partial x_j*}=\frac{1}{F_r}\frac{g_i}{g}-E_u\frac{\partial P*}{\partial x_i*}+R_e\frac{\partial}{\partial x_j*}\left(\frac{\partial V_i*}{\partial x_j*}+\frac{\partial V_j*}{\partial x_i*}\right)$$

A 2 - Forme adimensionnelle pour l'énergie

À partir de l'équation de l'énergie du bilan (2- 41), nous avons:

$$\rho\frac{d}{dt}\left(C_vT+\frac{V_i^2}{2}\right)=\rho V_i g_i-\frac{\partial(PV_i)}{\partial x_i}+2\frac{\partial(\mu S_{ij}V_i)}{\partial x_j}-\frac{\partial}{\partial x_i}\left(\lambda\frac{\partial T}{\partial x_i}\right)$$

Avec $\frac{dT}{dt}=\frac{\partial T}{\partial t}+\vec{V}\vec{\nabla}T$ nous obtenons :

$$\rho\left[\frac{\partial}{\partial t}\left(C_vT+\frac{V_i^2}{2}\right)+V_j\frac{\partial}{\partial x_j}\left(C_vT+\frac{V_i^2}{2}\right)\right]=\rho V_i g_i-\frac{\partial(PV_i)}{\partial x_i}+2\frac{\partial(\mu S_{ij}V_i)}{\partial x_j}-\frac{\partial}{\partial x_i}\left(\lambda\frac{\partial T}{\partial x_i}\right)$$

Étant donné les faibles vitesses des liquides étudiées, et leur caractère hydrostatique, le terme $\frac{V_i^2}{2}$ est négligeable et $\frac{\partial}{\partial x_j}\left(\frac{V_i^2}{2}\right)=0$, nous avons alors:

$$\rho\left[\frac{\partial}{\partial t}(C_vT)+V_j\frac{\partial}{\partial x_j}(C_vT)\right]=\rho V_i F_i-\frac{\partial(PV_i)}{\partial x_i}+2\frac{\partial(\mu S_{ij}V_i)}{\partial x_j}-\frac{\partial}{\partial x_i}\left(\lambda\frac{\partial T}{\partial x_i}\right)$$

Soit, avec les variables adimensionnées:

$$\rho\left[\frac{\partial C_V\Theta T*}{\partial\left(t*\frac{L_0}{V_0}\right)}+V_0V_j*\frac{\partial C_V\Theta T*}{\partial(x_j*L_0)}\right]=\rho g_iV_0V_i*-\frac{\partial(P_0P*V_0V_i*)}{\partial(x_i*L_0)}$$
$$+\mu\frac{\partial}{\partial(xj*L_0)}\left[V_0V_i*\left(\frac{\partial(V_0V_i*)}{\partial(x_j*L_0)}+\frac{\partial(V_0V_j*)}{\partial(x_i*L_0)}\right)\right]$$
$$-\frac{\partial}{\partial(x_i*L_0)}\left(\lambda\frac{\partial\Theta T*}{\partial(x_i*L_0)}\right)$$

Soit :

$$\frac{\rho V_0 C_V \Theta}{L_0}\left[\frac{\partial T^*}{\partial t^*}+V_j^*\frac{\partial T^*}{\partial x_j^*}\right]=\rho g_i V_0 V_i^*-\frac{P_0 V_0}{L_0}\frac{\partial\left(P^* V_i^*\right)}{\partial x_i^*}+\frac{\mu V_0^2}{L_0^2}\frac{\partial}{\partial x_j^*}\left[\left(\frac{\partial V_i^*}{\partial x_j^*}+\frac{\partial V_j^*}{\partial x_i^*}\right)V_i^*\right]-\frac{\lambda\Theta}{L_0^2}\frac{\partial^2 T^*}{\partial x_i^* \partial x_i^*}$$

En divisant l'ensemble par $\rho\frac{V_0}{L_0}$ et ensuite par V_0^2 et avec C_p=C_v nous avons:

$$\frac{C_P\Theta}{V_0^2}\left[\frac{\partial T^*}{\partial t^*}+V_j^*\frac{\partial T^*}{\partial x_j^*}\right]=\frac{g_i L_0 V_i^*}{V_0^2}-\frac{P_0}{\rho V_0^2}\frac{\partial\left(P^* V_i^*\right)}{\partial x_i^*}+\frac{\mu}{\rho V_0 L_0}\frac{\partial}{\partial x_i^*}\left[\left(\frac{\partial V_i^*}{\partial x_j^*}+\frac{\partial V_j^*}{\partial x_i^*}\right)V_i^*\right]-\frac{\lambda\Theta}{\rho_0 V_0 V_0^2 L_0}\frac{\partial^2 T^*}{\partial x_i^* \partial x_i^*}$$

Avec les variables adimensionnées du Tableau 2-1 et les nombres adimensionnés du Tableau 2-2 et du Tableau 2-3 , et on obtient :

$$\frac{\partial T^*}{\partial t^*}+V_j^*\frac{\partial T^*}{\partial x_j^*}=\frac{E_c}{F_r}\frac{g_i}{g}V_i^*-E_u E_c\frac{\partial\left(P^* V_i^*\right)}{\partial x_i^*}+\frac{E_c}{R_e}\frac{\partial}{\partial x_j^*}\left[\left(\frac{\partial V_i^*}{\partial x_j^*}+\frac{\partial V_j^*}{\partial x_i^*}\right)V_i^*\right]-\frac{1}{P_e}\frac{\partial^2 T^*}{\partial x_i^* \partial x_i^*}$$

Annexe B : Matériel utilisé

B 1 - Composés chimiques

- ***Le polydiméthylsiloxane (PDMS)***, fiche de sécurité internationale:

POLYDIMETHYLSILOXANE
$(C_2H_6OSi)n$

N° CAS : 9016-00-6
N° RTECS : TQ2690000
N° ICSC : 0318

TYPES DE RISQUES/ EXPOSITIONS	RISQUES/ SYMPTOMES AIGUS	PREVENTION	PREMIER SECOURS/ AGENTS D'EXTINCTION
INCENDIE	Combustible.	PAS de flammes nues.	Poudre, AFFF, mousse, dioxyde de carbone.
EXPLOSION			
CONTACT PHYSIQUE			
• **INHALATION**		Ventilation.	Air frais, repos.
• **PEAU**		Gants de protection.	Retirer les vêtements contaminés. Rincer la peau abondamment à l'eau ou prendre une douche.
• **YEUX**	Rougeur. Douleur.	Lunettes de protection.	Rincer d'abord abondamment à l'eau pendant plusieurs minutes (retirer si possible les lentilles de contact), puis consulter un médecin.
• **INGESTION**	Diarrhée.	Ne pas manger, ne pas boire ni fumer pendant le travail. Se laver les mains avant de manger.	Rincer la bouche.

DEVERSEMENTS & FUITES	STOCKAGE	CONDITIONNEMENT & ETIQUETAGE
Recueillir autant que possible dans des récipients hermétiques le liquide répandu. Absorber le liquide restant avec du sable ou avec un absorbant inerte et emporter en lieu sûr.		

VOIR IMPORTANTES INFORMATIONS AU DOS

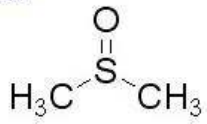
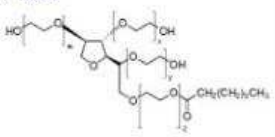
ICSC: 0318 Préparé dans le cadre de la coopération entre le Programme International sur la Sécurité Chimique et la Commission Européenne (C) 1993

DONNEES IMPORTANTES	**ASPECT PHYSIQUE; APPARENCE:** LIQUIDE HUILEUX, INCOLORE. **DANGERS PHYSIQUES:** **DANGERS CHIMIQUES:** La substance se décompose en chauffant fortement (>150°C), produisant du formaldéhyde en petite quantité. **LIMITES D'EXPOSITION PROFESSIONNELLE (LEP):** Pas de TLV établie.	**VOIES D'EXPOSITION:** La substance peut être absorbée par l'organisme par inhalation. **RISQUE D'INHALATION:** Aucune indication ne peut être donnée sur la vitesse à laquelle une concentration dangereuse dans l'air est atteinte lors de l'évaporation de cette substance à 20°C. **EFFETS DES EXPOSITIONS DE COURTE DUREE:** La substance est irritante pour les yeux. **EFFETS DES EXPOSITIONS PROLONGEES OU REPETEES:**
PROPRIETES PHYSIQUES	Densité relative (eau = 1) : 0.97 Solubilité dans l'eau : nulle	Point d'éclair : >200°C
DONNEES ENVIRONNEMENTALES		

- ***L'agent de saturation*** : SBBB: StartingBlock TM Blocking Buffer (SBBB, Pierce, référence: 37538).
- ***Les tampons salins TBS et PBS:***

P3813 **Phosphate buffered saline**
Sigma powder, pH 7.4

Customers Also Purchased

D2650	P3563	T6664	P1379
	No Image Available	No Image Available	
Dimethyl sulfoxide Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7%	**Phosphate buffered saline** pH 7.4, contains TWEEN 20, dry powder	**Tris Buffered Saline** pH 8.0, powder	**TWEEN® 20** viscous liquid

Details | Related Products | References | Reviews

Description

Packaging Foil pouches

Reconstitution Contents of one pouch, when dissolved in one liter of distilled or deionized water, will yield 0.01 M phosphate buffered saline (NaCl 0.138 M; KCl - 0.0027 M); pH 7.4, at 25 °C.

Propriétés

form powder

pH 7.4

Sécurité

Safety Statements 22-24/25

WGK Germany 1

94158 **Tris Buffered Saline**
Sigma BioUltra, tablets (for 500 mL), pH 7.6

Details | Related Products | References | Reviews

Description

Reconstitution 1 tablet dissolved in 500 mL of deionized water yields:
0.15 M sodium chloride; 0.050 M TRIS-HCl buffer; pH 7.6 at 25°C

Propriétés

product line BioUltra

form tablets (for 500 mL)

pH 7.6

Sécurité

Symbol GHS07

Signal word Warning

Hazard statements H319-H335-H315

Precautionary statements P305+P351+P338

Personal Protective Equipment dust mask type N95 (US), Eyeshields, Gloves

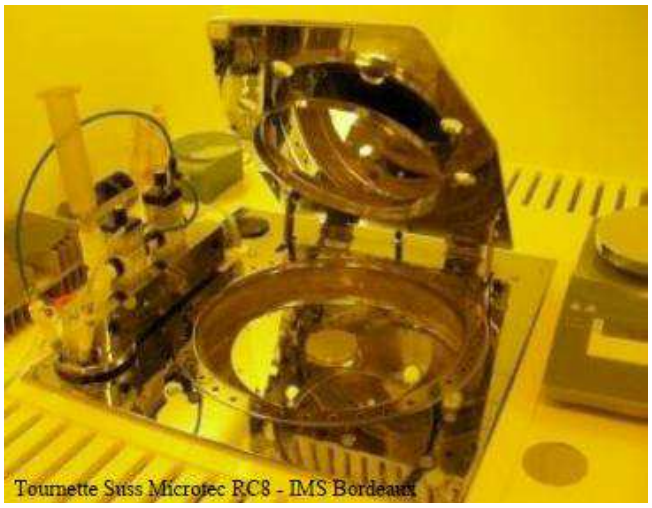
WGK Germany 1

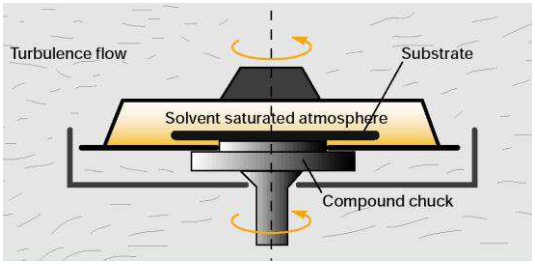
B 2 - Composés biologiques

- Anticorps de chèvre anti-souris (GAM) (Goat anti-Mouse IgG, Sigma-Aldrich pdt no. M1397)
- Anticorps de chèvre anti-souris marqué à la péroxidase : GAM-PO, pour Goat anti-mouse IgG-Peroxidase, Sigma-Aldrich, référence produit: A4416
- Anticorps monoclonal de souris anti *E. Coli* (Centre d'Étude du Bouchet, DGA (ACM4)), dirigé contre l'enveloppe externe de la bactérie

B 3 - Matériel Salle blanche pour la lithographie douce. Appareils électroniques de mesure. Composants électriques

- Tournette : Tournette Suss Microtec RC8 - IMS Bordeaux


Tournette Suss Microtec RC8 - IMS Bordeaux



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

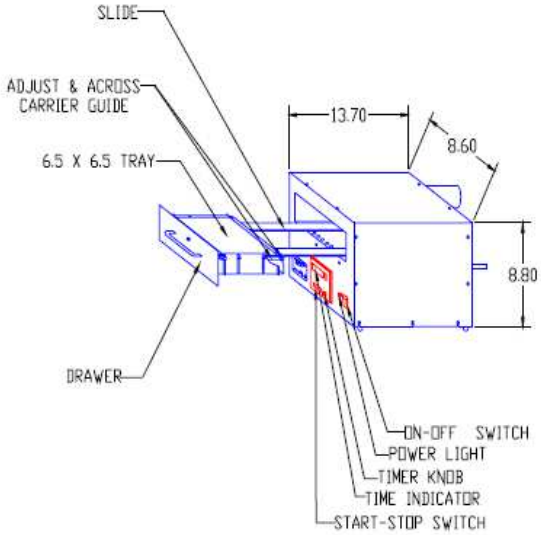
Maximum Substrate Size	
RC8 GYRSET 3	up to 3" Ø/2" ☐
RC8 GYRSET 5	up to 5" Ø/4" ☐
RC8 GYRSET 8	up to 8" Ø/6" ☐
Maximum Speed (10 rpm steps)	
RC8 GYRSET 3	7 000 rpm
RC8 GYRSET 5	5 000 rpm
RC8 GYRSET 8	3 000 rpm
RC8 standard plate	7 000 rpm
Maximum acceleration	5 000 rpm/s

Control	
Time Range	0 - 999 s
Speed Regulation	Tachometric
Speed Control	Galvanometric
Power Requirements	
Power	110/230 AC
Consumption	0.3 kW
Frequency	47 - 63 Hz

Utilities	
Vacuum	-0.6 ba
Air pressure	4 - 9 ba
Nitrogen	4 - 9 ba
Exhaust	600 l/mi
Conforming to:	
European Machine Norms CE certification	
EMC Electro magnetic capability	
SEMI specifications	

- Pousse-seringues: modèle BS-9000-8

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



Spécifications:

- Size (Max) : 9" Wide X 18" Long X 9.5" High
- Power Requirements : 115 Volts, 60 Hz., 3 Amps
- Lamp Type : Low Pressure Mercury Vapor Grid
- Lamp Output : 28,000 Micro Watts Per Cm5 @ 254 Nm (From 6mm Dist.)
- Tray Size.: 6.5" X 6.5" Ozone Cleaning Area

Annexe C : Protocoles de nettoyage des capteurs, de greffage des anticorps et de détection des bactéries

C 1 - Protocole de nettoyage des capteurs

Protocole de nettoyage du capteur :

Rinçage à l'eau ;

Eau ultrason (5 min) ;

Essuyer avec papier et rinçage à l'acétone ;

Chloroforme ultrason (5 min) ;

UV ozone :

10 min pour enlever toutes contaminations organiques après les tests biologiques, pour caractérisation électrique à l'analyseur de réseaux ;

30 min pour silanisation de la surface du capteur avant greffage.

Des précautions systématiques sont à respecter lors des caractérisations à l'analyseur de réseaux :

- Manipulation avec des gants pour éviter toute contamination ;
- Nettoyage à l'éthanol de la cellule de mesure et de la puce PDMS.

Annexe D : Glossaire

Procaryotes : être vivant à structure unicellulaire ne comportant pas de noyau et délimité par une membrane lipidique.

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 en anglais) : 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.

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 microorganisme (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 en anglais) :** macromolécule biologique formée d'une seule chaîne de nucléotides, indispensable à la synthèse des protéines à partir du programme génétique porté par l'ADN.

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.

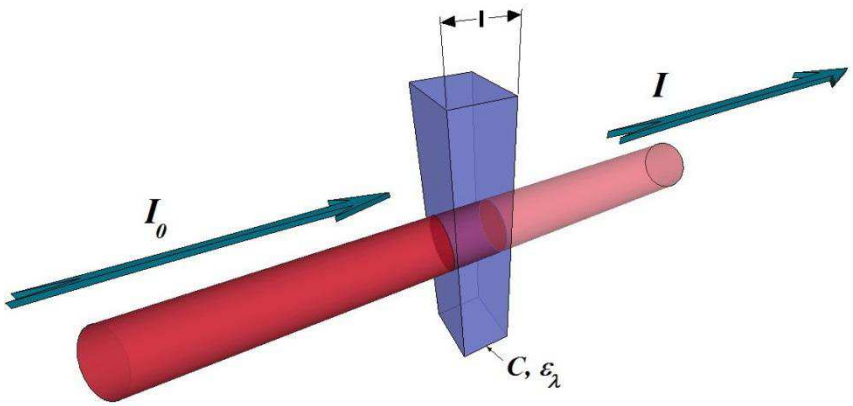
Catalyse : modification (surtout accélération) de la vitesse d'une réaction chimique sous l'effet d'une substance (catalyseur) qui intervient dans la réaction et qui est régénérée à la fin

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.

Couche sensible : partie biosélective du biocapteur.

Densité optique (DO) : la densité optique, notée DO, correspond à l'absorption d'un faisceau lumineux monochromatique (de longueur d'onde lumineuse λ) traversant un milieu liquide homogène. La variation d'intensité du faisceau lumineux est reliée à la concentration de la solution selon la loi de *Beer-Lambert* : $I = I_0 e^{-\varepsilon_\lambda . l.C}$. La densité optique est le rapport $D.O_\lambda = -\log \frac{I}{I_0} = \varepsilon_\lambda . l.C$, avec ε_λ l'absorbance en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, l la longueur de liquide traversée, en *cm*, et C la concentration en $mol.L^{-1}$.



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.

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 négatif, 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.

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 messager. 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.

Glycoprotéine : protéine combinée à un glucide.

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 epsilone). Les plus étudiées et les plus simples, représentant 80% des anticorps, sont les immunoglobulines de type G (IgG), formées de 4 chaînes protéiques, 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 15x5x5 nm3 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 NH2 (fonction amine primaire).

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).

Organite : En biologie cellulaire, le terme organite désigne différentes structures spécialisées contenues dans le cytoplasme des cellules eucaryotes et délimités par une membrane.

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.

Polyclonal (anticorps) : un anticorps polyclonal issu d'un organisme est obtenu en collectant les anticorps présents dans cet organisme.

Spécificité : capacité d'un récepteur à distinguer son ligand des autres espèces présentes.

Tampon : solution constituée 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.

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

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).

Références

[1] L. Fewtrell, J. Bartram J : Water quality: guidelines, standards and health. World Health Organization Water Series, IWA Publishing, London, UK., 2001.

[2] William H. Ewing: Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier Science Publishers, New York, N.Y., 1999.

[3] P. Feng, M. Dey, A. Abe, T. Takeda : Isogenicstrain of Escherichia coli O157:H7 that has lost both Shigatoxin 1 and 2 genes. Clin Diagn Lab Immunol. V.8: 711-717, 2001.

[4] M. Pommepuy, M. Butin, A. Derrien, M. Gourmelon, R. R. Colwell, M. Cormier M : Retention of enteropathogenicity by viable but non culturable Escherichia coli exposed to sea water and sunlight. Appl. EnvironMicrobiol., V.62: 4621-4626, 1996.

[5] A. Rompré, P. Servais, J. Baudart, M. R. De-Roubin, P. Laurent : Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. Journal of Microbiological Methods, V.49(1): 31-54, 2002.

[6] I. George, M. Petit M, P. Servais : Use of enzymatic methods for rapide numeration of coliforms in fresh waters. Journal of Applied Microbiology, V.88(3): 404-413, 2000.

[7] S. O. Van Poucke, H. J. Nelis : Rapid detection of fluorescent and chemiluminescent total coliforms and Escherichia coli on membrane filters. Journal of Microbiological Methods, V.42(3): 233-244, 2000.

[8] S. Hamner, S. C. Broadaway, V. BhadraMishra, A. Tripathi, R. KumarMishra, E. Pulcini, B. H Pyle, T. E. Ford : Isolation of potentially pathogenic Escherichia coli O157:H7 from the Ganges River. Applied and Environmental Microbiology, V.73(7): 2369-2372, 2007.

[9] D. Juck, J. Ingram, M. Prévost, J. Coallier, C. Greer : Nested PCR protocol for the rapid detection of Escherichia coli in potable water. Canadian Journal of Microbiology, V.42(8): 862-866, 1996.

[10] P. Lebaron, A. Henry, A. S. Lepeuple, G. Pena, P. Servais: An operational method for the real-time monitoring of E. coli numbers in bathing waters. Marine Pollution Bulletin, V.50(6): 652-659, 2005.

[11] M. Gourmelon, M. R. Caprais, D. Kay, C. Stapleton : Analytical pollution source tracking: Methods and experiences feedback about the identification of pollution causes on bathing waters, in France and UK. Techniques Sciences Methodes, Issue 4 : 54-64,2010.

[12] S. Lepeuple, K. Delabre, S. Gilouppe, L. Intertaglia, M. R. De Roubin : Laser scanning detection of FISH-labelled Escherichia coli from water samples. Water Science and Technology, V.47(3): 123-129, 2003.

[13] C. Maynard, F. Berthiaume, K. Lemarchand, J. Harel, P. Payment, P. Bayardelle, L. Masson, R. Brousseau : Water-borne pathogen detection by use of oligonucleotide based microarrays. ApplEnvironMicrobiol., V.71: 8548-8557, 2005.

[14] T. Kostić, SB. tessl, M. Wagner, A. Sessitsch, L. Bodrossy : Microbial diagnostic microarray for food- and water-borne pathogens. Microbial Biotechnology, V.3(4): 444-454, 2010.

[15] L. C. Clark Jr., R. Wolf, Z. Taylor: Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. J Appl. Physiol, V.6(3): 189-193, 1953.

[16] A. F. Abate, M. De Marsico, D. Riccio, G. Tortora : MUBAI: multiagent biometrics for ambient intelligence. Journal of Ambient Intelligence and Humanized Computing, V.1,2010.

[17] D. Dávila, J. P. Esquivel, N. Sabaté, J. Mas : Silicon-based microfabricated microbial fuel cell toxicity sensor. Biosensors and Bioelectronics, V.26: 2426-2430, 2010.

[18] M. Woutersen, S. Belkin, B. Brouwer, A. P. Van Wezel, M. B. Heringa: Are luminescent bacteria suitable for online detection and monitoring of toxic compounds in drinking water and its sources? Analytical and Bioanalytical Chemistry, V.400: 915-929, 2011.

[19] L. Wang, X. Zhang, H. Xiong, S. Wang : A novel nitromethane biosensor based on biocompatible conductive redox graphene-chitosan/hemoglobin/graphene/room temperature ionic liquid matrix. Biosensors and Bioelectronics, V.26(3): 991-995, 2010.

[20] J. C. Carrano, A. Zukauskas : Proceedings of SPIE: Optically Based Biological and Chemical Sensing for Defence. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, V.5617 : 448pages, 43 papers, 2004.

[21] A. Liu, Q. Zhao, X. Guan.: Stochastic nanopore sensors for the detection of terrorist agents: Current status and challenges. Analytica Chimica Acta, V.675(2): 106-115, 2010.

[22] A. Tsanas, M. A. Little, P. E. McSharry, L. O. Ramig : Enhanced classical dysphonia measures and sparse regression for telemonitoring of Parkinson's disease progression. ICASSP, IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing – Proceedings : 594-597, 2010.

[23] http://gmwgroup.harvard.edu/

[24] L. Limiao, J.Huang, T. Wang, H. Zhang, Y. Liu, J. Li.: An excellent enzyme biosensor based on Sb-doped SnO2 nanowires. Biosensors and Bioelectronics, V.25(11): 2436-2441, 2010.

[25] F. Li, J. Song, F. Li, X. Wang, Q. Zhang, D. Han, A. Ivaska, L. Niu :Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on carbon nanotubes @SnO2-Au composite. Biosensors and Bioelectronics, V.25(4): 883–888, 2009.

[26] A. Prakash, S. Majumdar, P. SujathaDevi, A. Sen : Polycarbonate membrane assisted growth of pyramidal SnO2 particles. Journal of MembraneScience, V.326: 388–391, 2009.

[27] J. Liu, Y. Li, X. Huang, Z. Zhu. : Tin Oxide Nanorod Array-Based Electrochemical Hydrogen Peroxide Biosensor. Nanoscale Research Letters, V.5(7): 1177-1181, 2010.

[28] A. Manz, N. Pamme, D. Lossifidis : Bioanalytical chemistry. Imperial College Press, Londres , 220 pages, 2004.

[29] M. Mascini : Aptamers in Bioanalysis. Wiley, 314 pages, 2009.

[30] I. Gammoudi, H. Tarbague, A. Othmane, D. Moynet., D. Rebière, R. Kalfat, C. Dejous: Love-wave bacteria-based sensor for the detection of heavy metal toxicity in liquid medium. Biosensors and Bioelectronics, V.26(4): 1723-1726, 2010.

[31] C. A. Lopez, G. G. Daaboul, R. S. Vedula, E. Özkumur, D. A. Bergstein, T. W. Geisbert, H. E. Fawcett, B. B. Goldberg, J. H. Connor, M. S. Ünlü : Label-free multiplexed virus detection using spectral reflectance imaging. Biosensors and Bioelectronics, V.26(8): 3432-3437, 2010.

[32] B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, A. Antoniou, B. Fahys : Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. Biosensors and Bioelectronics, V.19(12): 1641-1647, 2004.

[33] C. Esseghaier, Y. Bergaoui, H. Ben Fredj, A. Tlili, S. Helali, S. Ameur, A. Abdelghani : Impedance spectroscopy on immobilized streptavidin horseradish peroxidase layer for biosensing. Sensors and Actuators, B: Chemical, V.134(1) : 112-116, 2008.

[34] C. Tlili., JN. affrezic-Renault, C. Martelet, J. P. Mahy, S. Lecomte, M. M. Chehimi, H. Korri-Youssoufi : A new method of immobilization of proteins on activated ester terminated alkanethiol monolayers towards the label free impedancemetric detection. Materials Science and Engineering C, V.28(5-6) : 861-868, 2008.

[35] Y. Wang, S. Chalagalla, T. Li, X. L. Sun, W. Zhao, P. G. Wang, X. Zeng : Multivalent interaction-based carbohydrate biosensors for signal amplification. Biosensors and Bioelectronics, V.26(3) : 996-1001, 2010**.**

[36] N. Moll, D. H. Dinh, E. Pascal, C. Déjous, J.-P. Pillot, B. Bennetau, D. Rebière, D. Moynet, Y. Mas, J. Pistré : Enhancement of antibody binding on SiO2 Love wave sensor surface using (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane. Materials Research Society Symposium Proceedings, V.915 : 23-29, 2006.

[37] A. Pockels : Surfacetension. Nature, V.43 : 437-439, 1891.

[38] K. Singh, A. Rahman, J. I. Sun, K.C. Kim, and Y.B. Shim : An amperometric immunosensor for osteoproteogerin basedon gold nanoparticles deposited conducting polymer. Biosensors and Bioelectronics, V.23(11) : 1595 1601, 2008.

[39] K. Arora, N. Prabhakar, S. Chand, B. D. Malhotra.: Escherichia coli genosensor based on polyaniline. Analytical Chemistry, V.79(16) : 6152- 6158,2007.

[40] C. Dhand, M. Das, M. Datta, B. D. Malhotra. : Recent advances in polyaniline based biosensors. Biosensors and Bioelectronics, V26(6) : 2811-2821, 2010.

[41] Y. H. Lin, S.H. Chen, Y.C. Chuang, Y.C. Lu, T.Y. Shen, C.A. Chang, C.S. Lin: Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen Escherichia coli O157:H7. Biosensors and Bioelectronics, V.23(12) : 1832-1837,2008.

[42] K. Abu-Rabeah, A. Ashkenazi, D. Atias, L. Amir, R. S. Marks : Highly sensitive amperometric immunosensor for the detection of Escherichia coli. Biosensors and Bioelectronics, V.24(12) : 3461-3466, 2009.

[43] P. Geng, X. Zhang, Y. Teng, Y. Fu, L. Xu, M. Xu, L. Jin, W. Zhang : A DNA sequence-specific electrochemical biosensor based on alginic acid-coated cobalt magnetic beads for the detection of E. coli. Biosensors and Bioelectronics, V.26 (7) : 3325-3330, 2011.

[44] N. Jaffrezic, C. Martelet, P. Clechet : Capteurs chimiques et biochimiques, techniques de l’ingénieur.

[45] D. Lee, T. Cui : Low-cost, transparent, and flexible single-walled carbon nanotube nanocomposite based ion-sensitive field-effect transistors for pH/glucose sensing. Biosensors and Bioelectronics, V.25(10) : 2259-2264, 2010.

[46] A. P. Soldatkin, J. Montoriol, W. Sant, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault : Creatinine sensitive biosensor based on ISFETs and creatinine deiminase immobilised in BSA membrane. Talanta, V.58(2) : 351–357, 2002.

[47] B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, A. Antoniou, B. Fahys : Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. Biosensors and Bioelectronics,V.19(12) : 1641-1647, 2004.

[48] L. Yang, C. Ruan, Y. Li : Detection of viable Salmonella typhimurium by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. Biosensors and Bioelectronics, V.19(5) : 495–502, 2003.

[49] L. Yang, Y. Li, G. F. Erf : Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of Escherichia coli O157 :H7, Analytical Chemistry, V.76(4) : 1107–1113, 2004.

[50] H.H. Tsai, C.F. Lin, Y.Z. Juang, I. L. Wang, Y. C. Lin : Multiple type biosensors fabricated using the CMOS BioMEMS platform. Sensors and Actuators, B: Chemical, V.144(2) : 407-412,2010.

[51] V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J. M. Pingarrón.: Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive *Escherichia coli* quantisation. Biosensors and Bioelectronics, V.24(11) : 3365-3371, 2009.

[52] B. M. Willardson, J. F. Wilkins, T. A. Rand, J. M. Schupp, K. K. Hill, P. Keim, P. J. Jackson : Development and testing of a Bacterial Biosensor for Toluene-based Environmental Contaminants. Appl. Environ. Microbiol. V.64 (3) : 1006-1012, 1998.

[53] J. Tschmelak, G. Proll, G. Gauglitz : Sub-nanogram per litre detection of the emerging contaminant progesterone with a fully automated immunosensor based on evanescent field technique. Anal. Chim. Acta 519 (2) : 143-146, 2004.

[54] Y. M. Bae, B. K. Oh, W. Lee, W. H. Lee, J. W. Choi : Detection of insulin-antibody binding on a solid surface using imaging ellipsometry. Biosensors and Bioelectronics V.20(4) : 895-902, 2004.

[55] A. J. Baeumner, R. N. Cohen, V.Miksic, J. Min : RNA biosensor for the rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. Biosensors and Bioelectronics V.18(4) : 405–413, 2003.

[56] X. Fan, I. M. White, S.I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, Y. Sun : Sensitive optical biosensors for unlabeled targets. A review. Analytica Chimica Acta V.620(1-2) : 8-26, 2008.

[57] V. M. N. Passaro, F. Dell'Olio, B. Casamassina, F. De Leonardis : Guided-Wave Optical Biosensors. Sensors 7: 508-36, 2007.

[58] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov : Fluorescent proteins from non bioluminescent Anthozoa species. Nature Biotechnology V.17(10) : 969-973, 1999.

[59] J.V. Jokerst, A. Ramanathan, N. Christodoulides, P.N. Floriano, A.A. Pollard, G.W. Simmons, J. Wong, C. Gage, W.B. Furmaga, S.W. Redding, J.T. Mc Devitt : Nano bio chips for high performance multiplexed protein detection: determinations of cancer biomarkers in serum and saliva using quantum dot bioconjugate labels. Biosensors and Bioelectronics, V.24(12) : 3622 3629, 2009.

[60] S. Arcidiacono, P. Pivarnik, C.M. Mello, A. Senecal : Cy5 labeled antimicrobial peptides for enhanced detection of Escherichia coli O157:H7. Biosensors and Bioelectronics, V.23(11) : 1721-1727, 2008.

[61] R.W. Wood : On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. Philysophical magazine, 4 : 396-402, 1902.

[62] R.V. Olkhov, A.M. Shaw : Label free antibody antigen binding detection by optical sensor array based onsurface synthesized gold nanoparticles. Biosensor and Bioelectronics 23(8) : 1298-1302, 2008.

[63] X.D. Hoa, A.G. Kirk, M. Tabrizian : Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. Biosensors and Bioelectronics 23: 151–160, 2007.

[64] S.C.B. Gopinath.: Biosensing applications of surface plasmon resonance- based Biacore technology. Sensors and Actuators B: Chem. 2010, V.150(2) :722-733, 2010.

[65] M. Zourob, S. Mohr, B.J.T. Brown, P.R. Fielden, M.B. McDonnell, N.J. Goddard : An integrated metal clad leaky waveguide sensor for detection of bacteria. Analytical Chemistry V.77(1) : 232–242, 2005.

[66] M. Zourob, J.J. Hawkes, W.T. Coakley et al. : Optical leaky waveguide sensor for detection of bacteria with ultrasound attractor force. Analytical Chemistry V.77(19) : 6163–6168, 2005.

[67] M. Zourob, A. Simonian, J. Wild, S. Mohr, X. Fan, I. Abdulhalim, N.J. Goddard : Optical leaky waveguide biosensors for the detection of organophosphorus pesticides. Analyst V.132(2) : 114–120, 2007.

[68] W. Budach, D. Neuschäfer, C. Wanke, S.D. Chibout : Generation of transducers for fluorescence based microarrays with enhanced sensitivity and their application for gene expression profiling. Analytical Chemistry, V.75(11) : 2571–2577, 2003.

[69] D. Neuschafer, W. Budach, C. Wanke, S.D. Chibout : Evanescent resonator chips: a universal platform with superior sensitivity for fluorescence-based microarrays. Biosensors and Bioelectronics, V.18 (4) : 489–497, 2003.

[70] P.C. Mathias, S.I. Jones., H-Y. Wu, F. Yang, N. Ganesh, D.O. Gonzalez, G. Bollero, L.O. Vodkin, B.T. Cunningham : Improved Sensitivity of DNA Microarrays Using Photonic Crystal Enhanced Fluorescence. Analytical Chemistry, V.82(16) : 6854-6861, 2010.

[71] I. Beuvink, F.A. Kolb, W. Budach, A. Garnier, J. Lange, F. Natt, U. Dengler, J. Hall, W. Filipowicz, J. Weiler : A novel microarray approach reveals new tissue specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. Nucleic Acids Research, V.35(7), article number 52, 2007.

[72] D. Wildeboer, P. Jiang, R.G. Price, S. Yu, F. Jeganathan, R.A. Abuknesha : Use of antibody-hapten complexes attached to optical sensor surfaces as a substrate forproteases: Real-time biosensing of protease activity. Talanta, V.81(1-2) : 68-75, 2010.

[73] B.Y. Shew, Y.C. Cheng, Y.H. Tsai : Monolithic SU-8 micro-interferometer for biochemical detections. Sensors and Actuators, A: Physical, V.141(2) : 299-306, 2008.

[74] A. Densmore, D.X. Xu, M. Vachon, S. Jnaz, R. Ma, Y. Li, G. Lopinski, C.C. Luebbert, Q.Y. Liu, J.H. Schmid, A. Delâge, P. Cheben: Arrays of SOI photonic wire biosensors for label-free molecular detection. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, V.7606, article number 76060C, 2010.

[75] A. Dér, S. Valkai, A. Mathesz, I. Andó, E.K. Wolff, P. Ormos : Protein-based all-optical sensor device. Sensors and Actuators, B: Chemical, V.151(1) : 26-29, 2010.

[76] C. Qi, X.S. Tian, S. Chen, J.H. Tan, Z. Cao, K.G. Tian, G.F. Gao, G. Jin : Detection of avian influenza virus subtype H5 using a biosensor based on imaging ellipsometry. Biosensors and Bioelectronics V.25(6) : 1530–1534, 2010.

[77] C. Huang, J. Li, Y. Tang, Y. Chen, G. Jin : Detection of duck hepatitis virus serotype1 by biosensor based on imaging ellipsometry. Current Applied Physics V.11(3) : 353-357, 2010.

[78] S. Kurunczi, A. Németh, T. Hülber, P. Kozma, P. Petrik, H. Jankovics, A. Sebestyén, F. Vonderviszt, M. Fried, I. Bársony : In situ ellipsometric study of surface immobilization of flagellar filaments. Applied Surface Science V.257(1), 319–324, 2010.

[79] A. Abbas, A. Treizebre, P. Supiot, N.E. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko, B. Bocquet : Cold plasma functionalized TeraHertz BioMEMS for enzyme reaction analysis. Biosensors and Bioelectronics, V.25(1) : 154-160, 2009.

[80] M. Nagel, M. Först, H. Kurz : THz biosensing devices: Fundamentals and technology. Journal of Physics Condensed Matter. V.18(18) : S601-S618, 2006.

[81] P. Curie, P.J. Curie : Développement par compression de l'électricité polaire dans les cristaux hémièdres à faces inclinées. C. R. Académie des Sciences Paris, Tome 91, 294, 1880.

[82] Rayleigh : On waves propagated along the plane surface of an elastic solid. Proceedings of the London Mathematical Society, s1-17 (1) : 4-11, 1885.

[83] A.E.H. Love : Some problems of geodynamics.Cambridge University Press. Cambridge, 1911

[84] M. Michalzik, J. Wendler, J. Rabe, S.Büttgenbach and U. Bilitewski : Development and application of a miniaturised quartz crystal microbalance (QCM) as immunosensor for bone morphogenetic protein-2. Sensors and Actuators B, V.105(2) : 508-515, 2005.

[85] S.Kurosawa, M. Nakamura, J-W.Park, H. Aizawa, K. Yamada, M. Hirata : Evaluation of a high-affinity QCM immunosensor using antibody fragmentation and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) polymer. Biosensors and Bioelectronics, V.20(16) : 1134-1139, 2004.

[86] X. Chu, Z-L. Zhao, G-L. Shen, R-Q.Yu : Quartz crystal microbalance immunoassay with dendritic amplification using colloidal gold immunocomplex. Sensors and Actuators B, V.114(2) : 696-704, 206.

[87] A. Tsortos, G. Papadakis, E. Gizeli : Acoustic wave biosensor for detecting DNA conformation; a study with QCM-D. Frequency Control Symposium 2008 IEEE International : 346-349, 2008.

[88] G. García-Martinez, E.A. Bustabad, H. Perrot, C. Gabrielli, B. Bucur, M. Lazerges, D. Rose, L. Rodriguez-Pardo, J. Fariña, C. Compère, A. Vives : Design and implementation of a DNA biosensor based on a 50MHz QCM electronic oscillator circuit. Industrial Electronics, 2009. IECON '09. 35th Annual Conference of IEEE : 1829-1834, 2009.

[89] E.A. Bustabad, G. García, L. Rodriguez-Pardo, J. Fariña, H. Perrot, C. Gabrielli, B. Bucur, M. Lazerges, D. Rose, C. Compère, A. Arnau : A biosensor for detection of DNA sequences based on a 50MHz QCM electronic oscillator circuit. Proceedings of Sensors, 2009 IEEE : 687-690, 2009.

[90] J. Gamby, M. Lazerges, H.H. Girault, C. Deslouis, C. Gabrielli, H. Perrot, B. Tribollet : Electroacoustic polymer microchip as an alternative to quartz crystal microbalance for biosensor development. Analytical Chemistry V.80(23) : 8900-8907, 2008.

[91] J. Gamby, M. Lazerges, C. Pernelle, H. Perrot, H.H. Girault, B. Tribollet : Electroacoustic miniaturized DNA-biosensor. Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology V.7(11) : 1607-1609, 2007.

[92] M. Saitakis, A. Tsortas, E. Gizeli : Probing the interaction of a membrane receptor with a surface-attached ligand using whole cells on acoustic biosensors. Biosensors and bioelectronics, V.25(7) : 1688-1693, 2010.

[93] H. Wohltjen, A. Snow, W. Barger, R. William, D.S. Ballantine : Trace chemical vapor detection using saw delay line oscillators. IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control V.34(2): 172-178, 1987.

[94] J.W. Grate, A. Snow, D.S. Ballantine Jr., H. Wohltjen, M.H. Abraham, R.A. McGill, P. Sasson : Determination of partition coefficients from surface acoustic wave vapor sensor responses and correlation with gas-liquid chromatographic partition coefficients. Analytical Chemistry V.60(9) : 869-875, 1988.

[95] G.S. Calabrese, H. Wohltjen, M.K. Roy : Surface acoustic wave devices as chemical sensors in liquids. Evidence disputing the importance of rayleigh wave propagation. Analytical Chemistry V.59(6) : 833-837, 1987.

[96] D.S. Ballantine Jr., S. David, H. Wohltjen : Use of SAW devices to monitor visco-elastic properties of materials. Ultrasonics Symposium Proceedings V.1 : 559-562, 1988.

[97] D.S. Ballantine Jr, H. Wohltjen : Surface acoustic wave devices for chemical analysis. Analytical Chemistry V.61 (11) : 704-715, 1989.

[98] M. Richard White : Acoustic sensors for physical, chemical and biochemical applications. Proceedings of the Annual IEEE International Frequency Control Symposium: 587-594, 1998.

[99] Q. Fu, H. Stab, W. Fischer : Wireless passive SAW sensors using single-electrode-type IDT structures as programmable reflectors. Sensors and Actuators A: Physical, V.122(2) : 203-208, 2005.

[100] W.Wang, K. Lee, I.Woo, I. Park, S. Yang : Optimal design on SAW sensor for wireless pressure measurement based on reflective delay-line. Sensors and Actuators A: Physical, V.139(1-2) : 2-6, 2007.

[101] B. Joo, J.S. Huh, D.D. Lee : Fabrication of polymer SAW sensor array to classify chemical warfare agents. Sensors and Actuators B: Chemical, V.121(1) : 47-53, 2007.

[102] Y. Zhao, M. Liu, D-M. Li, J-J. Li, J-B Niu : FEM modeling of SAW organic vapor sensors. Sensors and Actuators A: Physical, V.154(1) : 30-34, 2009.

[103] M. Penza, V. I. Anisimkin : Surface acoustic wave humidity sensor using polyvinyl-alcohol film, Sensors and Actuators A: Physical, V.76(1-3) : 162-166, 1999.

[104] R.D.S.Yadava : Enhancing mass sensitivity of SAW delay-line sensors by chirping transducers, Sensors and Actuators B: Chemical, V.114(1) : 127-131, 2006.

[105] R. Fachberger, A. Erlacher : Monitoring of the temperature inside a lining of a metallurgical vessel using a SAW temperature sensor. Procedia Chemistry, V.1(1), 1239-1242, 2009

[106] V.V. Ruzhich, S.G. Psakhie, E.N. Chernykh, S.A. Bornyakov, N.G. Granin : Deformation and seismic effects in the ice cover of Lake Baikal. Russian Geology and Geophysics, V.50(3) : 214-221, 2009.

[107] K. Länge, B. E. Rapp, M. Rapp : Surface acoustic wave biosensors: a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry V.395(5) : 1509-1519, 2008.

[108] H. Wohltjen, R. Dessy : Surface acoustic wave probe for chemical analysis. I. Introduction and instrument description. Anal. Chem V.51 : 1458-1464, 1979.

[109] H. Wohltjen, R. Dessy : Surface acoustic wave probe for chemical analysis. II. Gas chromatography detector. Anal. Chem. 1979, V.51, 1465–1470.

[110] H. Wohltjen, R. Dessy : Surface acoustic wave probe for chemical analysis. III. Thermomechanical polymer analyzer. Anal. Chem. 1979, 51, 1470–1475.

[111] J.E. Roederer, G.J. Bastiaans : Microgravimetric immunoassay with piezoelectric crystals. Anal. Chem., V.55 : 2333–2336, 1983.

[112] G.S. Calabrese, H. Wohltjen, M.K. Roy : Surface acoustic wave devices as chemical sensors in liquids. Evidence disputing the importance of Rayleigh wave propagation. Anal. Chem., V.59 : 833–837, 1987.

[113] K. Länge, B.E. Rapp, M. Rapp : Surface acoustic wave biosensors: a review. Anal. Bioanal. Chem., V.391 : 1509–1519, 2008.

[114] C.A. Flory, R.L. Baer : Surface transverse wave mode analysis and coupling to interdigital transducers. *IEEE Ultrason. Symp.* : 313–318, 1987.

[115] T. Moriizumi, Y. Unno, S. Shiokawa : New sensor in liquid using leaky SAW. IEEE Ultrason. Symp. : 579–582, 1987.

[116] J.W. Grate, G.C. Frye : Acoustic wave sensors. In Sensors Update, Göpel, W., Hesse, J., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 1996.

[117] K. Länge, M. Rapp: Influence of intermediate aminodextran layers on the signal response of surface acoustic wave biosensors. Analytical Biochemistry V.377(2) : 170-175, 2008.

[118] K. Länge, M. Rapp: Influence of intermediate hydrogel layer and amount of binding sites on the signal response of surface acoustic wave biosensors, Sensors and Actuators B: Chemical, V.142(1) : 39-43, 2009.

[119] E. Berkenpas, P. Millard, M. Pereira da Cunha : Detection of Escherichia coli O157:H7 with langasite pure shear horizontal surface acoustic wave sensors. Biosensors and Bioelectronics V.21(12) : 2255-2262, 2006.

[120] E. Berkenpas, S. Bitla, P. Millard, M. Pereira da Cunha : Shear Horizontal SAW Biosensor on Langasite. Proceedings of IEEE Sensors V.2(1) : 661-664, 2003.

[121] D.H. Dinh, E. Pascal, L. Vellutini, B. Bennetau, D. Rebière, C. Dejous, D. Moynet, C. Belin, J-P. Pillot : Novel optimized biofunctional surfaces for Love mode surface acoustic wave based immunosensors. Sensors and Actuators, B: Chemical V.146(1) : 289-296, 2010.

[122] N. Moll, E. Pascal, D.H. Dinh, J-P. Pillot, B. Bennetau, D. Rebière, D. Moynet, Y. Mas, D. Mossalayi, J. Pistré, C. Déjous : A Love wave immunosensor for whole E. coli bacteria detection using an innovative two-step immobilisation approach. Biosensors and Bioelectronics V.22(9-10) : 2145-2150, 2007.

[123] N. Moll, E. Pascal, D.H. Dinh, J-L. Lachaud, L. Vellutini, J-P. Pillot, D. Rebière, D. Moynet, J. Pistré, D. Mossalayi, Y. Mas, B. Bennetau, C. Déjous : Multipurpose Love acoustic wave immunosensor for bacteria, virus or proteins detection. ITBM-RBM V.29(2-3) : 155-161, 2008.

[124] A.K. Pantazis, E. Gizeli, G. Konstantinidis : A high frequency GaN Lamb-wave sensor device. Applied Physics Letters V.96(19) : article number 194103, 2010.

[125] T.M. Gronewold : Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: recent trends and challenges. Anal. Chim. Acta, V.603 : 119–128, 2007.

[126] Sandia National Laboratories : Biotechnology capabilities, disponible sur la site Internet de Sandia National Laboratories : http//www.sandia.gov/capabilities/biosciences/BioTechnologies.pdf

[127] B. Heidenreich, C. Pöhlmann, M. Sprinzl, M. Gareis : Detection of Escherichia coli in meat with an electrochemical biochip, Journal of Food Protection V.73(11) : 2025-2033, 2010.

[128] K.A. Abu-Rabeah, A.A. Ashkenazi, D.B. Atias, L.C. Amir, R.S. Marks : Highly sensitive amperometric immunosensor for the detection of Escherichia coli. Biosensors and Bioelectronics V.24(12) : 3461-3466, 2009.

[129] Y. Cheng, Y. Liu, J. Huang, K. Li, Y. Xian, W. Zhang, L. Jin : Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe3O4 nanoparticles-coated carbon nanotubes nanocomposite for rapid detection of coliforms, Electrochimica Acta V.54(9) : 2588-2594, 2009.

[130] O.A. Loaiza, S. Campuzano, M. Pedrero, P. García, J.M. Pingarrón : Ultrasensitive detection of coliforms by means of direct asymmetric PCR combined with disposable magnetic amperometric genosensors. Analyst V.134(1) : 34-37, 2009.

[131] G.A. Zelada-Guillén, S.V. Bhosale, J. Riu, F.X. Rius : Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples. Analytical Chemistry V.82(22) : 15 November 2010, Pages 9254-9260.

[132] V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.M Pingarrón : Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive Escherichia coli quantisation. Biosensors and Bioelectronics V.24(11) : 3365-3371, 2009.

[133] M. Hnaiein, W.M. Hassen, A. Abdelghani, C. Fournier-Wirth, J. Coste, F. Bessueille, D. Leonard, N. Jaffrezic-Renault : A conductometric immunosensor based on functionalized magnetite nanoparticles for E. coli detection. Electrochemistry Communications V.10(8) : 1152-1154, 2008.

[134] N. Massad-Ivanir, C. Shtenberg, T. Zeidman, E. Segal : Construction and characterization of porous SiO2/ hydrogel hybrids as optical biosensors for rapid detection of bacteria. Advanced Functional Materials V.20(14) : 2269-2277, 2010.

[135] X. Guan, H-J. Zhang, Y-N Bi, L. Zhang, D-L. Hao : Rapid detection of pathogens using antibody-coated microbeads with bioluminescence in microfluidic chips. Biomedical Microdevices V.12(4) : 683-691, 2010.

[136] N. Sanvicens, N. Pascual, M.T. Fernández-Argüelles, J. Adrián, J.M. Costa-Fernández, F. Sánchez-Baeza, A. Sanz-Medel, M-P. Marco : Quantum dot-based array for sensitive detection of Escherichia coli. Analytical and Bioanalytical Chemistry V.399(8) : 2755-2762, 2011.

[137] J. Liu, H. Shang, X. Wang, C. Liu : A portable membrane-based analysis system for rapid and sensitive detection of Bacteria. Proceedings of the World Congress on Intelligent Control and Automation (WCICA) 2010, article number 5554946 : 2951-2954, 2010.

[138] H. Baccar, M.B. Mejri, I. Hafaiedh, T. Ktari, M. Aouni, A. Abdelghani : Surface plasmon resonance immunosensor for bacteria detection. Talanta V.82 (2) : 810-814, 2010.

[139] S.K. Arya, A. Singh, R. Naidoo, P. Wu, M.T. McDermott, S. Evoy : Chemically immobilized T4-bacteriophage for specific Escherichia coli detection using surface plasmon resonance. Analyst V.136(3) : 486-492, 2011.

[140] J. Waswa, J. Irudayaraj, C. DebRoy : Direct detection of E. Coli O157:H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor. LWT - Food Science and Technology V.40(2) : 187-192, 2007.

[141] L. Wang, Q. Wei, C. Wu, Z. Hu, J. Ji, P. Wang : The Escherichia coli O157:H7 DNA detection on a gold nanoparticle-enhanced piezoelectric biosensor. Chinese Science Bulletin V.53(8) : 1175-1184, 2008.

[142] X. Mao, L. Yang, X-L. Su, Y. Li : A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157:H7. Biosensors and Bioelectronics, V.21(7) : 1178-1185, 2006.

[143] Z. Shen, M. Huang, C. Xiao, Y. Zhang, X. Zeng, P.G. Wang : Nonlabeled quartz crystal microbalance biosensor for bacterial detection using carbohydrate and lectin recognitions. Analytical Chemistry, V.79(6) : 2312-2319, 2007.

[144] X-L. Su, Y. Li : A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of Escherichia coli O157:H7. Biosensors and Bioelectronics V.19(6) : 563-574, 2004.

[145] A. E. Y. XiKamholz, E. A. Schilling, P. Yager, Optical measurement of transverse moleculardiffusion in a microchannel. Biophysical Journal 80, 1967-1972 (2001).a et G. M. Whitesides: Soft lithography. Annual Review of MaterialsScience V.8(1) : 153-184, 1998.

[146] A.D. Stroock, S.K.W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H.A. Stone et G.M. Whitesides: Chaotic mixer for microchannels. Science, 295 : 647-651, 2002.

[147] A. E. Kamholz, B. H. Weigl, B. A. Finlayson, P. Yager : Quantitative analysis of molecularinteraction in a microfluidicchannel: The T-sensor. Analytical Chemistry V.71(23) : 5340-5347, 1999.

[148] A. E. Kamholz, E. A. Schilling, P. Yager : Optical measurement of transverse molecular diffusion in a microchannel. Biophysical Journal V.80(4) : 1967-1972, 2001.

[149] Galambos, P. Ph.D. Thesis : Mechanical Engineering. University of Washington, Seattle (1998).

[150] B. H. Weigl, P. Yager : Silicon-microfabricated diffusion-based optical chemical sensor. Sensors and Actuators B-Chemical V.39(1-3), 452-457 (1997).

[151] K. Macounova , C. R. Cabrera, M. R. Holl, P. Yager, Generation of natural pH gradients in microfluidic channels for use in isoelectric focusing. Analytical Chemistry V.72 : 3745-3751, 2000.

[152] N. Kim, C.M. Dempsey, J.V. Zoval, JI-Y. Sze, M.J. Madou: Automated microfluidic compact disc (CD) cultivation system of Caenorhabditis elegans. Sensors and Actuators B V.122: 511-518, 2007.

[153] B.T. Ginn, B. Steinbock, M. Kahveciand O. Steinbock: MicrofluidicDevicesfor the Belousov-Zhabotinsky Reaction. J. Phys. Chem. A, V.108 : 1325-1332, 2004.

[154] J.G. Lim, S.S. Lee, K.D. Lee : Polymeric arrayed waveguide grating using imprint method incorporating a flexible PDMS stamp. Optics Communications V.272 : 97-101, 2007.

[155] C-H.Wang, G-B. Lee : Automatic bio-sampling chips integrated with micro-pumps and micro-valves for disease detection. Bioelectronics, V21 : 419-425, 2005.

[156] V. Raimbault : Étude et développement d’un système microfluidique à ondes de Love dédié à la caractérisation de fluides complexes. Thèse, 2008

[157] A. Wisitsoraat, P.Sritongkham, C.Karuwan, D.Phokharatkul, T.Maturos, A.Tuantranont : Fast cholesterol detection using flow injection microfluidic device with functionalized carbon nanotubes based electrochemical sensor. Biosensors and Bioelectronics V26(4) : 1514-1520, 2010.

[158] W. Lee, W. Fon, B. W. Axelrod, and M. L. Roukes : High-sensitivity microfluidic calorimeters for biological and chemical applications, PNAS vol. 106, N° 36 : 15225-15230, 2009.

[159] B. R. Schudel, C. J. Choi, B. T. Cunningham and P. J. A. Kenis : Microfluidic chip for combinatorial mixing and screening of assays. Lab Chip, 9 : 1976-1680, 2009.

[160] Kang-Yi Lien, Ying-Hsin Chuang, Lein-Yu Hung, Keng-Fu Hsu, Wu-Wei Lai, Chung-Liang Ho, Cheng-Yang Chou and Gwo-Bin Lee: Rapid isolation and detection of cancer cells by utilizing integrated microfluidic systems. Lab on a Chip V.10 : 2875-2886, 2010.

[161] V. Raimbault, D. Rebière, C. Dejous, M. Guirardel, V. Conédéra, J. Pistré : Hight viscosity sensing using a Love wave acoustic platform combined with a PDMS microfluidic chip. ECS Transactions V.4(1) : 73-81, 2006.

[162] K. Mitsakakis, A. Tserepi, E. Gizeli : An integrated microfluidics-on-SAW ("μF-on-SAW") setup for multi-sample sensing. 2008 IEEE International Frequency Control Symposium, FCS, Article number 4623015, 337-340, 2008.

[163] E. Guyon, J.-P. Hulin, L. Petit: Hydrodynamique physique. EDP Sciences - CNRS Editions 2001, 674 pages.

[164] Patrick Tabeling : Introduction to Microfluidics. OxfordUniversity Press, 2005

[165] F. Josse, F. Bender, R.W. Cernosek : Guided shear horizontal surface acoustic wave sensors for chemical and biochemical detection in liquids. Analytical Chemistry V.73 : 5937-5944, 2001.

[166] E. Gizeli : Design considerations for the acoustic waveguide biosensor, Smart Materials and Structures V.6 : 700–706, 1997.

[167] E. Gizeli : Study of the Sensitivity of the Acoustic Waveguide Sensor. Analytical Chemistry V.72 : 5967–5972, 2000.

[168] P. Mazein: Etude de dispositifs à ondes de Love par modélisationnumérique de la propagationd'ondesacoustiques. Application à l'optimisation de structures et à la caractérisation de matériaux en vue de la réalisation de capteurschimiques. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2005.

[169] N. Moll : Étude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus oude bactéries. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 3385, 29 juin 2007.

[170] D.S. Ballantine, R.M. White, S.J. Martin, A.J. Ricco, E.T. Zellers, G.C. Frye, H. Wohltjen : Acoustic wave sensors. Theory, design and physicochemical applications. Published by Academic Press, San Diego, 1997, ISBN 0-12-077460-7, 436 pages.

[171] V. Tsukruk, I. Luzinov et D. Julthongpiput : Sticky Molecular Surfaces : Epoxysilane Self-Assembled Monolayers, Langmuir,15 ; 3029–3032, 1999.

[172] N. Moll, D.H. Dinh, E. Pascal, C. Déjous, J.-P. Pillot, B. Bennetau, D. Rebière, D. Moynet, Y. Mas, J. Pistré : Enhancement of antibody binding on SiO2 love wave sensor surface using (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane. Materials Research Society Symposium Proceedings V.915 : 23-29, 2006.

[173] J. B. Haun1, N. K. Devaraj, S. A. Hilderbrand, H. Lee, R. Weissleder : Bioorthogonal chemistry amplifies nanoparticle binding and enhances the sensitivity of cell detection. NATURE NANOTECHNOLOGY 5 : 660-665, 2010.

[174] J. D. Bass, D. Grosso, C.v Boissiere, E. Belamie, T. Coradin, C. Sanchez : Stability of Mesoporous Oxide and Mixed Metal Oxide Materials under Biologically Relevant conditions. Chem. Mater., V.19(17) : 4349-4356, 2007.

[175] D. Voet, J. Voet : Biochemistry (3rd Ed.)

[176] D. H. Dinh: Nouveaux films moléculaires sensibles pour la mise au point d'un microsystème de détection rapide de biomolécules. Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 10 juillet 2007.

[177] G. Tortissier : Étude et développement d'une plateforme de détection chimique à ondes acoustiques de surface pour environnement sévère haute température, Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 22 octobre 2009.