



**HAL**  
open science

# Etude et développement de plateformes à ondes de Love dédiées à la détection de phycotoxines

Fabien Fournel

► **To cite this version:**

Fabien Fournel. Etude et développement de plateformes à ondes de Love dédiées à la détection de phycotoxines. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2011. Français. NNT: . tel-00985738

**HAL Id: tel-00985738**

**<https://theses.hal.science/tel-00985738>**

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.

# THÈSE

présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1**

ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR

par **Fabien Fournel**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : ÉLECTRONIQUE

---

Étude d'une plateforme à ondes acoustiques de Love pour la  
détection de phycotoxines dans le Bassin d'Arcachon

---

**Thèse soutenue le : 7 décembre 2011**

Après avis des rapporteurs :

M. Tayeb MOHAMMED-BRAHIM	Professeur, Université de Rennes 1, IETR	RAPPORTEUR
M. Pierre TEMPLE BOYER	Directeur de Recherche, LAAS-CNRS Toulouse	RAPPORTEUR

Devant la commission d'examen composée de :

Mme. Corinne DEJOURS	Professeur, IPB/ENSEIRB-MATMECA, IMS	CO-DIRECTRICE DE THESE
M. Tayeb MOHAMMED-BRAHIM	Professeur, Université de Rennes 1, IETR	EXAMINATEUR
M. Daniel MOYNET	Maître de Conférences – HDR, Université Bordeaux 2, LIP	EXAMINATEUR
M. Dominique REBIERE	Professeur, Université Bordeaux 1 – IUT, IMS	DIRECTEUR DE THESE
M. Benoît SAUTOUR	Professeur, Université Bordeaux 1, EPOC	PRESIDENT DU JURY
M. Pierre TEMPLE BOYER	Directeur de Recherche, LAAS-CNRS Toulouse	EXAMINATEUR

Mme. Hélène BOISSERIE	Chargée de mission, Conseil Régional d'Aquitaine	INVITEE
M. Luc VELLUTINI	Maître de Conférences, Université Bordeaux 1, ISM	INVITE







A mes parents, ma famille

A mes amis et mon crew

*"Saw one transmission, on the television, saying I can't do my job.  
Well, I just keep dancing. Don't hate me 'cause I'm handsome and the beat will never stop."*

R. Williams, Knutsford City Limits.



## REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier M. Pascal Fouillat, directeur de l'IMS Bordeaux, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je remercie Mme Nathalie Labat, alors directrice de l'école doctorale des sciences physiques de Bordeaux 1, M. Dominique Rebière et Mme Corinne Dejous, directeur et co-directrice de thèse, de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet. Je tiens également à remercier tous les acteurs des projets ASCOBAR et OSQUAR, tout particulièrement M. Benoît Sautour, coordinateur des projets du Réseau de Recherche Littorale Aquitain. En effet, la Région Aquitaine, l'Union Européenne et le Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) ont apporté un soutien financier important à ces travaux, notamment le financement de mon allocation de recherche.



Je souhaite aussi exprimer ici ma vive reconnaissance aux différentes personnes qui ont accepté de participer en tant que membres du jury: M. Tayeb Mohammed-Brahim et M. Pierre Temple Boyer, que je remercie également pour avoir accepté d'être rapporteurs du manuscrit, M. Benoît Sautour, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de soutenance, M. Daniel Moynet, ainsi que Mme Hélène Boisserie et M. Luc Vellutini, en tant que membres invités.

Ces travaux pluridisciplinaires ont fait appel à plusieurs spécialistes. Que Bernard Bennetau, Marie Degueil, Luc Vellutini, Jean-Paul Pillot du laboratoire ISM ainsi que Daniel Moynet et Maria Mamani-Matsuda du LIP trouvent ici le témoignage de ma vive gratitude. Je remercie tout particulièrement Etienne Baco, récemment docteur en chimie, qui a travaillé sur ce projet avec moi et qui a assuré une partie importante pour l'élaboration de la plateforme de détection.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux aux membres de l'équipe MDA qui m'ont accompagné, certains plus longtemps que d'autres. Merci, donc, à Céline Zimmermann, Vincent Raimbault, Grégory Tortissier, Laurianne Blanc, Ibtissem Gammoudi et Nima Aouled. Je remercie plus particulièrement Hakim Tarbague, dont les discussions, digressions



et autres échanges, scientifiques ou non, m'ont beaucoup fait progresser en tant que chercheur et en tant qu'être humain.

De manière plus générale, ma reconnaissance s'adresse aussi à tous les doctorants, post-doctorants, voisins de bureaux et camarades de pause-café de l'IMS. Un grand merci à tous pour leur accueil et leur générosité.

Enfin, je veux remercier toutes les personnes qui ont partagé leurs connaissances au cours de ces travaux, en particulier les membres de l'équipe TEAM du LAAS de Toulouse. Merci à Matthieu Guirardel du LOF Pessac pour sa contribution dans les premiers temps de la conception de la plateforme. Je tiens à adresser un remerciement spécial à Serge Destor pour ses réalisations mécaniques indispensables à la plateforme de détection, ainsi que pour ses conseils lors des phases de conception et nos autres discussions.

## INTRODUCTION

Ces travaux de thèse ont pour objectif de montrer la faisabilité d'une plateforme de détection de phycotoxines par ondes acoustiques, et plus particulièrement par ondes de Love, en milieu liquide. Ils ont été soutenus par des cofinancements de la Région Aquitaine et du Fonds Européen de Développement Régional (FEDER) dans le cadre du projet ASCOBAR (Apport SCientifique à la problématique Ostréicole du Bassin d'ARcachon, 2007-2009), suivi du projet OSQUAR (OStréiculture et QUalité du milieu: approche dynamique du bassin d'ARcachon, 2009-2011). Ils représentent un plan de grande envergure, pluridisciplinaire, regroupant des laboratoires scientifiques aussi bien que des organismes professionnels. Ils ont eu pour but d'établir une carte globale des causes et conséquences des événements propres au Bassin d'Arcachon sur son écosystème.

Pour dresser cette vision, le projet, porté par B. Sautour du Laboratoire EPOC (Université Bordeaux 1), a été divisé en plusieurs "volets", chacun spécifique d'une question scientifique tout en s'inscrivant dans cet ensemble. Ainsi, un volet intitulé "Apports Marins" a été consacré à l'étude de l'impact des conditions climatiques et maritimes sur l'apport en biotoxines dans le bassin. Un autre volet, "Apports Continentaux", a visé les pollutions provenant des terres pour y détecter des contaminants biologiques. Le volet "L'huître dans son environnement" a eu pour objet d'étude, l'observation des huîtres dans un milieu contrôlé pour mieux comprendre leur comportement lors d'une perturbation du leur milieu. Le volet "Observations" a, quant à lui, permis de poursuivre le travail passé effectué dans la collecte d'informations tout en développant de nouveaux outils de gestion à l'aide des nouvelles données. Enfin, un dernier volet intitulé "Microcapteurs", dans lequel se situent nos travaux, repose sur un consortium de trois laboratoires de l'Université de Bordeaux, associés pour montrer la faisabilité d'une détection spécifique de phycotoxines par un capteur à ondes acoustique.

Le premier laboratoire partenaire est l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM, CNRS UMR 5255, Université Bordeaux 1). Au-delà des fonctionnalisations chimiques de surface, le rôle principal de l'ISM fut de concevoir et de synthétiser une molécule, appelée mimotope, mimant la formule chimique de la toxine à détecter par notre capteur. Ce travail important et

déterminant a été réalisé dans le cadre des travaux de la thèse d'Etienne Baco, soutenue en mai 2011.

Le deuxième partenaire au sein du consortium est le Laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie (LIP, UFR Sciences Pharmaceutiques, Université Victor Segalen Bordeaux 2), spécialisé dans le domaine de la biologie. Son rôle a été de proposer et valider les protocoles biologiques, notamment dans le cadre des travaux de post-doctorat de Maria Mamani-Matsuda. C'est également dans ses locaux que les expériences de détection avec les capteurs ont été effectuées.

Enfin, le laboratoire de l'Intégration du Matériau au Système (IMS, CNRS UMR 5218, IPB, Université Bordeaux 1) a apporté son expertise dans le domaine des capteurs et technologies des microsystèmes. C'est dans ce laboratoire d'électronique que les capteurs, associant dispositifs à ondes acoustiques de surface et puces microfluidiques, ont été conçus, en partie réalisés, puis caractérisés, que l'instrumentation des tests à venir a été élaborée et que les conditions expérimentales ont été simulées. Les moyens de la plateforme technologique TAMIS<sup>1</sup> du laboratoire, notamment une salle blanche, étaient aussi à disposition, offrant des technologies nécessaires au développement de la plateforme de détection. Des étapes classiques de réalisations de technologies sur silicium ont été mises en œuvre au LAAS-CNRS (Toulouse, UMR 8001) dans le cadre d'un projet du Réseau Technologique de Base (RTB – Novatech). Une étape de la réalisation du moule de la puce microfluidique a également été réalisée au Laboratoire du Futur (LOF, laboratoire mixte Rhodia / CNRS / Université Bordeaux 1, UMR 5258).

La proximité géographique de nos trois laboratoires a permis une synergie et une grande réactivité indispensables à l'aboutissement d'un tel projet.

---

<sup>1</sup> TAMIS: Technologies Alternatives aux Microsystèmes Silicium (<http://www.ims-bordeaux.fr/IMS/pages/pageDynamiqueIMSExt.php?guidPage=tamis>)

Le premier chapitre de ce mémoire portera sur les biotoxines maritimes et permettra d'introduire le sujet par rapport à la problématique posée par le projet ASCOBAR. Il s'agira ici de se familiariser avec le vocabulaire propre de l'ostréiculture et de comprendre les rouages que forment les réglementations et les différents acteurs de ce domaine. La première partie décrira de manière non exhaustive les phytoplanctons ainsi que leur rôle dans l'écosystème. Il y sera également abordé les types d'empoisonnement provoqués par leur phycotoxines. La réglementation et le contexte économique seront ensuite abordés, avec une description succincte des organismes en charge de ces domaines. Un état de l'art sur les méthodes classiques de détection et d'analyse des biotoxines maritimes viendra clore ce premier chapitre.

Le deuxième chapitre introduira les notions de capteurs et de biocapteurs, en particulier ceux consacrés à la détection d'agents pathogènes. En deuxième partie, nous nous focaliserons sur les ondes acoustiques, leurs propriétés, les différents types d'ondes existants, et sur leur utilisation en tant que méthodes de biodétection. Une approche théorique sur la microfluidique qui sera intégrée à la plateforme sera détaillée à la fin de ce chapitre. Il résumera les éléments théoriques à prendre en compte pour la conception de la plateforme en vue du chapitre suivant.

Le troisième chapitre présentera la plateforme de détection à ondes acoustiques dans sa globalité. Une première partie détaillera la conception et le développement du matériel utilisé ainsi que les simulations et expériences effectuées en validation. Les étapes de fabrication de la puce microfluidique par moulage seront également mentionnées. La seconde partie portera sur l'impact des améliorations apportées sur les performances des capteurs acoustiques. Leurs caractéristiques en présence d'un milieu liquide et avec des fluides complexes y seront aussi reportées. La fonctionnalisation de la surface des capteurs et la quantification du nombre d'anticorps greffés seront brièvement abordées. Une présentation du banc de test conclura ce chapitre dédié à la partie "matériel" de la thèse.

Enfin, le quatrième et dernier chapitre exposera les expériences de détection de deux phycotoxines de familles différentes ainsi que l'explication de leur protocole spécifique. Une interprétation des résultats et le calcul du seuil de détection de la plateforme seront également proposés, avant de conclure et d'ouvrir des perspectives sur ces travaux.

**2011**

Etude d'une plateforme à ondes acoustiques de Love  
pour la détection de phycotoxines dans le Bassin d'Arcachon

---

SOMMAIRE

<b>Chapitre I – Biotoxines Maritimes: Description, Réglementation &amp; Détection</b>	<b>1</b>
<b>Introduction</b>	<b>2</b>
<b>Partie I.1 – Phytoplanctons et Phycotoxines</b>	<b>2</b>
I.1.A) Description et rôle des phytoplanctons dans l'écosystème	2
I.1.B) Phycotoxines et types d'empoisonnement par consommation de chair de coquillages	5
I.1.B.1. Ciguatera (CFP)	5
I.1.B.2. Saxitoxine (PSP)	6
I.1.B.3. Brevetoxine (NSP)	7
I.1.B.4. Acide okadaïque (DSP)	8
I.1.B.5. Acide domoïque (ASP)	9
I.1.C) Récapitulatif et chronologie des symptômes	10
<b>Partie I.2 – Contexte économique de la problématique conchylicole</b>	<b>12</b>
I.2.A) Enjeux économiques au Bassin d'Arcachon	12
I.2.B) Hiérarchie des organismes de surveillance	13
I.2.C) Evolution des normes de contrôles et projets de réglementation	16
<b>Partie I.3 – Détections et Analyses des risques maritimes</b>	<b>19</b>
I.3.A) Comptage de cellules phytoplanctoniques	19
I.3.B) Méthodes d'analyses des phycotoxines	20
I.3.B.1. Analyses Biologiques	20
I.3.B.2. Analyses Biochimiques	22
I.3.B.3. Analyses Chimiques	25
I.3.C) Comparaison avec le test idéal	27
<b>Bilan</b>	<b>31</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>33</b>
<b>Chapitre II – Du Phénomène Biologique au Signal Physique</b>	<b>41</b>
<b>Introduction</b>	<b>42</b>
<b>Partie II.1 – Les Biocapteurs</b>	<b>42</b>
II.1.A) Introduction générale et intérêts des biocapteurs	42
II.1.B) Détection d'agents pathogènes	43
<b>Partie II.2 – Capteur à ondes acoustiques</b>	<b>44</b>
II.2.A) Origine des ondes acoustiques	45
II.2.B) Génération d'une onde acoustique	47

II.2.B.1. Le substrat piézoélectrique _____	47
II.2.B.2. Le transducteur interdigité (IDT) _____	48
II.2.B.3. La couche guidante _____	49
II.2.C) Propriétés et caractéristiques des capteurs à ondes acoustiques _____	49
<b>Partie II.3 – Phénomènes détectés par les capteurs acoustiques _____</b>	<b>51</b>
II.3.A) Evénements à accentuer _____	51
II.3.A.1. Effet de masse _____	51
II.3.A.2. Transport des espèces et microfluidique _____	53
II.3.A.3. Formation de complexe biologique antigène/anticorps _____	57
II.3.A.4. Continuité de l'énergie jusqu'à l'interface matériau / milieu _____	59
II.3.B) Perturbations extérieures. _____	61
II.3.B.1. Densité et viscosité _____	61
II.3.B.2. Champs électromagnétiques _____	62
II.3.B.3. Autres perturbations _____	63
<b>Bilan _____</b>	<b>65</b>
<b>Bibliographie _____</b>	<b>67</b>
<b>Chapitre III – Conception et développement de la plateforme à ondes acoustiques _____</b>	<b>71</b>
<b>Introduction _____</b>	<b>72</b>
<b>Partie III.1 – Géométrie des lignes à retard à ondes de Love _____</b>	<b>72</b>
<b>Partie III.2 – Développement de la puce microfluidique _____</b>	<b>74</b>
III.2.A) Architecture de la puce _____	74
III.2.B) Calcul d'écrasement, d'écoulement et de comportement fluidique _____	76
III.2.B.1. Simulation de déformation par déplacement imposé _____	77
III.2.B.2. Simulation d'écoulement microfluidique _____	80
III.2.B.3. Calcul des nombres de la microfluidique de notre plateforme de détection _____	83
III.2.C) Fabrication de la puce microfluidique: moule et polymère _____	87
<b>Partie III.3 – Caractérisation et performance des capteurs à ondes de Love _____</b>	<b>88</b>
III.3.A) Pertes d'insertion et phase des capteurs à ondes de Love _____	88
III.3.B) Influence d'un milieu liquide _____	93
III.3.C) Comportement avec des fluides complexes (PEG) _____	95
<b>Partie III.4 – Banc de test microfluidique et fonctionnalisation du capteur _____</b>	<b>97</b>
III.4.A) Greffage des anticorps biorécepteurs _____	97
III.4.A.1. Protocole de greffage _____	97
III.4.A.2. Quantification et distribution des anticorps _____	97
III.4.B) Instrumentation _____	100
III.4.B.1. Banc de test _____	100
III.4.B.2. Protocole général de manipulation _____	101

<b>Bilan</b>	<b>103</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>104</b>
<b>Chapitre IV – Applications à la Détection de phycotoxines</b>	<b>105</b>
<b>Introduction</b>	<b>106</b>
<b>Partie IV.1 – Détection d'acide okadaïque (DSP)</b>	<b>106</b>
IV.1.A)Préparatifs pour la détection de l'acide okadaïque	106
IV.1.A.1. L'acide okadaïque et la 6xhistidine	106
IV.1.A.2. L'anticorps anti-acide okadaïque	107
IV.1.A.3. Préparation de la couche immuno-sensible	109
IV.1.B)Détection de l'acide okadaïque (phycotoxine DSP)	113
IV.1.B.1. Protocole de détection par méthode sandwich	113
IV.1.B.2. Réponse du capteur à la seconde injection de l'anticorps	114
IV.1.C)Interprétation et Seuil sanitaire	115
<b>Partie IV.2 – Détection de l'acide domoïque (ASP)</b>	<b>116</b>
IV.2.A)Préparatifs pour la détection de l'acide domoïque	116
IV.2.A.1. Retour sur la problématique du projet ASCOBAR	116
IV.2.A.2. Synthèse de l'haptène	117
IV.2.A.3. Fabrication et caractérisation des anticorps	119
IV.2.B)Détection d'acide domoïque par la plateforme acoustique à ondes de Love	121
IV.2.B.1. Particularité pour la détection de l'acide domoïque	122
IV.2.B.2. Préparatif et Protocole	123
IV.2.B.3. Variations de fréquence et Comparaison des résultats	125
a. Greffage de la couche sensible	125
b. Etape de compétition à l'acide domoïque-thyroglobuline	128
c. Analyse des résultats	130
IV.2.C)Détection au seuil sanitaire	131
<b>Bilan &amp; Perspectives</b>	<b>133</b>
<b>Conclusion générale</b>	<b>135</b>
<b>Annexes</b>	<b>137</b>



**2011**

Etude d'une plateforme à ondes acoustiques de Love  
pour la détection de phycotoxines dans le Bassin d'Arcachon

---

# Chapitre I – Biotoxines Maritimes: Description, Réglementation & Détection

<b>Introduction</b>	<b>2</b>
<b>Partie I.1 – Phytoplanctons et Phycotoxines</b>	<b>2</b>
I.1.A) Description et rôle des phytoplanctons dans l'écosystème	2
I.1.B) Phycotoxines et types d'empoisonnement par consommation de chair de coquillages	5
I.1.B.1. Ciguatera (CFP)	5
I.1.B.2. Saxitoxine (PSP)	6
I.1.B.3. Brevetoxine (NSP)	7
I.1.B.4. Acide okadaïque (DSP)	8
I.1.B.5. Acide domoïque (ASP)	9
I.1.C) Récapitulatif et chronologie des symptômes	10
<b>Partie I.2 – Contexte économique de la problématique conchylicole</b>	<b>12</b>
I.2.A) Enjeux économiques du Bassin d'Arcachon	12
I.2.B) Hiérarchie des organismes de surveillance	13
I.2.C) Evolution des normes de contrôles et projets de réglementation	16
<b>Partie I.3 – Détections et Analyses des risques maritimes</b>	<b>19</b>
I.3.A) Surveillance des cellules phytoplanctoniques	19
I.3.B) Méthodes d'analyses des phycotoxines	20
I.3.B.1. Analyses Biologiques	20
I.3.B.2. Analyses Biochimiques	22
I.3.B.3. Analyses Chimiques	25
I.3.C) Comparaison avec le test "idéal"	27
<b>Bilan</b>	<b>31</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>33</b>

## INTRODUCTION

Ce premier chapitre vise à poser les bases du problème conchylicole présent dans le Bassin d'Arcachon et plus généralement dans le monde. Il n'est nullement question de faire la synthèse des documents produits par l'ensemble des agences, centres de surveillance et autres laboratoires, mais d'introduire le sujet en exposant son intérêt et sa complexité.

### Partie I.1 – Phytoplanctons et Phycotoxines

#### *I.1.A) Description et rôle des phytoplanctons dans l'écosystème*

Le phytoplancton constitue la partie végétale du plancton en opposition avec le zooplancton qui correspond à la partie animale. Comme tout végétal, il est autotrophe, c'est-à-dire qu'il produit lui-même son énergie à l'aide des nutriments environnants, de certains gaz dissous et, bien sûr, de la lumière pour la photosynthèse. Les phytoplanctons eucaryotes ont leur chlorophylle dans des chloroplastes situés dans le cytoplasme de la cellule. Pour les procaryotes, comme les cyanobactéries, elle est confinée dans la membrane externe [Cav00].

Le phytoplancton a joué un rôle important dans la création de l'atmosphère en transformant le dioxyde de carbone dissous dans l'eau en oxygène, dans les premiers instants de l'apparition de la vie sur Terre. Aujourd'hui encore, il constitue un poumon insoupçonné de la planète, à l'instar des forêts vierges d'Amazonie.

Il constitue également la principale source alimentaire des huîtres et des mollusques en général. Pour s'en nourrir, les huîtres filtrent une masse d'eau correspondant jusqu'à "1500 fois le poids de nourriture retenu" [Rob05]. Cette capacité à filtrer l'eau de leur environnement en font des capteurs naturels, ou bio-accumulateurs, retenant métaux lourds et autres polluants dans leurs glandes digestives jusqu'à de très fortes concentrations sans provoquer leur mort.

Les naissains, jeunes huîtres tout juste fixées sur leur support, se nourrissent de nanoplanctons, de 4 à 20  $\mu\text{m}$  de longueur. Un déficit en nanoplancton, dû aux herbicides utilisés en été, à du zooplancton prédateur ou une température aquatique basse, a un effet négatif sur le captage (étape de fixation des naissains) [Aub04].

Une prolifération excessive de phytoplancton est appelée efflorescence algale ("bloom" en Anglais). Ces efflorescences algales sont connues de l'Homme depuis l'Antiquité. Il y a trois types d'efflorescence algale à différencier.

La première provoque un changement de couleur de l'eau sans grande conséquence bien que le manque d'oxygène puisse nuire à certains animaux marins de petite taille. G.H. Hallegreff fait le parallèle entre l'événement biblique de la première des dix plaies d'Egypte ("*...et toutes les eaux du fleuve [le Nil] furent changées en sang. Les poissons qui étaient dans le fleuve périrent, le fleuve se corrompit, les Égyptiens ne pouvaient plus boire l'eau du fleuve...*", Exode 7, 20-21), et un épisode de prolifération d'algues rouges très concentrées entraînant l'asphyxie des poissons et des invertébrés [Hal95].

La deuxième, qui concerne plus particulièrement l'Homme, est à base de phytoplanctons ou bactéries contenant des toxines dangereuses pour l'Homme s'il consomme les fruits de mers contaminés. La première efflorescence algale de ce type, reconnue en 1978, fut reportée en 1793 par le Capitaine George Vancouver dans l'actuel Canada [Hal95].

Enfin, le troisième type correspond à des micro-algues s'attaquant spécifiquement aux poissons et petits invertébrés [Hal95]. Par exemple, des maladies et la mort chez certains animaux peuvent être entraînées par une présence en masse de cyanobactéries [Cod05].

La prolifération de micro-algues apparaît sous certaines conditions de salinité d'eau, de température, de lumière et de concentration en nutriments. En plus de ces paramètres environnementaux, les efflorescences algales sont aussi dépendantes de facteurs biochimiques tels que la synthèse de métabolites et autres inhibiteurs / activateurs du cycle cellulaire du phytoplancton. L'aspect le plus important concerne les nutriments ; plus il y en a, plus le nombre de cellules par litre sera grand. Cependant, la production de toxines augmente typiquement lorsqu'il y a pénurie de nutriment (phosphate et silice), ce qui correspondrait à une réponse au stress [Cem06].

Le phytoplancton est présent sur l'ensemble du globe. La classe des diatomées est la plus représentée (Fig. I-1), en quantité, suivie par celle des dinoflagellés (Fig. I-2). Les cyanobactéries sont aussi regroupées avec les phytoplanctons en raison de leur capacité de photosynthèse. Ensemble, ces phytoplanctons représentent près de 3000 espèces différentes recensées au début du XX<sup>ième</sup> siècle [Per08], parmi lesquelles seules quelques unes sont productrices de toxines (environ 6%) [Mar06].

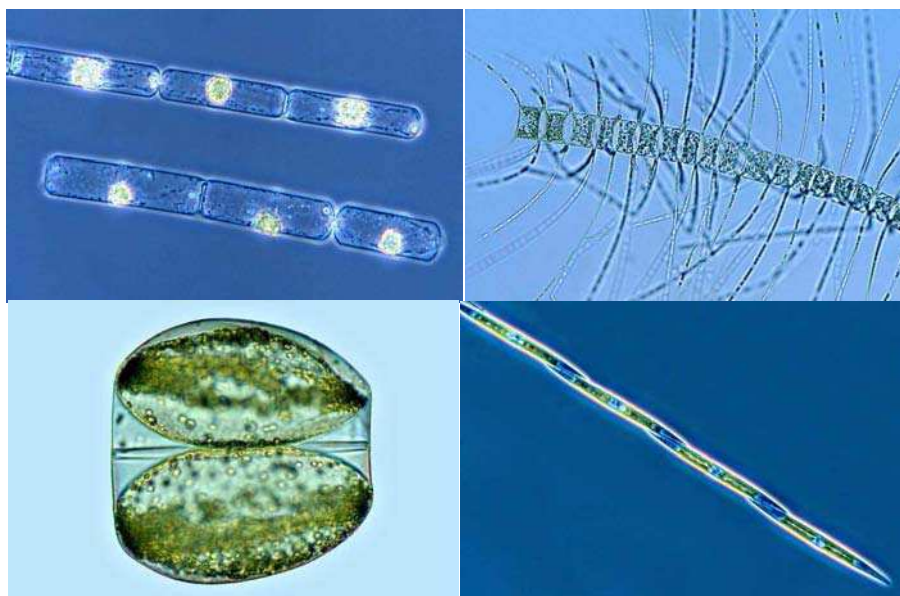


Fig. I-1: Différentes diatomées. De gauche à droite et de haut en bas:  
*Cerataulina pelagica* (50-90 $\mu$ m x  $\varnothing$ 20-50 $\mu$ m), *Chaetoceros eibonii* ( $\varnothing$ 30 $\mu$ m),  
*Coscinodiscus granii* ( $\varnothing$ 195 $\mu$ m), *Pseudo-nitzschia multiseriis* (102 $\mu$ m x  $\varnothing$ 5 $\mu$ m).  
Photographies extraites du Guide des Diatomées de M. Loir [Loi04].

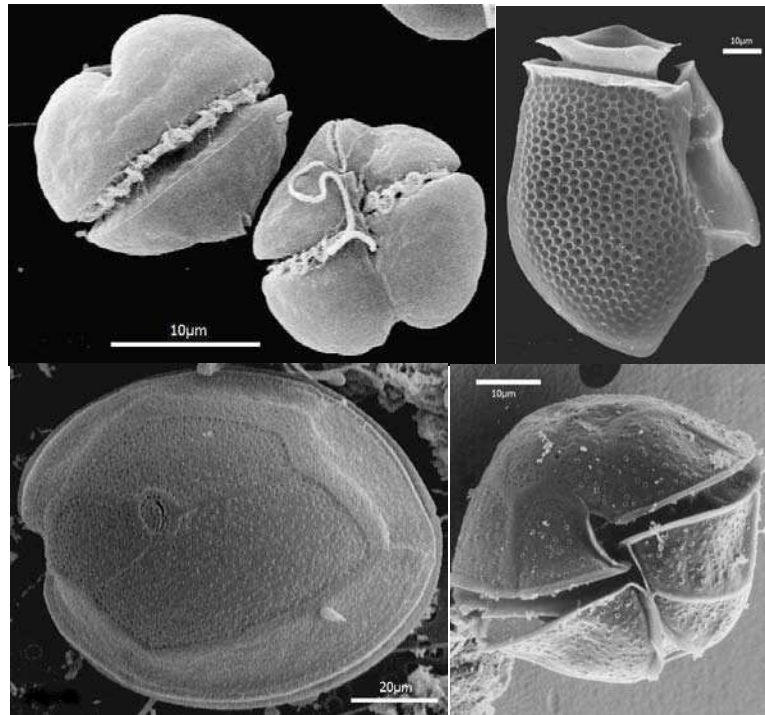


Fig. I-2: Exemples de dinoflagellés. De gauche à droite et de haut en bas:  
*Karenia (Gymnodinium) brevis* (Ø15µm), *Dinophysis acuta* (Ø70µm),  
*Gambierdiscus toxicus* (Ø80µm), *Alexandrium cohorticula* (Ø60µm).

Photographies extraites de "Marine and Estuarine Harmful Algal Blooms" de J. Landsberg *et al.* [Lan05].

### I.1.B) *Phycotoxines et types d'empoisonnement par consommation de chair de coquillages*

Les phycotoxines sont des toxines produites par le phytoplancton. Celles qui sont responsables d'empoisonnement chez l'Homme sont des endotoxines; elles ne sont libérées que lorsque l'organisme producteur est détruit [Mar06].

#### I.1.B.1. Ciguatera (CFP)

L'intoxication alimentaire la plus connue (depuis le début du XVI<sup>ième</sup> siècle) concerne un empoisonnement par consommation de poissons, et plus particulièrement des récifs coralliens [FAO04]. Elle est appelée CFP (pour Ciguatera Fish Poisoning) et est causée par la

ciguatera, toxine qui s'accumule chez les poissons prédateurs chassant de plus petits poissons eux-mêmes contaminés. Ce n'est donc pas un empoisonnement par consommation de chair de coquillage à proprement parler, bien que la toxine responsable soit produite par du phytoplancton. Elle entraîne des troubles cardio-vasculaires et neurologiques et surtout des démangeaisons spécifiques de cet empoisonnement.

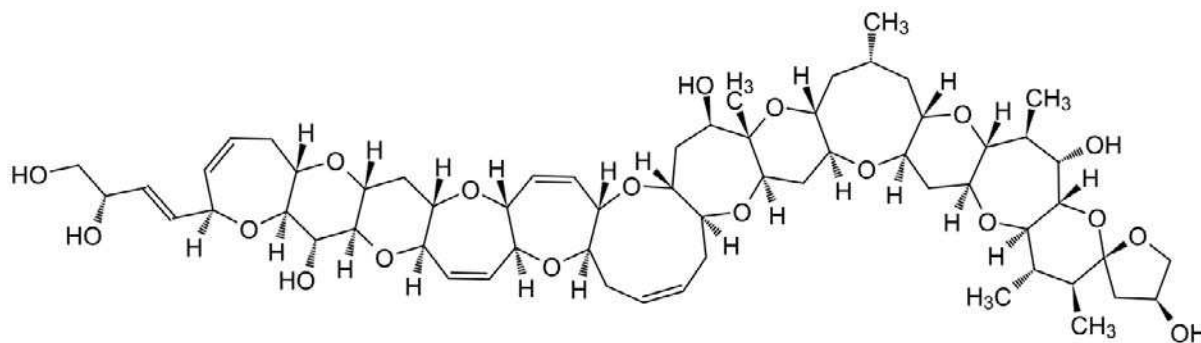


Fig. I-3: Formule chimique de la Ciguatera, phycotoxine causant la CFP.

Le phytoplancton responsable est le dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* bien que d'autres phytoplanctons puissent produire des variantes de la toxine. Les symptômes peuvent apparaître après seulement 30 minutes et durer jusqu'à plusieurs mois. Néanmoins, dans la plupart des cas, les premiers signes apparaissent généralement entre 24 et 48 heures après l'ingestion.

### I.1.B.2. Saxitoxine (PSP)

La première efflorescence algale de l'ère moderne (1793) contenait une phycotoxine provoquant un empoisonnement de type PSP (pour Paralytic Shellfish Poisoning) [Ifr06p]. La toxine alors responsable était mortelle pour une concentration de seulement 500µg pour 100g de chair de coquillages (5 ppm) [Hal95]. Une paralysie progressive de la victime survient peu de temps après la consommation des fruits de mers empoisonnés (entre 5 et 30 minutes). Engourdissement des lèvres, contraction de la gorge, crampe d'estomac, font partie des symptômes. Une surconsommation peut entraîner la mort par paralysie des muscles respiratoires [Ifr06p].

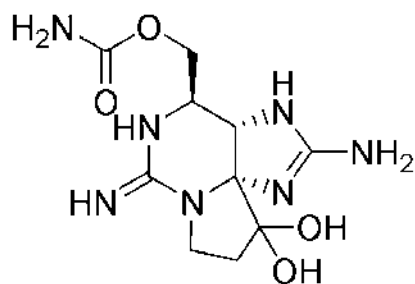


Fig. I-4: Formule chimique de la Saxitoxine, principale phycotoxine causant la PSP.

Les phycotoxines entraînant cet empoisonnement ont été observées dans certains genres de diatomées, en particulier dans les espèces *catenella*, *minutum*, *tamarense* du genre *Alexandrium* et dans les espèces *phoneus*, *bahamense* du genre *Pyrodinium*. Certaines cyanobactéries (*Anabena circinalis*, *Aphanizomenom*) peuvent aussi en contenir [Cod05].

### I.1.B.3. Brevetoxine (NSP)

En 1844, le Golf du Mexique et la côte Est de la Floride ont été sujets à des cas d'empoisonnement de type neurologique (Neurologic Shellfish Poisoning, NSP) [FAO04]. Les symptômes commencent entre 30 minutes et 3 heures après le repas et peuvent durer plusieurs jours. Ils regroupent ceux de la PSP et de la CFP, attaquant le système nerveux et pouvant aller jusqu'au coma.

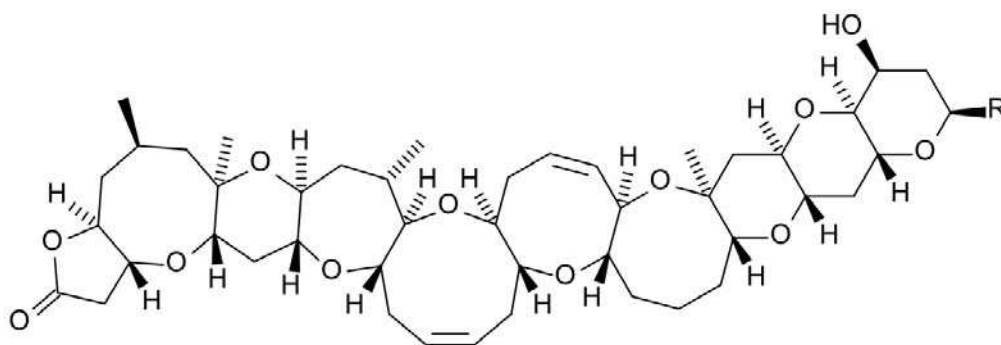


Fig. I-5: Formule chimique de la Brevetoxine, principale phycotoxine causant la NSP.



La forme principale de la phycotoxine responsable, la Brevetoxine (Fig. I-5), a été retrouvée dans le dinoflagellé du genre *Karenia* (aussi appelé *Gymnodium*) d'espèce *brevis*. D'autres dérivées de la toxine ont été observées dans d'autres espèces d'autres genres.

#### I.1.B.4. Acide okadaïque (DSP)

Des phycotoxines responsables d'empoisonnement de type DSP (pour Diarrheic Shellfish Poisoning) ont été découvertes pour la première fois en 1960 aux Pays-Bas [Ifr06d]. Un empoisonnement de type DSP provoque la diarrhée ainsi que des nausées et des vomissements 30 minutes à 12 heures après ingestion de la chair de coquillage contaminé. Dans 70% des cas, ces symptômes apparaissent en moins de 4 heures.

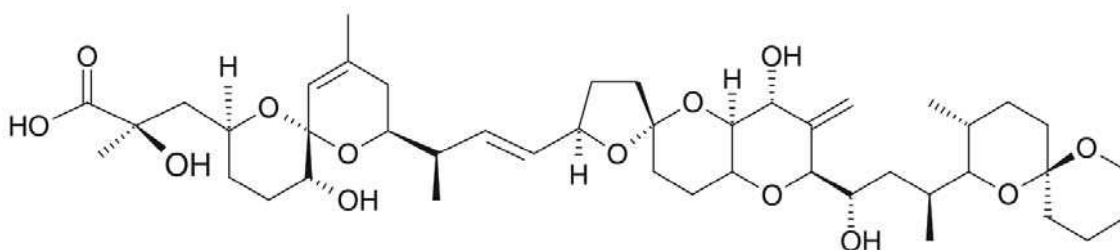


Fig. I-6: Formule chimique de l'acide okadaïque, principale phycotoxine causant la DSP.

Cette toxine (Fig. I-6), ses dérivés (les dinophysistoxines, DTXs), peuvent être produites par les espèces *acuminata*, *acuta*, *caudata*, *sacculus* du dinoflagellé *Dinophysis*. Certaines autres phycotoxines, les pectenotoxines (PTXs), sont transformées chimiquement à l'intérieur des mollusques et n'entraînent plus d'intoxication. D'autres phycotoxines, rattachées à la DSP à leur découverte et appelées les yessotoxines (YTXs), s'attaquent plutôt aux muscles cardiaques ou au foie sans provoquer de diarrhées. D'autre encore, réunissant les symptômes neurologiques de la DSP, sont appelées azaspiracides (AZAs).

### I.1.B.5. Acide domoïque (ASP)

En 1987, au Canada, survint le premier cas d'empoisonnement ASP (Amnesic Shellfish Poisoning). Il fit 4 morts et 141 intoxications [Ifr06a]. Un empoisonnement de ce type se présente d'abord comme celui d'un DSP avec vomissements et nausées jusqu'à 24 heures après ingestion des fruits de mer contaminés. Les troubles neurologiques et les pertes de mémoire immédiate (qui ont donné le nom à l'empoisonnement) surviennent après 1 jour et jusqu'à 48 heures après le repas [Ifr06a].

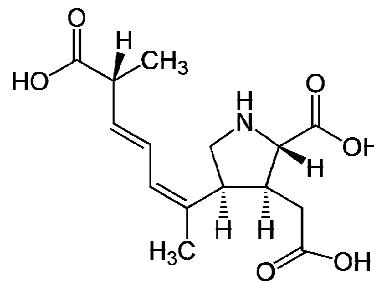


Fig. I-7: Formule de l'acide domoïque, principale phycotoxine causant l'ASP.

Les principaux phytoplanctons producteurs de cette phycotoxine sont les espèces de diatomées *multiseriis*, *pseudodelicatissima*, *australis* du genre *Pseudo-Nitzschia*. Au printemps 2003 eu lieu une efflorescence algale de *Pseudo-Nitzschia australis* dans le canal de Santa Barbara en Californie. La concentration en cellules pouvait atteindre 2 millions par litre avec jusqu'à 1,5 µg d'acide domoïque par litre, engendrant une haute mortalité parmi les animaux marins de la région [And06]. Les sites nerveux cibles des neurotoxines de type ASP diffèrent selon l'isomère. L'acide domoïque reste tout de même la plus dangereuse des variantes [Saw07].

Historiquement, ce n'est qu'en 1970 que les intoxications dues à la consommation de fruits de mers sont reliées aux proliférations de micro-algues toxiques [Ifr06].

### *I.1.C) Récapitulatif et chronologie des symptômes*

L'augmentation du nombre d'observations d'efflorescences algales toxiques au cours des trente dernières années s'explique par plusieurs facteurs. En premier lieu vient "l'accroissement de l'intérêt scientifique suscité par les espèces toxiques" suivi de "l'augmentation de l'utilisation des eaux côtières pour l'aquaculture" [Hal95]. La dégradation des milieux aquatiques par l'activité humaine couplée ou non à des conditions climatiques exceptionnelles, et le transport involontaire de toxines par voie maritimes (dans les réservoirs à eaux des bateaux) ou routières (déplacement de stocks de coquillages contaminés) ont aussi joué un rôle. Il est d'ailleurs reporté dès 1989 que l'activité humaine aurait une incidence sur le développement d'algues toxiques [Hal95].

La prévision d'une efflorescence algale productrice de toxines est souvent impossible à ce jour par la complexité des paramètres mis en jeu. Les nutriments nécessaires à la production de phycotoxines varient selon le type. Il apparaît aussi que leur productivité est liée au stress physiologique dû à l'absence de nutriment. Le taux de nutriment présent dans le milieu ne permet cependant pas de conclure à une efflorescence algale toxique. Des études mesurant la teneur en nutriments à l'intérieur du phytoplancton seraient nécessaires afin de compléter la connaissance des mécanismes mis en jeu en vue d'apporter les bonnes conclusions quant aux épisodes phycotoxiques [Gra06].

Les espèces phytoplanctoniques sont difficilement identifiables et seules certaines sont toxiques [Ifr06a]. De plus, les toxines étant ingérées par les coquillages, elles peuvent être modifiées chimiquement. Ainsi, une analyse des moules, généralement accumulatrices de toxines, s'est révélée négative à l'acide domoïque alors que sa présence était prouvée [Sch00]. Une recombinaison peut également survenir comme pour les toxines de type PSP [Ifr06p].

Les Hommes ne sont pas les seuls touchés par les empoisonnements par phycotoxines (jusqu'en 1995, 2000 cas par an dont 15% mortel) [Hal95]. Les gros animaux ingurgitant beaucoup de poissons ou de plancton peuvent aussi y être sujets [Hal95]. Des lions de mers ont été retrouvés morts empoisonnés vraisemblablement après avoir mangé des poissons planctonivores lors d'une efflorescence algale de *Pseudo-Nitzschia australis* (produisant de l'acide domoïque) [Sch00].

La Fig. I-8 illustre les risques d'apparition des symptômes d'un empoisonnement par consommation de chair de coquillages en fonction du temps écoulé après le repas.

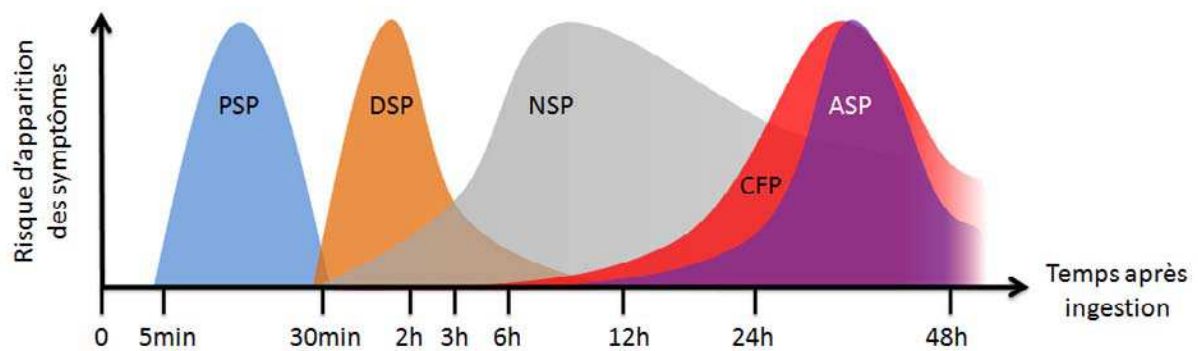


Fig. I-8: Chronologie des apparitions des symptômes selon le type d'empoisonnement.

La problématique des micro-algues toxiques est complexe et son étude nécessite des experts dans de multiples domaines. Le but final à atteindre est et restera la prédiction d'apparition de ces micro-algues; les principaux éléments influant sur l'apparition et/ou le développement d'une efflorescence algale étant les conditions climatiques, la prolifération de phytoplancton est aussi "prévisible que la météo" [Hal95]. Le traitement statistique des données accumulées sur le phytoplancton a mis en évidence la nécessité d'une étude poussée, avec de nouvelles données, des conditions météorologiques et océaniques sur les efflorescences algales [Gai03].

## Partie I.2 – Contexte économique de la problématique conchylicole

Le problème du phytoplancton toxique est un problème mondial touchant tous les pays côtiers. Les cas les plus graves d'empoisonnement ont eu lieu à l'extérieur de la France métropolitaine, comme en 1927 aux États-Unis ou en 1987 au Canada [Ifr06p, Ifr06d]. De nos jours, le nombre de cas mortels a diminué grâce aux centres de surveillance nationaux.

Cette partie du mémoire n'abordera que succinctement les enjeux face à cette problématique, en se positionnant sur le plan national, et plus particulièrement sur le Bassin d'Arcachon.

### I.2.A) *Enjeux économiques du Bassin d'Arcachon*

Le Bassin d'Arcachon constitue un enjeu écologique et économique très important pour la région Aquitaine. L'aspect écologique s'observe sur une immense étendue d'eau de plus de 15 milles hectares regroupant une faune et une flore aquatiques à préserver. Sur ses terres se situent des forêts qui contribuent à leur tour à l'équilibre de l'écosystème. Cette zone est propice à la conchyliculture et à la pêche. D'un point de vue ostréicole, le Bassin d'Arcachon est notamment le principal fournisseur de naissains en France [Aub04]. Ce cadre accueillant attire également des plaisanciers tout au long de l'année. L'ensemble de ces activités ont des répercussions directes sur l'environnement local surtout lors de la période estivale, de juin à septembre, lorsque la fréquentation est à son maximum.

En 1970 eut lieu la dernière épidémie où un virus décima l'huître *Crassostrea angulata* d'origine portugaise, présente alors partout en France et en Europe [Com76]. L'implantation dans le bassin de l'huître creuse japonaise résistante au virus, la *Crassostrea gigas*, permit de sauver l'ostréiculture française.

Le captage des naissains, première étape dans l'élevage des huîtres qui consiste en la fixation des larves d'huîtres sur les tuiles, connaît une décroissance inquiétante depuis 1998

[Aub04]. Ce faible captage a été imputé aux basses températures océaniques survenues lors des étés 1998, 2002, 2005 et 2007 [Mau07].

En plus de ces soucis de production, les interdictions de ventes d'huîtres avaient fortement entaché la réputation de ces coquillages. En 2006, un budget de 1,35 millions d'euros fut débloqué par M. Bussereau, alors ministre de l'agriculture et de la pêche, pour une publicité nationale afin de restaurer leur image [Off06].

Ces exemples de crises de natures très différentes illustrent bien la complexité des enjeux dans le Bassin d'Arcachon.

### *1.2.B) Hiérarchie des organismes de surveillance*

Il existe de nombreux organismes, en France, s'occupant de la problématique phytoplanctonique: administrations, ministères (reformés régulièrement), organisations ou syndicats. Les laboratoires d'analyses peuvent y être rattachés ou bien être indépendants bien que tous soient plus ou moins directement sous la tutelle de l'État.

Au-dessus de tous se trouve l'Europe, qui réglemente, commissionne et dirige certaines de ces institutions. Les normes appliquées sont élaborées en fonction de ce qui existe déjà au niveau mondial et en particulier par ce qui est défini par la Food and Drug Administration (FDA). Les tests de détection effectués par les laboratoires sont mis en place par le laboratoire communautaire de référence (LCR); il a une autorité européenne sur le domaine pour lequel il a été accrédité. Pour l'analyse des biotoxines marines, c'est le laboratoire de Vigo situé en Espagne (Laboratorio del Ministerio de Sanidad y Consumo). Il transmet alors ses recommandations aux laboratoires nationaux de référence (LNR) de chaque pays. Il est bien sûr également le LNR espagnol [Pui06]. En France, c'est l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES) qui joue le rôle de LNR pour les biotoxines marines. Le LCR en microbiologie, The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, CEFAS, UK, conjointement au service d'hygiène alimentaire du Food Standards Agency, FSA,

propose de nouvelles réglementations, améliorant les "systèmes d'informations géographiques" et permettant "une approche multicritères de l'évaluation des risques" [Off06].

Les ministères de la Santé et des Solidarités, de l'Agriculture et de la Pêche, de l'Economie, des Finances et de l'Industrie peuvent alors saisir l'ANSES pour demande d'avis sur les conditions d'exploitation ostréicole. En plus des suivis de phytoplanctons et de phycotoxines, la surveillance de la croissance de bactéries pathogènes ainsi que la veille pour l'apparition de nouvelles espèces font aussi partie des attributions de l'agence [Afs06].

L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER (IFREMER) a mis en place deux réseaux de surveillance: le REseau de surveillance MIcrobiologique (REMI) et le REseau de surveillance du PHYtoplancton et des phycotoxines (REPHY, créé en 1984) [Afs06]. Par les moyens qu'ils mettent en œuvre, ils font autorité dans leur domaine et effectuent eux-mêmes l'échantillonnage et l'analyse des eaux côtières. En effet, les laboratoires d'IFREMER se situent sur tout le littoral français.

Depuis 1998, le dispositif de surveillance français est composé des laboratoires du REPHY et de ceux de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL). Ils contrôlent respectivement, les zones de production en bord des côtes, sous la houlette d'Ifremer-Nantes (laboratoire expert phycotoxines) et de la Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture (DPMA), et les coquillages sur les marchés territoriaux [Afs06]. Le laboratoire IFREMER d'Arcachon assure également le suivi de la reproduction des huîtres du Bassin d'Arcachon [Mau07].

C'est le COmité FRançais d'ACcréditation (COFRAC) qui autorise les laboratoires à effectuer les tests d'analyses [Pui06]. Olivier Cunin de la DGAL, fait remarquer qu'il est difficile de répondre au nombre d'analyses demandées (500 sur l'année 2004 et 2005). Sachant qu'elles doivent être effectuées sur les trois types de toxines (DSP, PSP et ASP), cela fait plus de 1500 tests prévus par an. Il a aussi attiré l'attention sur le fait que le LNR n'a confirmé qu'un seul résultat non conforme sur 10 en 2005 pour la DSP [Rep06]. Cependant les laboratoires, accrédités ou en cours d'accréditation, ont aussi un rôle de vigilance et peuvent

faire remonter au LCR leur remarques ou suggestions quant aux protocoles de détection ou sur certains échantillons.

La prévention d'un risque d'efflorescence algale nécessite une approche pluridisciplinaire, comme le concluent Landsberg *et al.* [Lan05]. Pour répondre à l'attente des commerçants, des élus et des organismes sanitaires, le Comité National de la Conchyliculture (CNC), la DPMA, la DGAL et l'IFREMER se sont regroupés pour former le Comité d'Orientation Scientifique et Technique et d'Evaluation (COSTE) [Rep06]. Le bureau du comité, constitué de professionnels, d'administratifs et d'experts scientifiques, est composé de 12 membres dont un fait partie de la Direction Générale "Santé et protection des consommateurs" au niveau européen [Cos06]. Le COSTE a défini trois axes d'envergure nationale, alloués aux instances d'autorité. Ainsi le thème "Santé des Consommateurs" est géré par l'ANSES. L'IFREMER est chargé de la "Filière de Production" avec les centres techniques, ainsi que du thème "Environnement". Le Comité National de la Conchyliculture est présent sur les trois.

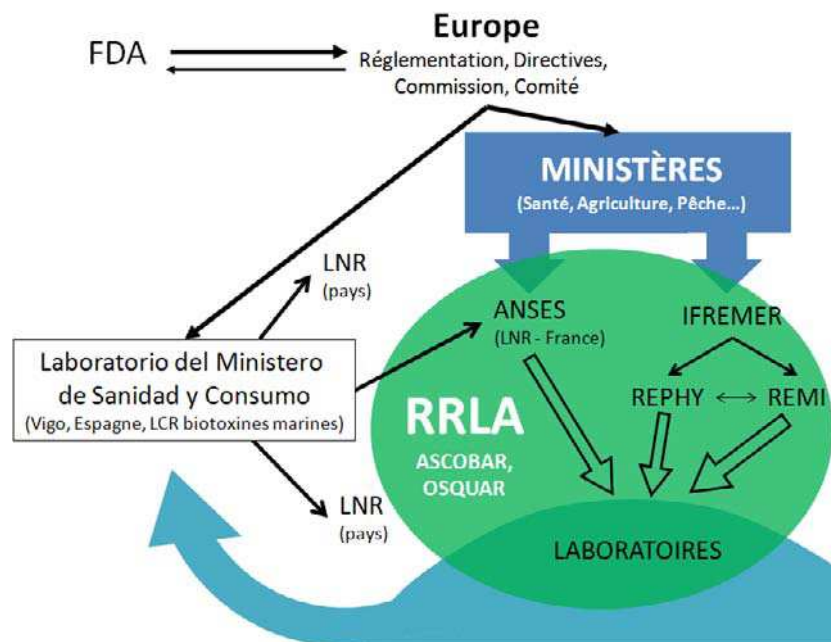


Fig. I-9: Organigramme simplifié des acteurs sur la problématique des biotoxines marines.

Les projets ASCOBAR (Apport SCientifique à la problématique Ostréicole du Bassin d'ARcachon) et OSQUAR (OStréiculture et QUALité du milieu approche dynamique du bassin



d'Arcachon), ont été menés par le consortium du Réseau de Recherche Littorale Aquitain (RRLA). Il regroupe des scientifiques publics et privés, des professionnels, des organismes, des administrations et des politiques. Ainsi tous les aspects de la problématique sont étudiés et mis en commun de façon novatrice. Les moyens matériels déjà à disposition des équipes scientifiques ont énormément facilité le déroulement des projets [RRLA09].

### *I.2.C) Evolution des normes de contrôles et projets de réglementation*

Les normes sanitaires visent à assurer un équilibre entre les risques "Producteur" et les risques "Consommateur", comme l'a schématisé Benoit Beliaeff, coordinateur scientifique à IFREMER [Rep06]. Pour le consommateur, le risque est défini comme une contamination avérée sans qu'elle ne soit décelée par les indicateurs phytoplanctoniques [Afs06]. Pour le producteur, à l'inverse, c'est qu'il subisse une interdiction de vente alors que sa marchandise est sans danger pour l'Homme. La définition même des seuils de salubrité reste floue et très générale. Par exemple, les jeunes enfants et les personnes âgées sont plus vulnérables aux empoisonnements de type ASP [If06a] et un coquillage qui ne provoque pas d'empoisonnement pour une personne n'est pas pour autant non-contaminé. Une notion plus juste serait de rapporter la quantité de phycotoxines au poids du consommateur. Cette approche a été réalisée par Hubert Grossel (IFREMER Nantes), Françoise Marco-Miralles (IFREMER Toulon) et Sophie Trotereau (LNR, ANSES Maisons Alfort) en définissant le seuil de salubrité de la phycotoxine responsable du syndrome ciguaterique (en  $\mu\text{g}$ ) à une portion de poisson de 250 g pour un individu de 60 kg ( $\mu\text{g}/\text{g}/\text{kg}$ ) [Rep06].

Sur le littoral français, la présence de trois types de toxines a été répertoriée entre 1995 et 2005: la DSP, la PSP et l'ASP. Sur le Bassin d'Arcachon, la DSP et la PSP touchent les huîtres et les moules [Rep06]. L'ASP n'y est pas reportée bien que le seuil d'alerte pour la concentration cellulaire en *Pseudo-Nitzschia* (phytoplancton producteur d'acide domoïque) soit régulièrement atteint dans le bassin [If06]. Catherine Belin de l'IFREMER, indique une évolution majeure, en 2006, dans la stratégie de surveillance du réseau REPHY pour le Bassin

d'Arcachon. Il s'agit de la surveillance systématique des toxines de types PSP, c'est-à-dire, la pratique régulière de tests de la souris quelle que soit la concentration phytoplanctonique même hors période à risques **[Rep06]**. Ces "périodes à risques" sont revues annuellement.

Djahne Montabord de la DPMA, souligne la nécessité d'adapter les échantillonnages en fonction des zones et des périodes à risques **[Rep06]**. Toutefois, l'ANSES a supprimé la dénomination de "zone à risque" dans le Bassin d'Arcachon, de par "l'absence de pertinence d'une telle démarche" **[Afs06]**.

L'incompréhension règne chez les ostréiculteurs. L'observation de 24 heures pour le test de la souris est remise en cause et plus généralement le test lui-même à cause de son protocole trop invasif. Les réponses positives aux toxines telles que les yessotoxines et les pecténotoxines, dont la toxicité chez l'Homme n'a pas encore été observée, ne devraient pas être prises en compte **[Off06]**. Virginie Hossen, du Laboratoire National de Référence, rejoint les producteurs sur ce point. Elle rapporte des différences entre la réglementation à appliquer et les résultats obtenus "par la consultation d'expert" au sujet des seuils sanitaires "trop sévères" et du fait que "le bioessai sur souris n'est pas adapté à chacune des toxines" **[Rep06]**. L'Association des Producteurs de Moules En Galice, OPMEGA, a également montré "les limites de la gestion réglementaire des problèmes liés aux toxines marines" **[Off06]**.

La Direction Générale des Affaires Maritimes et de la Pêche de la Commission Européenne a encouragé l'"investissement dans la recherche appliquée au développement du secteur de la pêche et de l'aquaculture". Toutefois, les ostréiculteurs veulent accélérer les choses et sollicitent la Commission Européenne et le gouvernement français à "réagir promptement" **[Off06]**.

En 2009, après une énième interdiction de commercialisation, 165 établissements producteurs ont été visés par une opération de contrôle suite à l'arrêté du 22 juillet. En deux jours, 37 infractions ont été relevées dont 24 en dépit d'un refus d'obtempérer **[AFP09]**. Les ostréiculteurs contrevenant aux arrêtés préfectoraux d'interdictions de vente d'huîtres se sont exposés à une contravention de 11 euros à 38 euros **[LeP09]**. Pour permettre la commercialisation de coquillages lors d'arrêté, la Section Régionale Conchylicole (SRC) du

Bassin d'Arcachon et le Préfet de Gironde ont proposé un protocole de décontamination à l'aide de bassins. Toutefois, l'ANSES met en doute l'efficacité d'une telle procédure, le système de "zone refuge" n'étant pas adaptable au Bassin d'Arcachon du fait de l'irrecevabilité de la sectorisation. [Afs06].

Olivier Laban, membre du bureau de la Section Régionale Conchylicole (SRC) Arcachon-Aquitaine, a réaffirmé son point de vue concernant la mise en place d'un "nouveau test de référence au niveau de la réglementation européenne" [AFP09]. Samedi 2 janvier 2010, le ministère de l'Agriculture remplace officiellement le test de la souris par le test chimique, effectué sur les prélèvements du 18 janvier 2010 [LeP10].

## Partie I.3 – Détections et Analyses des risques maritimes

### I.3.A) *Surveillance des cellules phytoplanctoniques*

La surveillance des espèces phytoplanctoniques se fait de trois façons différentes selon les espèces visées. Les "flores totales" suivent l'évolution sur toute l'année de toutes les espèces dans leur ensemble. Les "flores partielles indicatrices" visent certaines espèces toxiques pour l'homme ainsi que celles à haute concentration tandis que les "flores partielles toxiques" comptabilisent toutes les espèces à potentiel toxique [Afs06].

Les équipements d'échantillonnage de phytoplanctons ont évolué du simple filet au système de pompe à tuyaux souples, en passant par l'échantillonneur en tube. Tous les trois sont toujours d'actualité. En plus de la récolte de planctons, certains systèmes sont couplés à des capteurs de température et de salinité pour les mesurer et les renseigner avec la profondeur d'échantillonnage dans la colonne d'eau. Les relevés de températures peuvent être effectués par satellite mais uniquement à des fins de contrôles car seule la surface de l'eau est observable, ce qui ne prend pas en compte les mouvements marins sous-jacents [Hal95]. Des prélèvements d'eau de mer complémentaires sont souvent effectués par les marins, précise Ronan Le Goff d'IFREMER Port en Bessin. Elle est alors analysée en termes de température et de salinité, ainsi que pour son taux d'oxygénation, sa turbidité et sa concentration en sels nutritifs. La "chlorophylle a" est aussi utilisée comme indicateur de présence phytoplanctonique, souligne Anne Grouhel d'IFREMER Nantes, et peut être observée par imagerie satellite (Francis Gohin, IFREMER Brest) [Rep06].

L'équipe de Chantal Compère d'IFREMER Brest a développé un biocapteur détectant, à l'aide d'une QCM (Quartz Crystal Microbalance) et d'anticorps spécifiques, les protéines propres à chaque espèce phytoplanctonique [Rep06]. Une version avec des brins d'ADN, immobilisés à la surface d'une des électrodes de la QCM, a également été développée par cette équipe [Bus09]. Le dénombrement de phytoplanctons peut également être effectué avec une électrode à ARN, dont la séquence est complémentaire d'une protéine de la membrane d'une espèce. L'équipe de D.I. Greenfield *et al.* a conçu un robot submersible, embarquant

cette électrode. L'énumération de cellules de *pseudo-nitzschia* est concordante avec les tests effectués en laboratoire pour des concentrations supérieures à  $2,5 \times 10^4$  cellules par litre [Gre06, Gre08]. La détection des cyanobactéries se fait à l'aide d'un test ELISA bien qu'il ne soit pas possible de déterminer la toxicité d'une efflorescence sur seulement quelques colonies bactériennes [Cod05].

La surabondance de planctons toxiques entraîne un empoisonnement des coquillages. Cependant, les épisodes de contamination révélés par le test de la souris ne sont pas toujours corrélés avec une présence excessive de phytoplanctons responsables ou même potentiellement responsables. Cela signifie que le dénombrement de phytoplancton est pris à défaut et ne peut suffire comme indicateur d'alerte [Afs06]. De plus, l'échantillonnage phytoplanctonique ne peut quantifier que trois des quatre étapes décrites par Steidinger (1983) sur l'efflorescence algale: la croissance, la concentration et la dispersion. La première, l'initiation, nécessite des analyses physiologiques poussées sur tous les paramètres précédemment énoncés [Hal95].

### *I.3.B) Méthodes d'analyses des phycotoxines*

Jusqu'en 2010, une réponse positive inexplicée du test sur souris déclenchait une recherche de toxines par mesures chimiques. C'est ainsi qu'ont été identifiés de nouveaux dérivés de phycotoxines produits par certaines espèces jusqu'alors ignorées de par leur faible concentration lors des recensements [Pui06].

#### **I.3.B.1. Analyses Biologiques**

Les tests d'analyses biologiques sont effectués sur des animaux, soit vivants (*in vivo*), soit sur un de leurs organes préalablement disséqué ou bien cloné (*in vitro*) [Do196]. Les conclusions des tests *in vivo* se font sur l'observation du comportement des animaux, ce qui demande une attention constante et un personnel qualifié. Les analyses *in vitro* nécessitent

quant à elles, la reconstitution des conditions biologiques, comme l'apport des nutriments aux cellules [Ker02].

L'analyse de référence pour toutes les toxines est celle de la souris. Une solution liquide à analyser est injectée par voie intrapéritonéale dans trois souris. L'extraction de cette solution, à partir de la chair de coquillages sélectionnés, se fait par méthode chimique approuvée par AOAC International (Association of Analytical Communities). Si au moins deux souris sur trois meurent, la réponse est positive. Le temps d'observation dépend de la phycotoxine à analyser (cf. Fig. I-8).

L'une des premières utilisations du test de la souris comme dispositif de surveillance remonte à 1944 [Hal95]. Ce test biologique sur souris était sujet à une ambiguïté de réglementation; il était autorisé par la Commission Européenne (qui gère les intérêts de l'Union) de par son utilisation mondiale, mais sans être approuvé par le Comité Européen à cause de l'implication de sacrifices d'animaux, en opposition avec la réglementation européenne du Conseil de l'Union Européenne [Afs06, CE03, LeP10]. D'autres méthodes d'analyses peuvent être utilisées en fonction du type de toxines à détecter. Le test sur les rats permet d'identifier la présence de phycotoxines de type DSP, tout comme les tests sur puces d'eau (Fig. I-10a), sur lapins ou encore sur nourrissons de souris. La brevetoxine (NSP) peut être détectée avec le test sur poissons [FAO04].

Les tests *in vitro* ont permis la détection d'autres types de toxines. La présence de la saxitoxine (PSP), la brevetoxine (NSP) ou de l'acide domoïque (ASP) induisent une réponse spécifique lors de l'analyse des tranches d'hippocampes de rats (Fig. I-10b) [Ker99, Saw07]. Le blocage de canaux sodiques [Jel92], l'analyse cytotoxique [Tub96] ou celle de l'accroche de récepteurs nerveux [Dol94] (et par marquage radioactif [And01]) sont autant de méthodes alternatives.

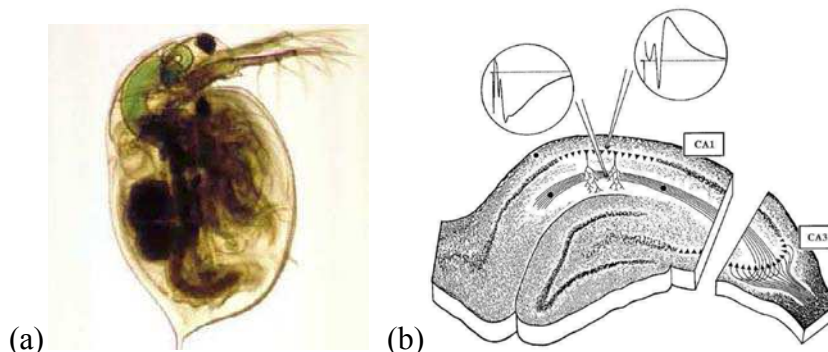


Fig. I-10: (a) Photo d'une puce d'eau (*Daphnia magna* femelle). (b) Schéma pour l'analyse d'une tranche d'hippocampe de rats.

Le principal inconvénient des tests biologiques, d'après l'agence écossaise Fisheries Research Services (FRS), outre le sacrifice d'animaux, est qu'ils ne constituent pas "une méthode fiable" et sont difficilement automatisables. "Toute la communauté scientifique s'accorde pour constater que les méthodes biologiques ne sont pas adaptées à toutes les classes de toxines" [Off06].

### I.3.B.2. Analyses Biochimiques

Le principe des analyses biochimiques repose sur les réactions chimiques du Vivant.

La plus répandue est celle dite de l'ELISA (pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) qui base sa réponse sur la formation de complexes antigènes / anticorps où l'antigène est la phycotoxine en question. La formation de ce complexe est relevée avec un anticorps secondaire couplé à une enzyme induisant un changement de colorimétrie en présence de son substrat. La fabrication de l'anticorps spécifique se fait principalement par couplage de la toxine à une protéine de BSA (Bovine Serum Albumin, cf. IV.2.A.1) puis de l'injection de cette molécule dans un lapin (ou dans une souris [Kaw99]). La réponse immunitaire de l'animal se traduit par la fabrication des dits anticorps (IgG, ImmunoGlobuline de type G). La méthode de détection généralement retenue est la compétition entre la toxine présente dans les extraits de coquillage et la toxine préalablement immobilisée sur la plaque de micro-titration (Fig. I-11). Un contrôle "blanc" est effectué sans la présence des toxines extraites. Ainsi, plus la concentration en toxine extraite est importante, plus les sites affins des anticorps

spécifiques sont occupés, et moins ils peuvent se fixer sur les toxines immobilisées. La présence de la toxine extraite se traduit alors par une décroissance colorimétrique du conjugué de la peroxydase couplé à l'IgG anti-lapin (produit par une chèvre) utilisé pour la révélation des complexes.

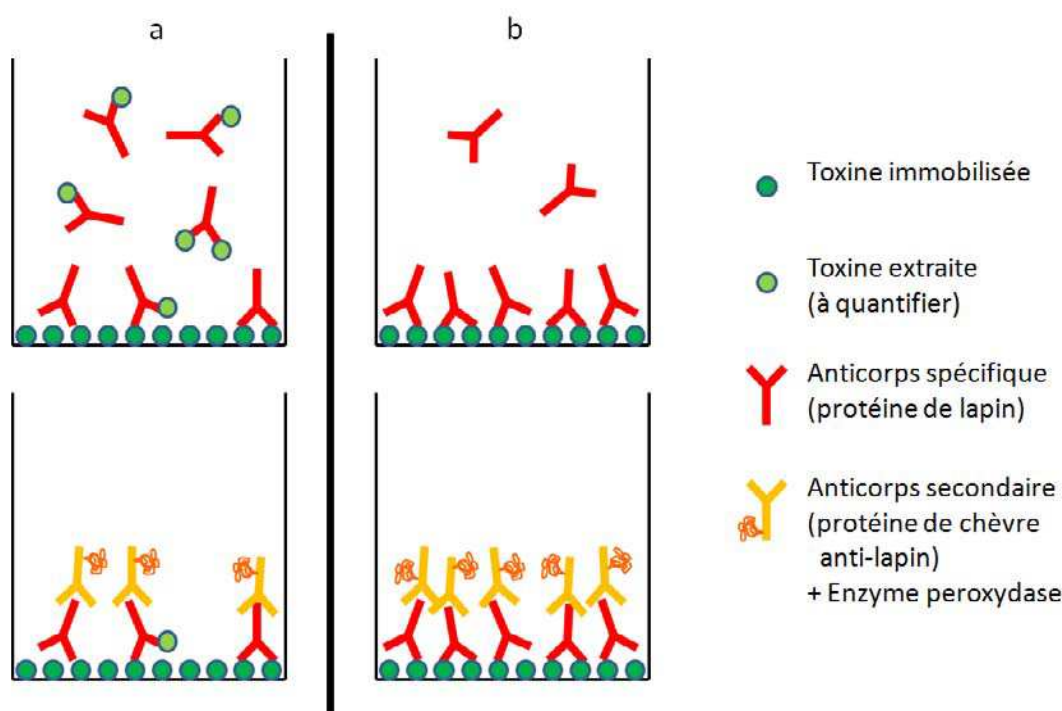


Fig. I-11: Protocole simplifié d'un test ELISA pour compétition directe: a. mesure, b. contrôle "blanc".

Ce test est plus sensible que la chromatographie en phase liquide, d'autant plus que la phase de purification de cette dernière peut enlever une partie des phycotoxines avant la détection. Les toxines de type PSP peuvent être détectées à des concentrations inférieures à  $80 \mu\text{g} / 100 \text{g}$  de chair de coquillages et les ASP sont détectables jusqu'à  $40\text{ng}$  d'acide domoïque par gramme ( $0,04 \text{ ppm}$ ) avec des anticorps monoclonaux et à  $0,01 \text{ ppm}$  avec des anticorps polyclonaux. La brevetoxine (NSP) peut être décelée à  $2,5 \mu\text{g}/100 \text{g}$  de chair ( $0,025 \text{ ppm}$ ) [FAO04].

Cependant, le principal défaut du test ELISA est sa non-spécificité vis-à-vis d'isomères très proches (et parfois non toxiques). Ainsi, la présence des dérivés d'acide okadaïque (AO) entraîne une sous-estimation du test ELISA sur l'AO. Le test pour la DSP peut aussi être mis en défaut si la toxine est sous sa forme ester. De plus, des réactions croisées entre les



anticorps et les différentes variantes d'une phycotoxine peuvent apparaître selon les tests utilisés.

Une variante du test ELISA, le RIA (pour Radio Immuno Assay), utilise des isotopes, émettant des radiations, pour quantifier le nombre de formation de complexe. Ceci permet une mesure directe sans le passage de l'anticorps secondaire, ainsi qu'un très bon seuil de détection (0,2 pg AO / ml d'extrait de coquillages) [FAO04]. Toutefois, la difficulté de créer l'isotope (un hydrogène est remplacé par un tritium [ $^3\text{H}$ ] [Dol94]) et les appareils de mesure peu conventionnels ont été un frein pour le développement de cette technique.

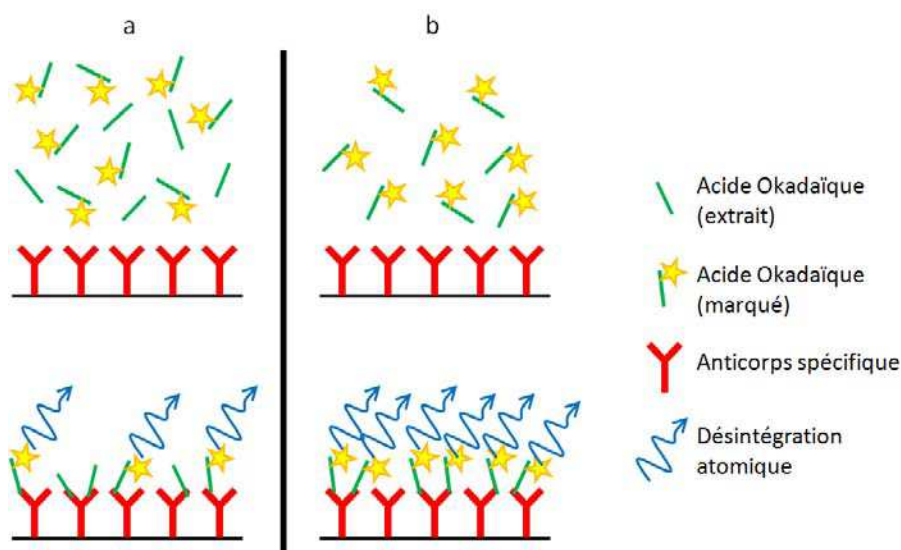


Fig. I-12: Schéma explicatif simplifié d'un test RIA: a. mesure, b. contrôle.

Un test spécifique aux toxines de type DSP, l'analyse des phosphatases acides, se base sur l'inhibition des enzymes phosphatase en leur présence. Avec des enzymes marquées (radioactives) le seuil de détection peut atteindre 2 ng AO / g de chair de coquillages [Tub96]. De manière générale, les techniques avec des marquages radioactifs ont un seuil de détection plus bas mais sont moins développées par rapport aux analyses colorimétriques ou fluorimétriques.

Pour conclure, les tests immunologiques sont basés sur la reconnaissance structurelle des phycotoxines et non sur leur toxicité propre. Ils sont donc sujets aux faux, -positifs et -négatifs, et leur réponse n'est représentative de la toxicité que d'une partie de l'échantillon

[Dol94]. Les techniques biochimiques conservent quelques lacunes des techniques biologiques: la difficulté à détecter de manière reproductible les faibles concentrations de toxines et le fait que les analyses restent dépendantes de l'utilisateur dans la plupart des cas.

### I.3.B.3. Analyses Chimiques

Les analyses chimiques permettent de couvrir l'ensemble des phycotoxines jusqu'à différencier les différents isomères d'une même famille. Elles sont plus sélectives que les autres méthodes et peuvent quantifier des échantillons à faibles concentrations en toxines. Elles sont de plus en plus couplées entre elles pour augmenter le rapport signal sur bruit, le bruit étant dû aux autres molécules chimiques qui perturbent l'analyse. Dans ce cas, une technique, généralement une chromatographie, permet de purifier l'échantillon qui est ensuite analysé.

La chromatographie en phase liquide est la plus utilisée. Le principe est de séparer les phycotoxines du reste de l'échantillon par interactions ioniques entre la phase mobile (l'échantillon) et la phase stationnaire. Cependant, cette technique peut difficilement séparer une phycotoxine de type PSP de ses dérivés [FAO04]. Pour les toxines de type DSP, la limite basse de détection correspond à 100 ng d'acide okadaïque par gramme de chair, soit 0,1 ppm, en dessous de la limite de 0,2 ppm de la législation [FAO04].

La chromatographie en couches minces se distingue par sa phase stationnaire composée d'un gel de silice utilisant l'effet d'absorption par capillarité sur la solution. Cette méthode permet de détecter 1 µg de phycotoxines de type DSP dans 5 g de chair de coquillages [FAO04], et 10 µg d'acide domoïque par gramme pour les phycotoxines ASP (10 ppm contre 20 ppm) avec une détection de fluorescence par UV et un pré-nettoyage [Qui98]. La détection par fluorescence avec une pré-séparation par chromatographie liquide permet de quantifier des concentrations en phycotoxines de type PSP de 0,3 µg pour 100 g de glandes digestives (0.003 ppm) [Amz99]. C'est l'oxydation des toxines de type PSP qui produit une fluorescence mesurable avec une sensibilité accrue par rapport au test souris. Toutefois, un même échantillon doit être analysé plusieurs fois afin de réduire les erreurs de

répétitivité et un grand soin doit être apporté lors du nettoyage du dispositif d'analyse entre chaque mesure [FAO04]. Un test en kit d'immuno-chromatographie en flux latéral est disponible commercialement pour la mesure sur terrain. La réponse est positive à partir de 7 à 60 µg de saxitoxine (équivalent) pour 100g de chair de coquillage [And01].

La Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance (HPLC), surtout couplée à une détection par absorption UV (HPLC/UV), a permis la détection de phycotoxines à des seuils bien plus bas. Ainsi, les phycotoxines de type ASP sont quantifiables à des concentrations très basses: 1 µg / g sans prélavage de l'échantillon et de 20 à 30 ng / g avec prélavage [And01]. Les toxines de type DSP sont détectées à 0,4 µg / g de glandes digestives grâce à la détection fluorimétrique post HPLC (HPLC-FD) [And01].

Les techniques basées sur une chromatographie visent à séparer les molécules entre elles pour quantification. Mais pour connaître la toxicité globale d'un échantillon, la concentration de chaque molécule doit être pondérée par sa toxicité propre [DoI94]. Ceci est possible à l'aide d'un seul système d'analyse: la Chromatographie en phase Liquide couplée à un Spectromètre de Masse (LC-MS/MS). C'est une méthode d'analyse de molécules qui se décompose en trois phases. Premièrement, une chromatographie en phase liquide permet de séparer les molécules contenues dans une solution en fonction de leur hydrophobicité (LC). Ensuite, les molécules arrivant en séquence sont ionisées pour une analyse spectrale de leur masse par effet magnétique (-MS). Enfin, ces molécules sont fragmentées en plus petites parties et ré-analysées pour connaître la composition de la molécule initiale (/MS). Ce second passage au spectromètre de masse améliore la qualification de la molécule analysée.

Cette méthode peut détecter 0,4µg d'ASP par gramme de chair (0,4 ppm) et 1 ng de DSP par gramme (0,001 ppm) [And01]. Sa grande sélectivité est limitée par la base de données internes du système qui permet la reconnaissance des molécules analysées par comparaison [Afs06].

Parmi les méthodes existantes mais peu répandues, l'électrophorèse ne nécessite que quelques nanolitres pour effectuer la détection (1,5 µg de saxitoxine par ml). Le matériel utilisé n'est pas présent dans les laboratoires d'analyses usuels et un équipement de détection supplémentaire est également nécessaire [FAO04]. Une variante de cette technique ajoute une séparation par chromatographie (capillarité) simultanément à la séparation par courant électrique; on parle alors de MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography). Combinée à une détection par UV (MEKC-UV), elle permet de mesurer 10 ng d'acide okadaïque par chair de coquillage [Bou97]. Une méthode alternative pour les toxines lipophiles (DSP) analyse le temps d'absorption et de désorption des phycotoxines dans un polymère poreux [Fux08].

Ainsi, les techniques d'analyses chimiques nécessitent une ou plusieurs étapes de lavage et de séparation des toxines de l'extrait de coquillages. Ces étapes permettent de diminuer le bruit de fond chimique mais peuvent polluer l'échantillon à leur tour. De ce fait, les méthodes de détection présentant un seuil de détection voisin du seuil de salubrité restent des outils de contrôle. Il est à noter que l'équipe d'Olson *et al.* a mis point un instrument de mesure sous-marin permettant l'échantillonnage et l'analyse des phytoplanctons directement dans leur environnement, faisant un pas de plus vers la prévention des risques phytoplanctoniques [Ols07].

### *1.3.C) Comparaison avec le test "idéal"*

Le but de toute analyse est de pouvoir exprimer de manière certaine la présence ou non de phycotoxines. Comme l'a expliqué Dominique Le Gal d'IFREMER Concarneau, à l'aide d'un tableau regroupant les concentrations en phycotoxines de différentes espèces d'un même genre de phytoplancton, "la toxicité des coquillages peut aussi bien provenir d'un bloom<sup>1</sup> majeur à espèces faiblement toxiques" que "d'un bloom mineur à espèces hautement

---

<sup>1</sup> Bloom: anglicisme communément utilisé pour efflorescence algale.

toxiques" [Rep06]. De ce fait, les méthodes d'analyses ont privilégié la détection des phycotoxines directement plutôt que celle des phytoplanctons.

Le test le plus répandu est sans conteste celui de la souris, seul reconnu jusqu'en 2010. Toutefois, il présente quelques inconvénients et des méthodes alternatives sont apparues, en satisfaisant un certain "niveau d'exigence attendu" comme l'a souhaité le UK Home Office [Off06].

Une étude comparative nationale entre le test biologique sur souris et un test chimique (LC-MS/MS) a été effectuée en 2005 sur 255 échantillons de la période 2002-2004 [Afs06].

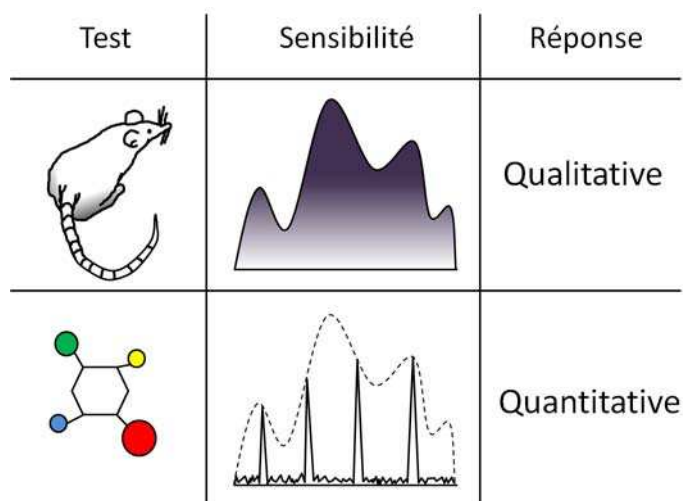


Fig. I-13: Schéma comparant le test souris au test chimique (LC-MS/MS).

En considérant le test chimique comme référence, 20% des tests souris surestimeraient la présence de toxines et 7,5% la sous-estimeraient. Pour le Bassin d'Arcachon, 34 des 35 échantillons n'ont pas concordé. Cet immense écart entre ces deux méthodes peut s'expliquer en partie par la nature de leur système de détection (Fig. I-13); le bio-essai est global tandis que le test chimique est focalisé sur des molécules identifiées [Afs06]. Sophie Kryss du LNR et à l'ANSES de Maisons-Alfort souligne aussi le fait que la compétence de l'analyste influence grandement la qualité du test de la souris [Rep06]. Le tableau Fig. I-14 regroupe les principaux types de méthodes d'analyses en les comparant par critères de choix au test "idéal". Les cases en vert et rouge indiquent si la valeur du critère est compatible ou non, respectivement, avec la réponse attendue idéalement.

	Test idéal	Bio-essai souris Intrapéritonéale	Bio-essai rat oral	Tests Fonctionnels	Tests Immuno-chimiques	Immuno chromatographie à flux latéral (kits)	LC-MS/MS
<b>Spécificité</b>	Haute	Relative selon symptomatologie Risque d'interférences	Pour 2 familles à effet diarrhéique chez l'Homme (AO/DTXs et AZAs)	Famille	Pour quelques analogues / famille Risques d'interférences	Pour quelques analogues / famille	Haute
<b>Temps de mise en œuvre (avec témoins et extractions)</b>	Réduit	2 jours	1-5 jours	<1 jour	<1 jour	0,5 jour	1-5 jours
<b>Réponse Globale de toxicité</b>	+++ (Sécurité)	+++ / toutes familles	+++ / 2 familles	+++ / famille	+++ / famille	+++ / famille	+++ / famille
<b>Possibilité de détection: -d'une toxine non identifiée -de nouveaux analogues de phycotoxines connues</b>	Oui pour vigilance	+++	---	---	---	---	++ (pas en routine)
<b>Fiabilité</b>	Maximale	+++ (conditions strictes)	+	+++	++	++	+++
<b>Faux-positifs</b>	Minimal	Oui - symptômes peuvent le révéler	Pas de recul	Pas de recul	Moyen	Pas de recul	Minima
<b>Faux-négatifs</b>	Minimal	Faible	Pas de recul	Pas de recul	Moderé	Pas de recul	Minima
<b>Réponse qualitative du test</b>	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI
<b>Symptomatologie discriminante (positive ou négative)</b>	OUI	+/-	---	---	---	---	---
<b>Réponse semi-quantitative</b>	OUI	OUI (DL50 = 192µg/kg AO)	OUI (score de 0 à 5 selon la consistance des fèces)	OUI (dépend du kit)	OUI (dépend du kit)	OUI (dépend du kit) Autour du seuil de salubrité	OUI De l'ordre de 30µg/kg
<b>Seuil de sensibilité</b>	<salubrité	160µg/kg pour AO/DTXs, PTXs et AZAs. ? Pour les YTXs	Pas de recul	Pas de données	Pas de données	Pas de données	<10%
<b>Variabilité</b>	Minimale	+/- 20% (issue de l'expérience)	Pas de recul	Pas de données	Pas de données	Pas de données	Pas de données
<b>Réponse quantitative</b>	OUI	NOI	NOI	OUI (dépend du kit)	OUI (dépend du kit)	NOI	OUI
<b>Seuil de sensibilité</b>	< salubrité	Pas de données	Pas de données	Pas de données	Pas de données	Pas de données	De l'ordre de 30µg/kg
<b>Variabilité</b>	Minimale	Pas de données	Pas de données	Pas de données	Pas de données	Pas de données	+++
<b>Besoin en personnel de haute technicité</b>	réduit, automatisé	++	++	++	++	++	+++
<b>Simplicité / transfert en réseau</b>	Maximum	Moyen	Moyen	Maximum	Maximum	Maximum	Minimum
<b>Coût (dont équipement et personnel)</b>	Faible	Moyen	Moyen	Faible	Faible	Faible	Elevé

Fig. I-14: Tableau comparatif des performances des méthodes d'analyse. Source ANSES [Afs06r].

La DL50 définit une concentration seuil de dose létale entraînant la mort de 50% des sujets (des souris).

De l'avis de l'ANSES lors de la saisine de 2006, le test LC-MS/MS a les avantages d'une grande spécificité, rapidité, fiabilité, un seuil de détection bas, et une qualité de réponse qualitative et quantitative. Ses points faibles sont le coût élevé d'une analyse, la haute qualification des opérateurs et la nécessité absolue d'avoir l'empreinte de la toxine à détecter dans la base de données. Son utilisation pour des tests de routine est donc à écarter [**Afs06**].

Pour une méthode donnée, il faut préciser l'efficacité de la méthode d'extraction ou le taux de transfert dans l'organisme pour les analyses sur fluides physiologiques, en préférant une sous-estimation. Les limites de détection, exprimées en concentration par volume d'extraits de coquillages ou de liquides physiologiques, ou en équivalence de chair de coquillages, sont à prendre avec précaution, surtout pour les tests avec un seuil limite très proche de celui de la salubrité. Sans une description complète de la méthode d'extraction choisie, il est impossible de savoir si le seuil spécifié correspond à la réelle concentration contenue dans les coquillages et si la méthode peut supporter la réalité du terrain.



## BILAN

Nous avons vu que le phytoplancton est indispensable à la nutrition des huîtres qui joue un rôle important de filtrage pour l'écosystème marin. Les conditions de production des phycotoxines sont encore mal connues; une efflorescence algale n'est pas toujours signe annonciateur d'un futur empoisonnement des coquillages, qui peuvent survenir en période de calme. Un genre de phytoplancton ne peut pas être incriminé car seules certaines espèces sont toxiques et il existe une multitude de genres de phytoplanctons avec plusieurs milliers d'espèces différentes. De plus, il est difficile de corréler la présence d'une espèce avec un type d'empoisonnement particulier. Les phycotoxines aussi sont très variées; il existe souvent 5 à 10 géométries différentes d'une toxine, appartenant alors à une même famille. Les symptômes non plus, lorsqu'ils sont observés, ne sont pas faciles à mettre en relation avec la présence de toxines dans les coquillages. Devant cette complexité, les organismes sanitaires responsables multiplient les contrôles et les rapports de situations. Le commerce des ostréiculteurs, entreprises familiales pour la plupart, est complètement dépendant des résultats de tests d'analyses. La succession ininterrompue d'arrêtés préfectoraux au fil des ans a poussé certains à se mettre dans l'illégalité, créant une situation d'urgence.

Les moyens de détection pour la prévention d'intoxication par consommation de chair de coquillages sont nombreux et de natures diverses. Chaque méthode a fait l'objet d'améliorations au cours du temps afin de diminuer leurs défauts intrinsèques. Leurs caractéristiques sont évaluées en termes de sensibilité de détection, de facilité d'utilisation et de coût.

Les tests biologiques ont un long historique d'utilisation au niveau mondial mais leur mise en place peut s'avérer complexe. L'utilisation d'animaux vivants nécessite une attention particulière et les tests les impliquant tendent à être diminués. Les analyses biologiques *in vitro* réduisent l'utilisation d'animaux et certaines techniques n'en ont plus besoin. Malgré tout, les résultats aléatoires de ces tests font qu'ils doivent être effectués plusieurs fois en plus d'être difficilement automatisables et donc très dépendant du manipulateur.



Les analyses chimiques sont très performantes mais nécessitent un lourd équipement pour pouvoir être utilisées en routine. Leur principal inconvénient tient du fait qu'elles ne peuvent détecter que ce qu'elles cherchent, à partir d'une base de données connues.

Les méthodes de détections biochimiques représentent un bon compromis, alliant une bonne sensibilité, la possibilité d'automatisation et un équipement peu coûteux.

C'est à cette dernière catégorie qu'appartiennent les biocapteurs. Ainsi, la plateforme de détection à ondes acoustiques de Love développée dans le cadre de nos travaux, vise à réunir la sélectivité d'une bioanalyse et un système facilement intégrable à un système électronique. Toutefois, un certain nombre de paramètres, de conditions expérimentales, doivent être pris en compte pour avoir une détection propre et un résultat significatif.

## BIBLIOGRAPHIE

- [AFP09] Agence France Presse, Interdiction de vente d'huîtres à Arcachon: 37 infractions relevées, AFP, Bordeaux, 28 juillet 2009.
- [Afs06] ANSES, AVIS de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et à l'évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon, Saisine N°2006-SA-0254, 2006.
- [Afs06r] ANSES, RAPPORT SCIENTIFIQUE de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et à l'évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon, Saisine N°2006-SA-0254, 2006.
- [Amz99] Z. Amzil, M.A. Quilliam, T. Hu, J.L.C. Wright, Winter Accumulation of Paralytic Shellfish Toxins in Digestive Glands of Mussels from Arcachon and Toulon (France) without Detectable Toxin Plankton Species Revealed by Interference in the Mouse bioassay for Lipophilic Toxins, *Natural Toxins*, vol. 7, p.271-277, 1999.
- [And01] D.M. Anderson, P. Andersen, V.M. Bricelj, J.J. Cullen, J.E. Rensel, Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters. APEC #201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore, and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59, Paris, 2001.
- [And06] C.R. Anderson, M.A. Brzezinski, L. Washburn, R. Kudela, Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California, *Marine Ecology Progress Series*, vol. 327, p119-133, 2006.
- [Aub04] I. Auby, D. Maurer, Etude de la reproduction de l'huître creuse dans le bassin d'Arcachon, Rapport final. IFREMER, octobre 2004.

- [Bou97] N. Bouaïcha, M.-C. Hennion, P. Sandra, Determination of Okadaic Acid by Micellar Electrokinetic Chromatography with Ultraviolet Detection, *Toxicon*, vol. 35 (2), p. 273-281, 1997.
- [Bus09] E.A. Bustabad, G. Garcia, L. Rodrigez-Pardo, J. Faria, H. Perrot, C. Gabrielli, B. Buscur, M. Lazerges, D. Rose, C. Compère, A. Arnau, A biosensor for detection of DNA sequences based on a 50MHz QCM electronic oscillator circuit, *Sensors*, vol. 1-3, p.687-690, 2009.
- [Cav00] M. Cavalla, Les Algues – Les Microalgues, *L'Opéron – La revue scientifique de l'UPBM*, numéro 16, 2000.
- [CE03] 2003/584/CE: Décision du Conseil du 22 juillet 2003 concernant la conclusion du protocole d'amendement de la convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques, 2003.
- [Cem06] A. Cembella, U. John, *Molecular Physiology of Toxin Production and Growth Regulation in Harmful Algae*, *Ecological Studies*, vol. 189, Edna Granéli and Jefferson T. Turner (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*, 2006.
- [Cod05] G.A. Codd, J. Lindsay, F.M. Young, L.F. Morrison, J.S. Metcalf, From mass mortalities to management measures, J. Huisman, H.C.P. Matthijs and P.M. Visser (eds.), *Harmful Cyanobacteria*, p1-23, 2005.
- [Com76] M. Comps, J.-R. Bonami, C. Vago, D. Razet, La mise en évidence d'une infection virale chez l'huître portugaise à l'occasion de l'épizootie de 1970-1974, *Science et Pêche* (0036-8350) (ISTPM), Vol. 256, p.13-15, 1976.
- [Cos06] C.O.S.T.E., Comité d'Orientation Scientifique et Technique et d'Évaluation, Paris, 27 septembre 2006.

- [Dol94] F.M. Van Dolah, E.L. Finley, B.L. Haynes, G.J. Doucette, P.D. Moeller, J.S. Ramsdell, Development of Rapid and Sensitive High Throughput Pharmacologic Assays for Marine Phycotoxins, *Natural Toxins* 2, p.189-196, 1994.
- [Dol96] F.M. Van Dolah, T.A. Leighfield, B.L. Haynes, D.R. Hampson, J.S. Ramsdell, A Microplate Receptor Assay for the Amnesic Shellfish Poisoning Toxin, Domoic Acid, Utilizing a Cloned Glutamate Receptor, *Analytical Biochemistry* 245, p.102-105, 1996.
- [FAO04] H.P. Van Egmond, M.E. Van Apeldoorn, G.J.A. Speijers, G. Van de Werken, R.W. Stephany, D.G. Groothuis, C. Bélin, Marine biotoxines, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Food and Nutrition Paper (80), Rome, 2004.
- [Fux08] E. Fux, C. Marcaillou, F. Mondeguer, R. Bire, P. Hess, Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1, *Harmful Algae*, vol. 7, p.574-583, 2008.
- [Gai03] I. Gailhard, Analyse de la variabilité spatio-temporelle des populations microalgales côtières observées par le "REseau des surveillance du PHYtoplancton et des phycotoxines" (REPHY), Thèse de Doctorat, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille II, 2003.
- [Gra06] E. Granéli, K. Flynn, Chemical and Physical Factors Influencing Toxin Content, *Ecological Studies*, vol. 189, Edna Granéli and Jefferson T. Turner (Eds.), Ecology of Harmful Algae, 2006.
- [Gre06] D. I. Greenfield, R. Marin III, S. Jensen, E. Massion, B. Roman, J. Feldman, C.A. Scholin, Application of environmental sample processor (ESP) methodology for quantifying *Pseudo-nitzschia australis* using ribosomal RNA-targeted probes in sandwich and fluorescent in situ hybridization formats, *Limnology and Oceanography: Methods*, vol. 4, p.426-435, 2006.
- [Gre08] D.I. Greenfield, R. Marin III, G.J. Doucette, C. Mikulski, K. Jones, S. Jensen, B. Roman, N. Alvarado, J. Feldman, C. Scholin, Field applications of the second-generation

Environmental Sample Processor (ESP) for remote detection of harmful algae: 2006-2007, *Limnology and Oceanography: Methods*, vol. 6, p.667-679, 2008.

[Hal95] G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, A.D. Cembella, H.O. Enevoldsen, *Manual on Harmful Marine Microalgae*, Intergovernmental Oceanographic Commission, Manuals and Guides (33), UNESCO 1995.

[Ifr06] IFREMER, *Phytoplancton et phycotoxines – Bilan des connaissances générales – La surveillance dans le Bassin d'Arcachon*, Direction des opérations / Laboratoire Environnement Ressources, Laboratoire côtier d'Arcachon, juin 2006.

[Ifr06a] IFREMER, *Guide d'information – Phycotoxines amnésiantes (ASP)*, Centre de Nantes, Direction des Opérations, Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines, Laboratoire Phycotoxines, février 2006.

[Ifr06d] IFREMER, *Guide d'information – Complexe des toxines lipophiles: diarrhéiques (DSP) et associées*, Centre de Nantes, Direction des Opérations, Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines, Laboratoire Phycotoxines, février 2006.

[Ifr06p] IFREMER, *Guide d'information – Phycotoxines paralysantes (PSP)*, Centre de Nantes, Direction des Opérations, Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines, Laboratoire Phycotoxines, février 2006.

[Jel92] J.F. Jellett, L.J. Marks, J.E. Stewart, M.L. Dorey, W. Watson Wright, J.F. Lawrence, *Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: automated endpoint determination and standardization of the *in vitro* tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay*, *Toxicon*, vol. 30 (10), p. 1143-1156, 1992.

[Kaw99] K. Kawatsu, Y. Hamano, T. Noguchi, *Production and characterization of a monoclonal antibody against domoic acid and its application to enzyme immunoassay*, *Toxicon*, vol. 37, p.1579-1589, 1999.

- [Ker99] D.S. Kerr, D.M. Briggs, H.I. Saba, A neurophysiological method of rapid detection and analysis of marine algal toxins, *Toxicon*, vol. 37, p.1803-1825, 1999.
- [Ker02] D.S. Kerr, A. Razak, N. Crawford, Age-related changes in tolerance to the marine algal excitotoxin domoic acid, *Neuropharmacology*, vol. 43, p.357-366, 2002.
- [Lan05] J. Landsberg, F.V. Dolah, G. Doucette, Marine and Estuarine Harmful Algal Blooms: Impacts on Human and Animal Health, *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. Belkin and Colwell (Eds.), Springer, New York, 2005.
- [LeP09] AFP, Ventes d'huîtres interdites à Arcachon: des ostréiculteurs contrôlés, *LePoint.fr*, 26/07/2009.
- [LeP10] AFP, Fin du test souris: ostréiculteurs et élus du Bassin d'Arcachon soulagés, *LePoint.fr*, 02/01/2010.
- [Loi04] M. Loir, *Guide des Diatomées*. Delachaux et Niestlé, Paris. 2004.
- [Mar06] C. Marcaillout-Le Baut, Les toxines de micro-algues marines, *Biofutur* 272, Décembre 2006.
- [Mau07] D. Maurer, I. Auby, A. Vignon, M.-P. Tournaire, M. Rumèbe, N. Neaud-Masson, C. Cantin, F. Salvo, H. Debort, R. Navarro, B. Simonnet, Reproduction de l'huître creuse dans le Bassin d'Arcachon – Année 2007, Direction Environnement Littoral, Laboratoire côtier d'Arcachon, Université Bordeaux 1, Direction Départementale des affaires Maritimes de la Gironde – Quartier d'Arcachon, Décembre 2007.
- [Off06] L'Officiel de la Conchyliculture, n°74, Octobre 2006.
- [Ols07] R.J. Olson, H.M. Sosik, A submersible imaging-in-flow instrument to analyse nano- and microplankton: Imaging FlowCytobot, *Limnology and Oceanography: Methods*, vol. 5, p.195-203, 2007.

[Per08] H. Peragallo & M. Peragallo, Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins. M.J. Tempère, Grez-sur-Loing. 1897-1908.

[Pui06] S. Puisseux-Dao, Phytoplancton et Phycotoxines: un problème de santé publique, La Lettre de l'ARET – septembre 2006.

[Qui98] M.A. Quilliam, K. Thomas, J.L.C. Wright, Analysis of Domoic Acid in Shellfish by Thin-layer Chromatography, Natural Toxins, vol. 6, p.147-152, 1998.

[Rep06] D. Montabord, V. Hossen, C. Belin, O. Cunin, J.P. Dréno, S. Krys, R. Le Goff, Z. Amzil, D. Le Gal, E. Nézan, B. Beliaeff, H. Grossel, S. Trotureau, F. Marco-Mirallès, S. Chantereau, P. Gentien, P. Lassus, C. Marcaillou, C. Compère, A. Chapelle, A. Grouhel, H. Oger-Jeanneret, T. Laugier, A. Daniel, F. Gohin, A. Huguet, A. Le Magueresse, Journée REPHY 2006 – Compilation des interventions, Nantes, 7-8 mars 2006.

[RRLA09] S. Becquey, B. Papion, La Recherche Littoral en Aquitaine: Un état des lieux, Réseau de Recherche Littoral Aquitain, Mars 2009.

[Rob05] L. Robigo, La nutrition de l'huître – Présentation de la fonction de nutrition de l'huître et du parcours des nutriments dans le tube digestif, [www.ostrea.org](http://www.ostrea.org), 14 février 2005.

[Saw07] P.M. Sawant, B.A. Weare, P.T. Holland, A.I. Selwood, K.L. King, C.M. Mikulski, G.J. Doucette, D.O. Mountfort, D.S. Kerr, Isodomoic acids A and C exhibit low KA receptor affinity and reduced *in vitro* potency relative to domoic acid in region CA1 of rat hippocampus, *Toxicon*, vol. 50, p.627-638, 2007.

[Sch00] C.A. Scholin, F. Gulland, G.J. Doucette, S. Benson, M. Busman, F.P. Chavez, J. Cordaro, R. DeLong, A. De Vogelaere, J. Harvey, M. Haulena, K. Lefebvre, T. Lipscomb, S. Loscutoff, L.J. Lowenstine, R. Marin III, P.E. Miller, W.A. McLellan, P.D.R. Moeller, C.L. Powell, T. Rowles, P. Silvagni, M. Silver, T. Spraker, V. Trainer, F.M.V. Dolah, Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom, *Nature*, vol. 403, p.80-84, 2000.

[Tub96] A. Tubaro, C. Florio, E. Luxich, S. Sosa, R. D. Loggia, T. Yasumoto, A Protein Phosphatase 2A Inhibition Assay For a Fast and Sensitive Assessment of Okadaic Acid Contamination in Mussels, *Toxicon*, vol. 34 (7), p.743-752, 1996.

[Yao07] I. Yao, H. Takagi, H. Ageta, T. Kahyo, S. Sato, K. Hatanaka, Y. Fukuda, T. Chiba, N. Morone, S. Yuasa, K. Inokuchi, T. Ohtsuka, G. R. MacGregor, K. Tanaka, M. Setou, Scrapper-dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release, *Cell* 130 p.943-957, 2007.





## Chapitre II – Du Phénomène Biologique au Signal Physique

<b>Introduction</b>	<b>42</b>
<b>Partie II.1 – Les Biocapteurs</b>	<b>42</b>
II.1.A) Introduction générale et intérêts des biocapteurs	42
II.1.B) Détection d'agents pathogènes	43
<b>Partie II.2 – Capteur à ondes acoustiques</b>	<b>44</b>
II.2.A) Origines des ondes acoustiques	45
II.2.B) Génération d'une onde acoustique	47
II.2.B.1. Le substrat piézoélectrique	47
II.2.B.2. Le transducteur interdigital (IDT)	48
II.2.B.3. La couche guidante	49
II.2.C) La ligne à retard et son conditionnement électronique	49
<b>Partie II.3 – Phénomènes détectés par les capteurs acoustiques</b>	<b>51</b>
II.3.A) Evénements à accentuer	51
II.3.A.1. Effet de masse	51
II.3.A.2. Transport des espèces et microfluidique	53
II.3.A.3. Formation de complexes biologiques antigène / anticorps	57
II.3.A.4. Continuité de l'énergie jusqu'à l'interface matériau / milieu	59
II.3.B) Perturbations extérieures	61
II.3.B.1. Densité et viscosité	61
II.3.B.2. Champs électromagnétiques	62
II.3.B.3. Autres perturbations	63
<b>Bilan</b>	<b>65</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>67</b>

## INTRODUCTION

Après une introduction des biocapteurs volontairement succincte dans la mesure où ce sujet est largement traité dans de nombreux ouvrages, nous présenterons plus en détails le principe du dispositif à ondes acoustiques et les mécanismes de transduction mis en jeu. Cela nous amènera notamment à analyser plus particulièrement l'impact de l'effet de masse, le transport des espèces et les conditions microfluidiques à prendre en compte pour les favoriser. Les éventuelles perturbations extérieures, influençant la réponse du capteur, seront également abordées.

## Partie II.1 – Les Biocapteurs

### *II.1.A) Introduction générale et intérêts des biocapteurs*

Les capteurs, et plus particulièrement les biocapteurs, représentent potentiellement le meilleur compromis entre sensibilité de détection et efforts de mise en œuvre. La détection, de type biologique, se fait via un récepteur, par exemple un anticorps permettant une accroche spécifique de la molécule cible. Cette accroche est alors transformée en un signal électrique interprétable à l'aide d'un transducteur. Le signal brut est ensuite traité et analysé pour en extraire l'information: accroche de l'analyte, quantité détectée, etc... (Fig. II-1).

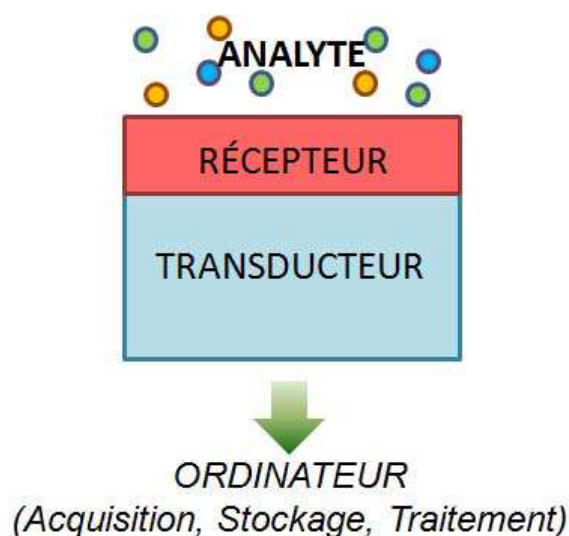


Fig. II-1: Schéma de principe d'un capteur générique.

La nature du transducteur définira le nom du capteur. Ils existent ainsi des capteurs ampérométriques ou potentiométriques (électrochimiques), et d'autres plus complexes utilisant des excitants photoniques, acoustiques ou encore magnétiques. Une classification courante retient les capteurs électrochimiques, piézoélectriques, optiques, mécaniques, et thermiques [Ivn99]. La partie "récepteur" du capteur a pour but d'immobiliser l'analyte qui doit être mesuré avec une certaine sélectivité. Si l'analyte en question n'est pas une particule physique (cellule, bactérie, molécule chimique) mais un phénomène physique, celui-ci stimulera le capteur directement au niveau du transducteur (capteur d'effort, photodiode).

### II.1.B) *Détection d'agents pathogènes*

Les biocapteurs ont suscité l'intérêt devant la demande grandissante de tests biologiques. La détection, qualitative et quantitative, d'agents pathogènes, microbiologiques ou viraux, a longtemps reposé sur des processus de cultures, de microscopies, de tests en plaques ou encore de PCR (Polymerase Chain Reaction). Ces méthodes longues et fastidieuses pouvaient durer jusqu'à une semaine sans fournir de résultats suffisants en termes de spécificité ou de sensibilité [Roc09].

La reconnaissance immunologique représente une méthode efficace et fondée sur un principe générique pour détecter spécifiquement les agents pathogènes [Iqb00]. La formation de complexes antigéniques peut être visualisée indirectement par luminescence lorsque la présence de nanoparticules empêche la fluorescence dans leur voisinage immédiat [Ach10]. La détection de microcystines, des peptides produits par les cyanobactéries, a été réalisée par SPR (Surface Plasmon Resonance). L'immobilisation des anticorps à la surface de la couche d'or se fait alors via une couche SAM (Self Assembled Monolayer) [Her10]. Un biocapteur, de type micro-poutre mise en résonance (mesure sous air), utilise une couche nutritive pour faire croître des bactéries *E. coli*. La mesure de cette croissance, par variation de masse, se fait à une sensibilité de  $\sim 50 \text{ pg.Hz}^{-1}$ , soit à une centaine de bactéries près en une heure de temps [Gfe04].

En 1987 fut fabriqué le premier biocapteur avec ondes élastiques de surface en milieu liquide, la composante de l'onde étant transverse horizontale [Mor87]. Les ondes de Love ont pour la première fois été utilisées à des fins de biodétection en 1992 grâce à leur sensibilité à l'effet de masse dans un milieu liquide [Kov92, Giz92]. En 2004, un biocapteur à ondes de Love en tantalate de lithium a permis la détection de la bactérie *Bacillus anthracis* [Bra04]. L'utilisation de puces microfluidiques en polymère conjointement aux biocapteurs à ondes acoustiques permet la réduction du temps de réponse ainsi que l'économie des produits d'analyses [Lan06].

L'ajout d'un circuit microfluidique, se généralisant, a par exemple été envisagé sur une micro-poutre pour la biodétection de cellules cancéreuses [Von10].

## Partie II.2 – Capteur à ondes acoustiques

Un capteur à ondes acoustiques remplace la partie "transducteur" du schéma de principe (Fig. II-1) par une ligne à retard à travers laquelle les ondes vont se propager. L'accrochage de l'analyte sur la partie "récepteur" ne provoque pas la génération des ondes

mais leur perturbation. Selon le type d'onde produit, leur sensibilité gravimétrique fait des capteurs à ondes acoustiques des candidats potentiels à la réalisation d'un biocapteur.

### II.2.A) Origines des ondes acoustiques

Les ondes acoustiques ont d'abord été observées lors de tremblements de terre. En effet, lorsqu'un séisme se déclenche, il engendre différents types d'ondes acoustiques avec des caractéristiques propres. Si la longueur d'onde  $\lambda$  de l'onde acoustique est très grande devant les distances interatomiques, le milieu apparaît alors comme continu [Die74]. Les plus rapides sont les ondes de volume (BAW, pour Bulk Acoustic Wave), entraînant de la matière avec elles. L'onde sismique de type P (primaire) est la première ressentie lors d'un tremblement de terre car la plus rapide (jusqu'à  $6000 \text{ m.s}^{-1}$ ). C'est une onde longitudinale; la compression de la matière se fait dans la direction de propagation de l'onde. Les ondes de type S (secondaire) sont des ondes transverses, cisailant le volume perpendiculairement à leur direction, et se déplaçant à vitesse plus faible, à environ  $3600 \text{ m.s}^{-1}$  dans la croûte terrestre [EOST11].

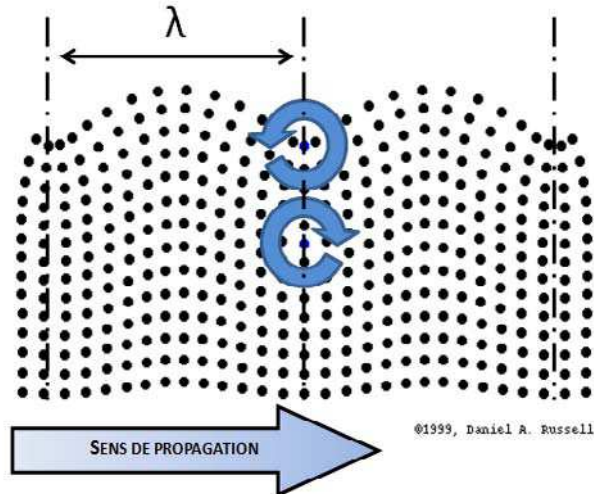


Fig. II-2: Représentation schématique du mouvement des particules dans un solide lors de la propagation d'une onde de Rayleigh dans celui-ci (vue en coupe dans le plan sagittal).

Ce sont les ondes acoustiques de surface, SAW, dont l'énergie est confinée à l'interaction matériau / milieu, qui sont le plus utilisées pour la réalisation d'un capteur. La première, découverte par John William Strutt Lord Rayleigh en 1885, est appelée "onde de Rayleigh". Elle est caractérisée par un mouvement local rétro-elliptique dans le plan sagittal,

localisé en surface sur une épaisseur de l'ordre de  $0,1 \lambda$ , comme représenté Fig. II-2 [Rus99]. L'intérêt de cette onde réside dans sa très grande sensibilité, liée au confinement de l'énergie à proximité de la surface de détection [Ben98].

Le second type d'onde le plus utilisé aujourd'hui dans l'élaboration d'un capteur à ondes acoustiques est une onde dite de Love en hommage à son découvreur Augustus Edward Hough Love en 1911 (Fig. II-3). Le principal intérêt de cette onde est sa contrainte de cisaillement transverse horizontal permettant son utilisation dans un milieu liquide. Pour la reproduire artificiellement, la présence d'une couche "guidante" en surface est nécessaire, confinant l'énergie, et procure une bonne sensibilité au capteur. Cette onde est encore appelée onde de surface transverse horizontale guidée (ou guided SH-SAW).

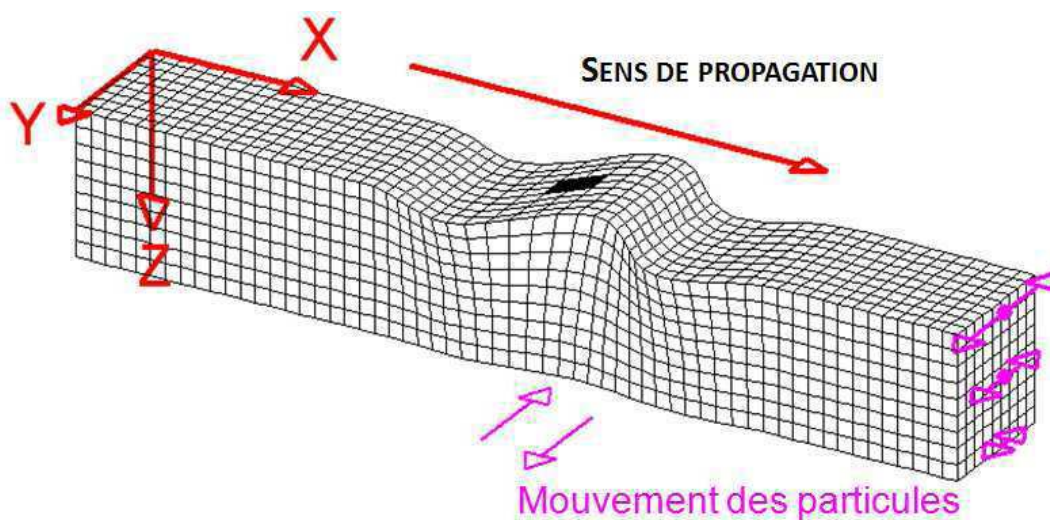


Fig. II-3: Schéma du mouvement des particules dans un solide lors du passage d'une onde de Love [Bra11].

Il existe d'autres types d'ondes acoustiques impliquant des contraintes transverses (STW, Shear Transverse Wave), des contraintes horizontales de surface comme l'onde de Bleustein-Gulyaev (SH-SAW, Shear Horizontal SAW), ou encore des ondes se propageant en mode de plaque (sur les deux faces opposées d'un substrat). Leur manque de robustesse et / ou leur sensibilité moindre ont rebuté leur utilisation [Zim02] même si les avancées en microtechnologie permettraient d'envisager, aujourd'hui, l'intérêt de certains modes de Lamb [Zho11].

## II.2.B) Génération d'une onde acoustique

Avant d'envisager la propagation d'ondes acoustiques comme moyen de détection, il faut tout d'abord être en mesure de la générer de manière reproductible avec un dispositif planaire utilisant, de préférence, les moyens de fabrication collectifs de la micro-électronique et compatible avec un dispositif "de surface". Selon l'application finale, la ligne à retard, telle qu'elle est parfois désignée, comportera plus ou moins d'éléments décrits ci-dessous.

### II.2.B.1. Le substrat piézoélectrique

Une onde acoustique correspond à un déplacement mécanique. La technologie étant basée sur l'électricité, la génération d'une onde acoustique met en jeu la propriété piézoélectrique de certains matériaux. Cette propriété n'apparaît que s'il existe un moment dipolaire électrique dans le matériau excité. De plus ce matériau doit posséder des propriétés élastiques suffisantes pour permettre la propagation de l'onde acoustique ainsi générée.

Les caractéristiques élastiques du matériau sont regroupées dans la matrice des rigidités, indiquant son comportement en déformation dans un espace tridimensionnel, les paramètres piézoélectriques sont résumés dans la matrice piézoélectrique. Ces deux matrices, complétées par le tenseur des permittivités et la densité du matériau, caractérisent complètement le matériau volumique, dans un repère cristallographique donné. Pour notre application, nous considérons une surface et une direction de propagation repérées par les angles d'Euler. Dans ce repère, le paramètre  $e_{33}$  de la matrice de piézoélectricité doit être non nul pour permettre la génération d'une onde par l'application d'un champ électrique parallèle à  $x_3$  [Die74]. La constante diélectrique  $\epsilon$  du substrat piézoélectrique (pour le quartz,  $\epsilon_r = \epsilon_r/\epsilon_{\text{vide}} = \sim 4$ ) nécessite une attention particulière pour les capteurs destinés à être utilisés en milieu liquide; une différence trop grande avec celle du liquide (pour l'eau,  $\epsilon_r = \sim 80$ ) peut provoquer des courts-circuits dans le champ électrique des IDTs (cf. III.2.A) [Rup08]. Il faudra donc prendre des précautions particulières pour protéger les IDTs et leur voisinage du fluide.

Les matériaux les plus utilisés remplissant ces critères sont le quartz, le niobate, le tantalate de lithium et récemment le langasite [Thi06]. Le cristal considéré est découpé pour



former des substrats (*wafer* en Anglais) selon un axe cristallographique permettant la future génération de l'onde telle qu'elle est souhaitée. Un matériau sera préféré à un autre en fonction du dispositif final: coefficient de couplage, stabilité en température, sensibilité.

L'étude des comportements de ces différents matériaux a été réalisée plusieurs fois par le passé, aussi bien au sein du laboratoire IMS-Bordeaux que dans des laboratoires extérieurs; ils ne seront pas abordés ici.

### II.2.B.2. Le transducteur interdigital (IDT)

La transformation de l'énergie électrique en énergie mécanique se fait par effet piézoélectrique inverse à l'aide d'un transducteur interdigital. Ce transducteur se présente sous la forme de deux électrodes en forme de peigne interdigité à la surface du substrat. La distance centre-à-centre entre deux doigts simples d'une même électrode  $p$  définira la longueur d'onde  $\lambda$  de l'onde acoustique qui sera générée (cf. Fig. III-1).

Pour certaines fréquences dites constructives, où les ondes générés par chaque paire de doigts se superposent en cohérence de phase, une onde se propage, à une certaine vitesse, dans ou en surface du matériau, en fonction de sa nature. Un autre IDT, généralement de même géométrie, est placé plus loin sur le chemin de propagation (faisceau acoustique), sur le substrat, dans l'alignement du premier. Ce dernier permet de retransformer l'énergie mécanique de l'onde transmise en énergie électrique par effet piézoélectrique direct. L'ensemble constitue ainsi un dispositif appelé "ligne à retard".

De nombreuses géométries d'IDT et de matériaux les composant (or, titane, aluminium) ont été envisagés afin d'augmenter les performances de transduction et de réduire les perturbations acoustiques. D'un point de vue réalisation, les IDTs sont déposés dans le cadre d'un projet du RTB (LAAS – CNRS, Toulouse), en utilisant les technologies de photolithographie de la microélectronique par évaporation de métal selon la technique du "lift-off" [Wol86].

### II.2.B.3. La couche guidante

Pour générer une onde de Love, une couche guidante, réalisée dans un matériau non nécessairement cristallin, doit être déposée sur le substrat et les IDTs. Cette couche guidante doit posséder des caractéristiques compatibles, d'une part, avec le substrat sélectionné, et d'autre part, avec la propagation d'une onde de Love. Ainsi, le matériau choisi répond à des critères d'élasticité, de densité et de continuité inter-matériau et suppose notamment une vitesse d'onde de volume transverse dans ce matériau inférieure à celle dans le substrat [Du96]. Après dépôt sur l'ensemble du substrat, sur une épaisseur typiquement de quelques microns, les contacts électriques sont dégagés par une étape de photolithographie suivie d'une étape de gravure.

Notons que de nouveaux matériaux font leur apparition: méso-poreux, sol-gel, à empreintes moléculaires. Leurs caractéristiques prometteuses sont étudiées, afin de considérer ces matériaux comme candidats potentiels, tant pour la couche guidante, que pour la couche sensible qui constituera le récepteur du dispositif de détection. Ils ne permettent pas, à ce jour, une utilisation dans notre projet de détection par ondes acoustiques.

### II.2.C) *La ligne à retard et son conditionnement électronique*

En théorie, lorsque l'IDT d'entrée est excité à la fréquence de synchronisme  $f_s$  de période  $T_s$ , les vibrations engendrées s'ajoutent constructivement faisant correspondre la longueur d'onde de l'onde acoustique  $\lambda$ , à la périodicité spatiale  $p$  définie par les IDTs. La fréquence de synchronisme apparaît alors comme:  $f_s = v_s / \lambda$ ,  $v_s$  étant la vitesse de propagation de l'onde acoustique [Roc09].

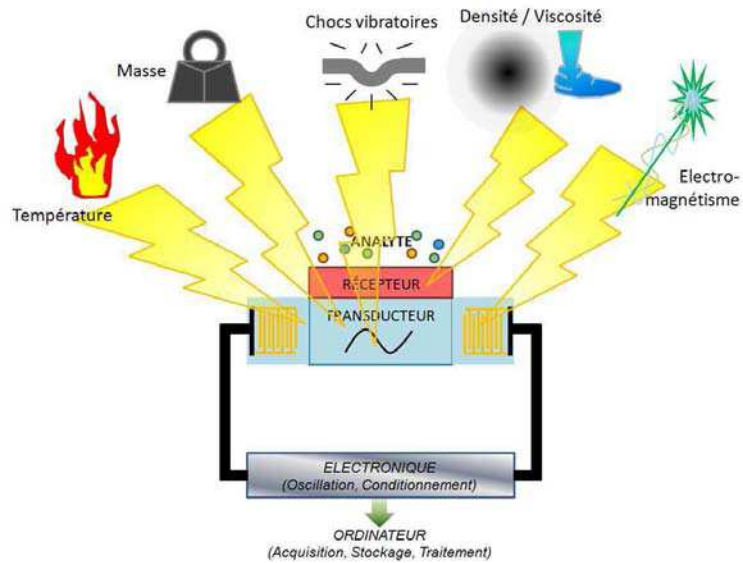


Fig. II-4: Schéma d'un capteur à ondes acoustiques et des principaux phénomènes pouvant influencer sa réponse.

L'utilisation d'une ligne à retard à ondes acoustiques en tant que capteur repose sur le principe de perturbation de cette onde. Cette perturbation peut être de natures différentes (Fig. II-4). Le moyen le plus efficace de la modifier est d'altérer son matériau de propagation. Les ondes de Love étant des ondes se propageant en surface, les capteurs seront plus sensibles aux phénomènes surfaciques. Un capteur à ondes acoustiques ne fournit pas de réponse absolue; elle est relative à l'état précédent du capteur. Elle correspond typiquement à une variation de vitesse de phase, induite par les perturbations. Dans notre cas, la réponse est traduite en une variation de fréquence par le montage de la ligne à retard dans une boucle de rétroaction, formant ainsi un oscillateur fonctionnant sur un point équiphase (Fig. II-5).

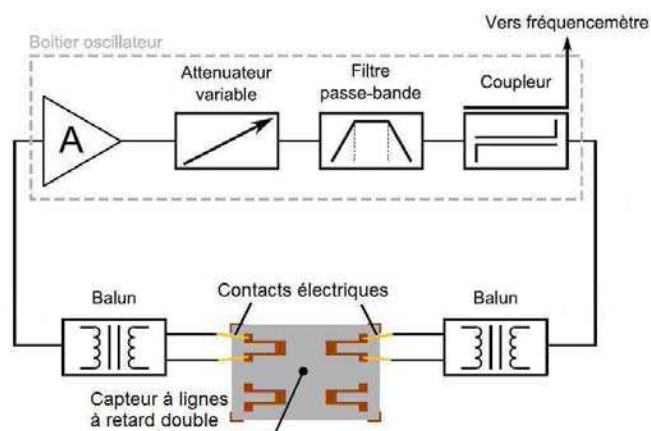


Fig. II-5: Synoptique de l'architecture de la boucle d'oscillation pilotée par la ligne à retard. Les dispositifs BALUN en entrée et sortie de chaque ligne à retard permettent un signal différentiel.

Cette boucle d'oscillation comporte notamment un module de filtrage et d'amplification. L'amplification doit être suffisante pour compenser les pertes d'insertion initiales et celles dues aux modifications de surface du capteur. Toutefois, elle ne doit pas saturer le signal électrique car cela engendrerait l'apparition d'harmoniques. Le signal de sortie étant une fréquence, des pics dans le spectre fréquentiel proches du fondamental pourraient alors perturber les détections. Aussi, le réglage du gain sera ajusté de sorte à assurer un gain de boucle légèrement positif en présence du milieu liquide de référence.

## Partie II.3 – Phénomènes détectés par les capteurs acoustiques

Une ligne à retard à ondes acoustiques possède donc une grande sensibilité envers plusieurs phénomènes physiques. Il devient alors important d'isoler certains d'entre eux pour privilégier ceux utiles en vue des prochaines expériences de détection.

### *II.3.A) Evénements à accentuer*

#### II.3.A.1. Effet de masse

Le phénomène à valoriser, et qui constitue la base de la détection par ondes acoustiques, est la sensibilité du capteur à l'effet de masse. La propagation de l'onde est perturbée proportionnellement à la masse (quantité) liée au capteur, par toute accroche supplémentaire à sa surface.

Cet événement est aussi le plus délicat à mesurer de par le faible poids des molécules à détecter, leur concentration réduite pour satisfaire aux seuils sanitaires, et le fait que seule la surface du capteur est mise en jeu, elle-même limitée à une zone entre les IDTs (faisceau acoustique).

L'équation suivante exprime la sensibilité à l'effet de masse ( $S_m^v$ ) d'un dispositif à ondes de Love relativement à la vitesse de phase de l'onde [Kov92]:

$$S_m^v = \frac{\Delta V}{V_0} \frac{A}{\Delta m} \quad (\text{Equ. II.1})$$

où  $\Delta V$  et  $V_0$  expriment, respectivement, la variation de vitesse de phase et la vitesse de phase avant perturbation (en  $\text{m.s}^{-1}$ ), et  $\Delta m$  la variation de masse (en kg) sur une surface  $A$  (en  $\text{m}^2$ ).

Cette sensibilité théorique (équation II.1) peut être évaluée pour des modèles multicouches, en renseignant les paramètres des matériaux les constituant, par résolutions analytiques (cas simplifié), numériques ou par algorithmes dans les cas les plus complexes. Il faut cependant prendre des précautions sur la validité qualitative du modèle simulé. En effet, si le système Quartz-SiO<sub>2</sub> est relativement bien connu, la couche biologique, la densité et la viscosité du fluide en surface, les propriétés aux interfaces (par exemple: rugosité, mouillabilité) et leur impact sur la sensibilité globale du capteur, sont plus difficiles à modéliser et souvent moins connus, et ce, d'autant plus aux fréquences de travail considérées.

De plus, dans notre cas, la couche biologique est liée à la surface de la ligne à retard par une inter-couche chimique de liaison, constituée d'une monocouche auto-assemblée (SAM) composée de (3-glycidylpropyl) triméthoxysilane (GPTS) [Tsu99].

Enfin, la sensibilité du capteur va également dépendre de la reproductibilité des différentes phases de sa réalisation; épaisseur et propriétés de la couche guidante, des fonctionnalisations de surface chimiques et biologiques, et propriétés aux différentes interfaces seront particulièrement importantes.

Néanmoins, une modélisation, même simplifiée, permettra d'estimer des tendances pour la mise au point d'un capteur. De plus, il sera important dans tous les cas de maximiser la variation de masse surfacique immobilisée, à laquelle est directement reliée la sensibilité globale. Pour cela, deux paramètres sont à considérer et sont abordés dans les deux parties suivantes: le transport des espèces vers la surface sensible et la formation du complexe antigène / anticorps dans notre cas de reconnaissance par immunologie.

### II.3.A.2. Transport des espèces et microfluidique

Notre projet vise à montrer la faisabilité d'une détection spécifique de très petites molécules. Trois difficultés seront alors à surmonter: assurer un convoyage efficace de ces molécules vers la zone sensible du capteur, réaliser une accroche spécifique, et faire en sorte qu'elle provoque une réponse de notre capteur.

La conception de la partie microfluidique de notre plateforme de détection permettra, dans un premier temps et en théorie, aux molécules d'intérêt d'atteindre aussi efficacement et complètement que possible la surface du capteur. L'accroche spécifique sera réalisée par des anticorps dirigés vers les molécules à détecter. Le capteur à ondes acoustiques de Love pourra alors transformer cette accroche en une réponse analysable par un ordinateur.

Des travaux antérieurs au sein de l'équipe MDA (IMS), réalisés par Nicolas MOLL, avaient montré la faisabilité d'une biodétection par capteurs à ondes acoustiques de Love. Le protocole de détection hydrostatique utilisé alors posait cependant quelques problèmes; les courbes de détection étaient interrompues lors des phases de nettoyage de la cavité de dépôt et les temps de saturation étaient très longs (plusieurs heures par étape), ne permettant pas de différencier, aux faibles concentrations, une courbe de réponse d'une dérive fréquentielle. Parallèlement aux travaux d'Hakim TARBAGUE [Tar11], nous avons choisi d'utiliser la microfluidique pour amener les espèces sur le biocapteur. En plus de remédier aux défauts précédemment cités, la microfluidique permettrait une réduction des quantités utiles des solutions biologiques, un meilleur contrôle de leur convoyage sur la surface sensible du capteur et la possibilité d'une détection en continu.

Avant de concevoir la partie microfluidique de la plateforme de détection, quelques notions s'imposent. Les bases de calcul pour connaître la quantité de matière accrochée sur un capteur surfacique ( $\Delta m_s$ ) par microfluidique ont été posées par Todd M. Squires, Robert J.

Messinger et Scott R. Manalis [Squ08]. Ils démontrent que la capacité d'un biocapteur à apporter les molécules cibles à sa surface est aussi importante que la réaction chimique les liant.

Leur système modélisé regroupe les paramètres du canal microfluidique et du flux le traversant (largeur, hauteur, vitesse du flux et débit), celle de la zone sensible (longueur, largeur, nombre de récepteurs par unité de surface), la concentration et la diffusion des molécules cibles, ainsi que les constantes de vitesse de réaction d'accrochage des molécules cibles sur leurs récepteurs et de leur séparation.

Leur modèle permet de prédire le comportement d'une zone de déplétion, où la concentration en molécules cibles baisse à mesure que l'on s'approche de la surface sensible. Ceci crée un gradient de concentration attirant d'autres molécules vers la surface. L'écoulement, stationnaire, influe sur cette zone de déplétion. Bien adapté, il permet d'assurer la collecte de molécules la plus rapide; les molécules ont le temps d'atteindre la surface et leur concentration en amont est optimale [Squ08]. Cette efficacité permet de provoquer une meilleure réponse du capteur par l'accroche de molécules en surface. Si cette accroche n'était pas assez franche, elle pourrait alors être confondue avec un phénomène de dérive de la fréquence de synchronisme.

Le comportement microfluidique du modèle est exprimé à l'aide d'un nombre de Péclet pour chaque molécule d'intérêt, faisant le rapport des forces de convections sur les forces de diffusion. Un premier,  $Pe_H$ , indique l'efficacité de collecte des molécules cibles à un débit donné et en considérant la largeur du canal microfluidique:

$$Pe_H = \frac{Q}{D_x W_c} \quad (\text{Equ. II.2})$$

où  $Q$  exprime le débit ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $D_x$  le coefficient de diffusion de la molécule  $x$  dans le solvant considéré ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ) et  $W_c$  la largeur du canal microfluidique (m). Le coefficient de diffusion  $D_x$ ,

propre à chaque molécule  $x$ , dépend de la viscosité du fluide et de la température comme le montre l'équation Einstein-Stokes:

$$D_x = \frac{k_b T}{6\pi \eta r_x} \quad (\text{Equ. II.3})$$

avec  $k_b$  la constante de Boltzmann ( $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  la température en degré Kelvin ( $^{\circ}\text{K}$ ),  $\eta$  la viscosité dynamique (en Pa.s) et  $r_x$  le rayon de la molécule  $x$  (en m). Cette relation n'est valable que dans les écoulements laminaires de Stokes, c'est-à-dire, pour un nombre de Reynolds, défini en suivant, inférieur à 1.

En effet, le nombre de Reynolds, pressenti par George Gabriel Stokes en 1851 et formalisé en 1883 par Osborne Reynolds, indique la nature d'un écoulement fluide en fonction de sa valeur. La formule pour le calculer est le rapport des forces inertielles par les forces visqueuses:

$$Re = \frac{\rho UL}{\eta} \quad (\text{Equ. II.4})$$

où  $\rho$  est la masse volumique du fluide considérée ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ),  $U$  la vitesse linéaire du fluide ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ),  $L$  la longueur de la dimension caractéristique (m) et  $\eta$  la viscosité dynamique du fluide (Pa.s). En considérant l'eau comme fluide ( $\rho = 1000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ ,  $\eta = 10^{-3} \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ), des longueurs caractéristiques et des vitesses classiques de quelques dizaines de microns et de quelques millimètres par secondes respectivement, les nombres de Reynolds généralement rencontrés sont inférieurs à - ou proches de - la valeur de 1, correspondant à un écoulement laminaire.

Le diagramme de phases permet de prédire si la collecte des molécules cibles sur la surface sensible sera totale ("Full collection") ou partielle (Fig. II-6). Il est obtenu en comparant le nombre de Péclet  $Pe_H$  et le rapport de la longueur de la surface sensible  $L$  (m) à la hauteur du canal microfluidique  $H$  (m) tel que:



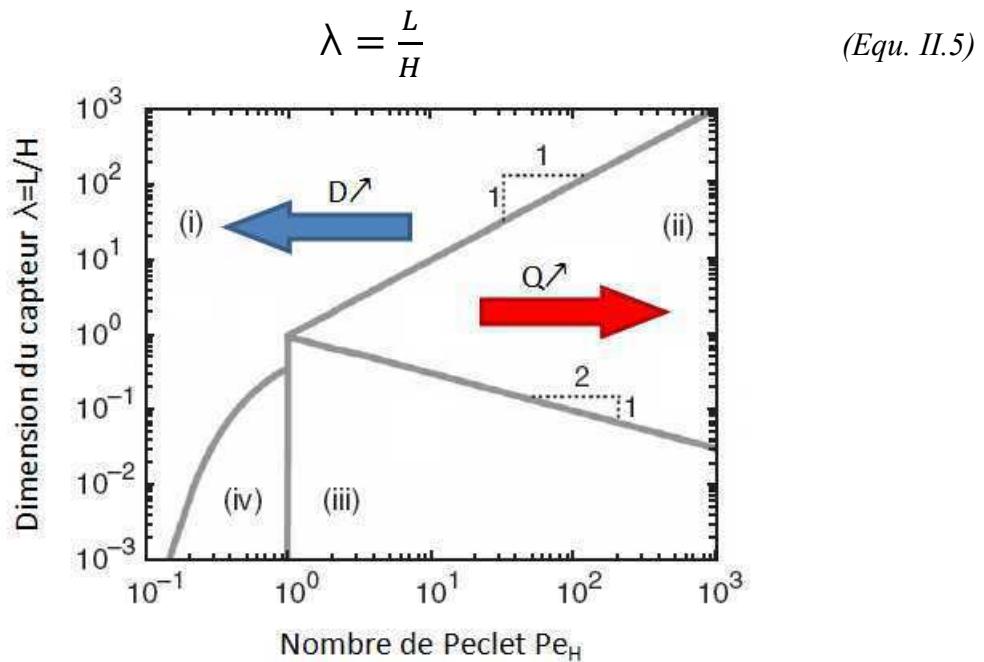


Fig. II-6: Diagramme des phases indiquant le comportement de molécules cibles par rapport à la surface d'accroche en fonction du flux microfluidique [Squ08]. Les zones d'intérêt sont les zones de collecte totale (i) et de collecte partielle (ii).

Les deux zones qui vont concerner ces travaux sont les zones (i) et (ii). Dans notre cas où  $L$  est très supérieur à  $H$  ( $\lambda$  est supérieur à 1), la limite de ces deux zones correspond à la droite d'équation  $Pe_H = \lambda$ .

Lorsqu'il y a collecte partielle (zone ii), un autre nombre de Péclet doit être calculé:

$$Pe_S = 6\lambda^2 Pe_H \quad (\text{Equ. II.6})$$

Ce nombre de Péclet,  $Pe_S$ , indique avec quelle efficacité la bande de déplétion située au-dessus de la surface du capteur sera renouvelée. La collecte des molécules cibles en surface du capteur sera d'autant plus importante que la zone de déplétion sera longue. Il faut alors  $Pe_S$  très supérieur à 1. Cette condition sera facilement validée dans notre cas où, comme mentionné plus haut, la surface sensible s'étale tout le long du canal microfluidique ( $L$ ) et où la hauteur du canal lui est largement inférieure.

Notre objectif, vis-à-vis de l'aspect faisabilité de notre projet, est donc de se situer dans la zone (i) ( $Pe_H < \lambda$ ) pour collecter un maximum de molécules d'intérêt. Il s'agira de faire un

compromis sur le débit, qui doit être assez élevé pour avoir un temps de détection réduit tout en permettant l'accroche des molécules d'intérêt à la surface du capteur et en évitant de les décrocher.

Une fois pris en compte le transport des espèces à la surface du capteur, la quantité de masse effectivement accrochée dépend du nombre et de la qualité de la formation de complexes antigéniques (dans le cas d'une immobilisation par affinité antigène / anticorps).

### II.3.A.3. Formation de complexes biologiques antigène / anticorps

La formation de complexe antigène / anticorps est le résultat d'une réaction biologique mettant en scène des interactions inter-molécules à plusieurs niveaux. En plus de satisfaire à une certaine affinité électrostatique entre moments multipolaires, qui plus est dans un milieu aqueux, la géométrie même du récepteur et de son ligand doivent correspondre telle la clef dans sa serrure, métaphore introduite par Emil Fisher, lauréat du prix Nobel de Chimie en 1902 [Cra95].

Le premier chapitre, "Principles of Biomolecular Recognition" (K. Kahn, K.W. Plaxco), de l'ouvrage "Recognition Receptors in Biosensors", édité par M. Zourob chez Springer, met en évidence l'aspect pluridimensionnel de l'accroche d'un analyte à son récepteur [Zou09]. Nous en reprenons ci-après les différents types d'interactions mis en jeu dans la formation des complexes biomoléculaires.

L'attraction de deux molécules entre elles est réalisée par effet électrostatique. En fonction de la distance qui les sépare, tel ou tel phénomène sera prépondérant. L'interaction électrostatique du premier ordre par les charges permanentes et opposées de deux molécules permet l'attraction naturelle à la plus grande distance, si on néglige l'apport d'énergie extérieure (génération de champs magnétiques ou électriques, turbulences). Cette interaction

vaut surtout pour les atomes (ions). De leur accroche résulte une molécule avec, dans la plupart des cas, une neutralité électrique.

Ces molécules neutres peuvent cependant créer une attraction à l'aide de l'énergie électrostatique du second ordre mettant en œuvre la polarisation des charges au sein de la molécule. Ici aussi, l'interaction sera plus ou moins forte selon la complexité de la molécule et de son moment polaire (mono-, bi-, voire quadripolaire). En effet, la force d'attraction est dépendante de l'orientation de ces molécules vis-à-vis l'une de l'autre et peut être affaiblie par la présence de moments polaires supplémentaires dans la molécule.

La dispersion de London, formulée par le physicien Fritz Wolfgang London, considère l'attraction inter-atome selon sa polarisation instantanée au niveau même de son cortège d'électrons à un instant donné. A l'opposé, la répulsion stérique des nuages d'électrons ou principe d'exclusion de Pauli empêche deux électrons ayant le même spin d'occuper un même espace. Ces dernières interactions sont extrêmement faibles et ont pour rôle de finaliser l'approche des deux molécules.

La formation de complexes antigéniques, qui seront utilisés dans nos travaux, met en œuvre tous ces mécanismes de rapprochement. Une fois l'antigène accroché à l'anticorps, un lien fort les unit, résultat d'une multiplicité de liaisons faibles à l'échelle atomique. Ce lien n'a cependant pas la robustesse d'une liaison covalente et le complexe peut être dissocié en appliquant une force au moins supérieure à celle du lien. Il apparaît alors une constante d'équilibre en fonction des constantes d'association  $k_{ON}$ , et de dissociation  $k_{OFF}$ . Ainsi, le rapport entre ces deux constantes aura une influence importante sur l'immobilisation d'espèces cibles en surface du capteur, à la fois en termes de cinétique et d'amplitude, en régime stationnaire.

De plus, la variation des phénomènes physiques (température, pression, champ électrique) peut également influencer ces interactions, les favorisant ou les empêchant. Si le fluide, liquide ou gazeux, véhiculant les molécules est dynamique, d'autres forces rentrent en jeu. Ainsi, les conditions extérieures seront à considérer et devront être favorables à la formation de complexes antigéniques.

---

#### II.3.A.4. Continuité de l'énergie jusqu'à l'interface matériau / milieu

Un autre aspect important dans la réalisation d'un capteur composé de plusieurs couches est la notion de continuité de l'énergie. Le modèle de base classiquement utilisé est composé de deux couches, rigidement liées entre elles; le substrat et la couche guidante (II.3.A.1).

Dans le cas du biocapteur, il faut prendre en compte comment l'énergie acoustique est transmise à la surface depuis le substrat en traversant donc, la couche guidante, la couche chimique de liaison et la couche des anticorps. La sensibilité va ainsi dépendre de la continuité des couches qui le composent, de leur constitution, et de la cohérence du réseau atomique de chaque couche, en volume et aux interfaces. Par exemple, l'organisation cristallographique du réseau du quartz permet une propagation de l'onde acoustique à une vitesse plus élevée que dans la couche guidante, pourtant de même composition atomique.

Au cours des travaux de thèse de Duy Hai DINH, les rugosités des couches guidantes en SiO<sub>2</sub> et des couches SAM, après fonctionnalisation sur capteur, ont été mesurées par microscope à force atomique (AFM). La rugosité de la couche superficielle des capteurs étant sensiblement la même avant et après greffage du GPTS (~5 nm RMS), et l'épaisseur de la couche chimique de liaison ne dépassant pas les 0,8 nm, il a été conclu que cette dernière était discontinue [Din07]. Cela signifie que la réponse du capteur aux perturbations en surface, dues à l'apport de masse, pourra être différente de celle attendue à partir du modèle idéalisé.

Ensuite, le greffage des anticorps sur la couche de liaison se fait par réaction entre le groupe d'oxyde d'éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O, fonction époxy) du GPTS et un groupe amine (NH<sub>2</sub>) de l'anticorps (Fig. II-7). Cette liaison est covalente; l'anticorps fait alors partie de la couche sensible au même titre qu'un atome fait partie d'une molécule.

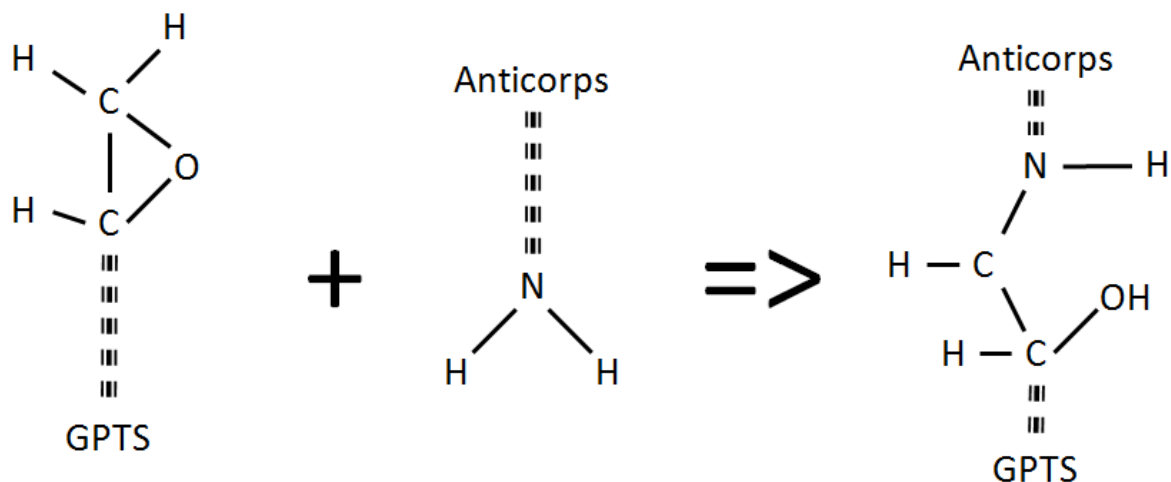


Fig. II-7: Schéma de la réaction chimique entre le groupe d'oxyde d'éthylène du GPTS et un groupe amine d'un anticorps.

Cependant, ce groupe amine est présent sur tous les acides aminés qui composent les anticorps et les protéines en général. Il est donc fort probable que les anticorps ne se lient pas à la couche chimique de manière orientée, mais plutôt en divers points de l'anticorps et étendus sur la surface (Fig. II-8) [Tar11]. La taille d'une immunoglobuline de type G (IgG) est comparable à la rugosité moyenne de la surface du capteur fonctionnalisé (Ra) [Din07].

La combinaison de ces deux considérations induit que l'accès à un certain nombre de sites de reconnaissance antigénique (paratopes) pourrait être masqué, diminuant le nombre de sites disponibles et potentiellement la réponse du capteur.

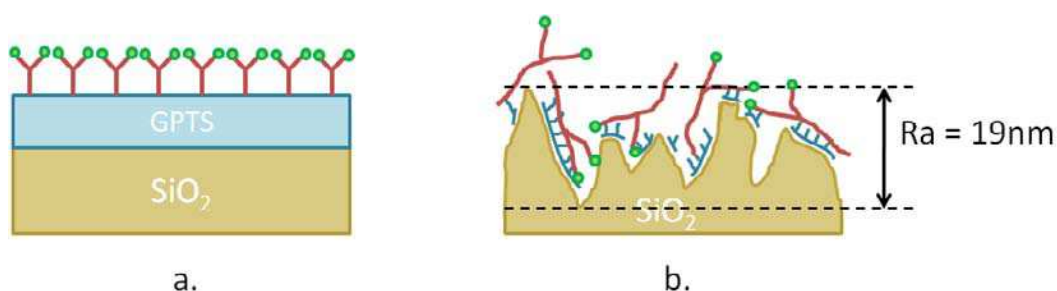


Fig. II-8: Représentations schématiques de la couche sensible du biocapteur. a. modèle idéalisé, b. représentation plus réaliste.

Les anticorps (IgG, 20nm [Che00]) sont en rouge avec leurs sites de reconnaissance (paratopes) en vert.

L'interprétation des résultats de biodétection se retrouve ainsi compromise par la variabilité de greffage de la couche sensible, conjuguée à celle du dépôt de la couche guidante

(cf. II.3.A.1). Aussi, nous serons amenés à proposer une normalisation des résultats afin de faciliter la comparaison inter-expériences (cf. chapitre IV).

### II.3.B) *Perturbations extérieures*

Comme nous l'avons vu dans la partie des propriétés et caractéristiques des capteurs à ondes acoustiques (II.2.C), on parle de détection lorsqu'il y a une variation de fréquence. Cette variation étant relative, elle ne sera détectée que lorsque le phénomène à mesurer varie avec la plus grande amplitude. Un environnement stable, où la fréquence de synchronisme du système ne change pas, permettra la détection de plus petite variation. Pour cela, il faut s'affranchir de chaque élément perturbateur, soit en empêchant son interaction avec le capteur, soit en s'assurant que ses paramètres varient faiblement au cours d'une expérience de détection, soit encore, à défaut, en mesurant le paramètre correspondant de sorte à le compenser *a posteriori*.

#### II.3.B.1. Densité et viscosité

Une partie des études sur les capteurs à ondes acoustiques visent à caractériser des fluides plus ou moins complexes, gazeux ou liquides, en termes de densité et de viscosité [Rai10]. En effet, les ondes acoustiques comme les ondes de Love permettent une meilleure sensibilité aux phénomènes de surface, mais présentent toutefois une sensibilité au milieu environnant, dès l'instant où une partie de l'énergie est susceptible de s'y propager.

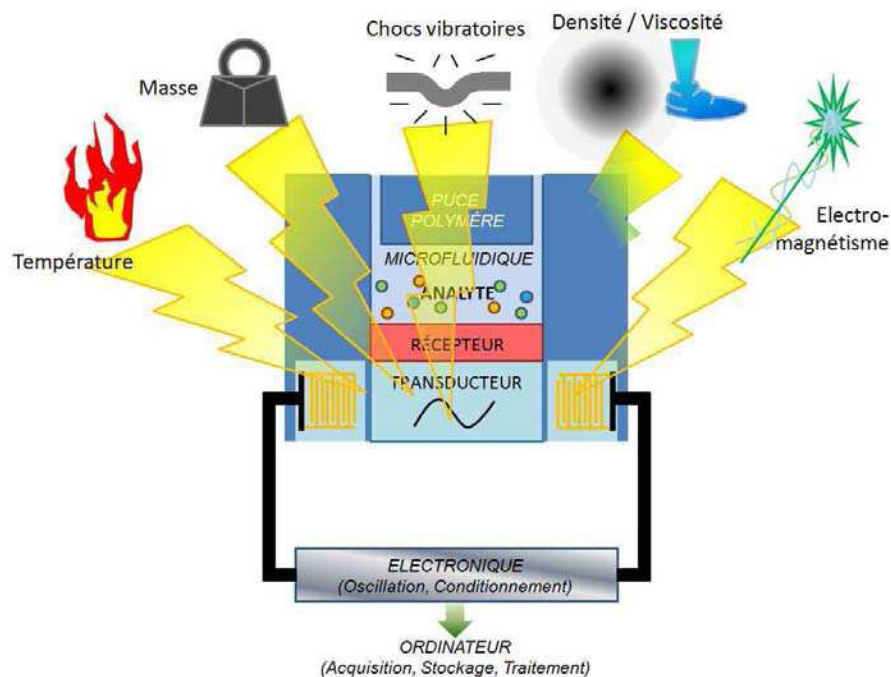


Fig. II-9: Schéma d'un capteur à ondes acoustiques équipé d'une puce polymère. La partie microfluidique permet un meilleur contrôle des perturbations dues aux variations de densité et de viscosité du fluide porteur (référence).

Afin de limiter les variations de fréquences par changement de densité ou de viscosité, il a été retenu de présenter de manière continue et tout le long de l'expérience un même fluide par lequel transiteront les espèces et molécules à détecter. Ce contrôle du fluide sera réalisé à l'aide d'une puce microfluidique adaptée (Fig. II-9).

### II.3.B.2. Champs électromagnétiques

Les champs électromagnétiques environnants peuvent également perturber la détection par ondes acoustiques directement au niveau des IDTs. En effet, leur structure est très proche de celle des antennes hautes fréquences et sont donc capables de recevoir des ondes électromagnétiques autour de fréquences dont la longueur d'onde est compatible avec la périodicité spatiale des doigts.

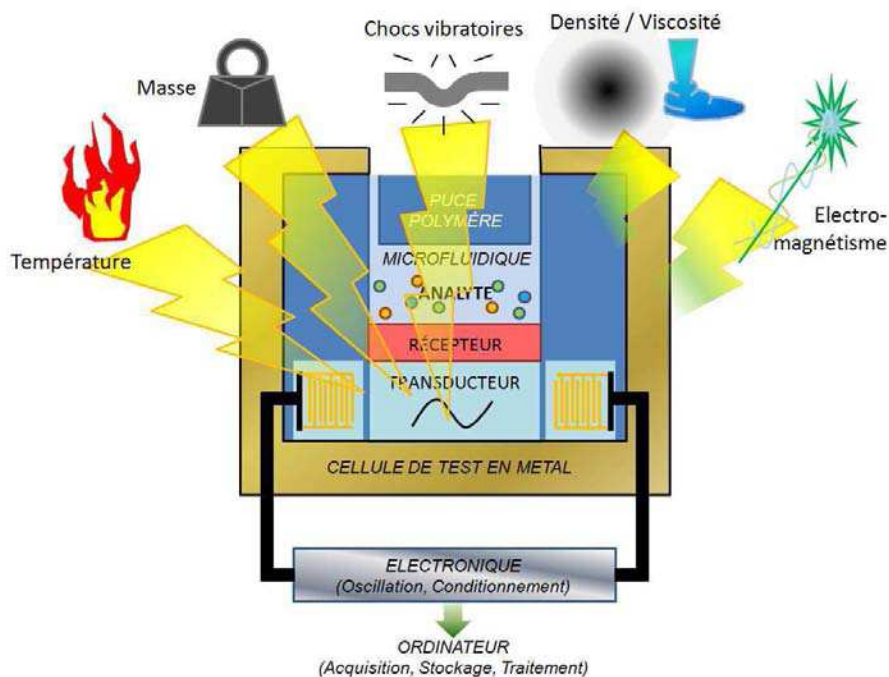


Fig. II-10: Schéma d'un capteur à ondes acoustiques équipé d'une puce microfluidique et d'une protection électromagnétique. L'ensemble constitue la cellule de test.

Pour protéger le capteur à ondes acoustiques de ce phénomène, un blindage métallique l'entoure (Fig. II-10). Cette protection assure également l'assemblage (réversible) de la puce microfluidique avec le capteur, et maintient les connecteurs électriques à ressort, permettant leur contact sur le capteur. Le tout ainsi réalisé constitue la cellule de test.

### II.3.B.3. Autres perturbations

Bien évidemment, toutes ces protections ne sont pas parfaites. Des emplacements sont nécessaires pour faire passer les tubes d'arrivées et de sorties, voire une fenêtre de visualisation de la puce microfluidique. Des câbles électriques relient le dispositif à l'électronique de conditionnement, elle-même reliée à l'électronique d'acquisition des signaux en fréquences. L'ensemble de ces éléments peuvent constituer des sources potentielles de parasites, par effet électromagnétique ou encore mécanique, un "choc vibratoire" étant



susceptible de perturber également l'onde acoustique elle-même. Notamment, les matériaux composant la ligne à retard à ondes acoustiques sont sensibles aux écarts de température.

Cette sensibilité peut être corrigée à l'aide d'une référence par mesure en différentiel. Cependant, dans notre cas, il est important de stabiliser la température à la surface du capteur, d'autant plus qu'elle a un impact direct sur certains paramètres comme la conformation des anticorps et la diffusion des molécules [Zou09], et donc sur le potentiel de reconnaissance antigénique du capteur. C'est un bain de sable thermostaté qui maintiendra le dispositif de détection à température constante.

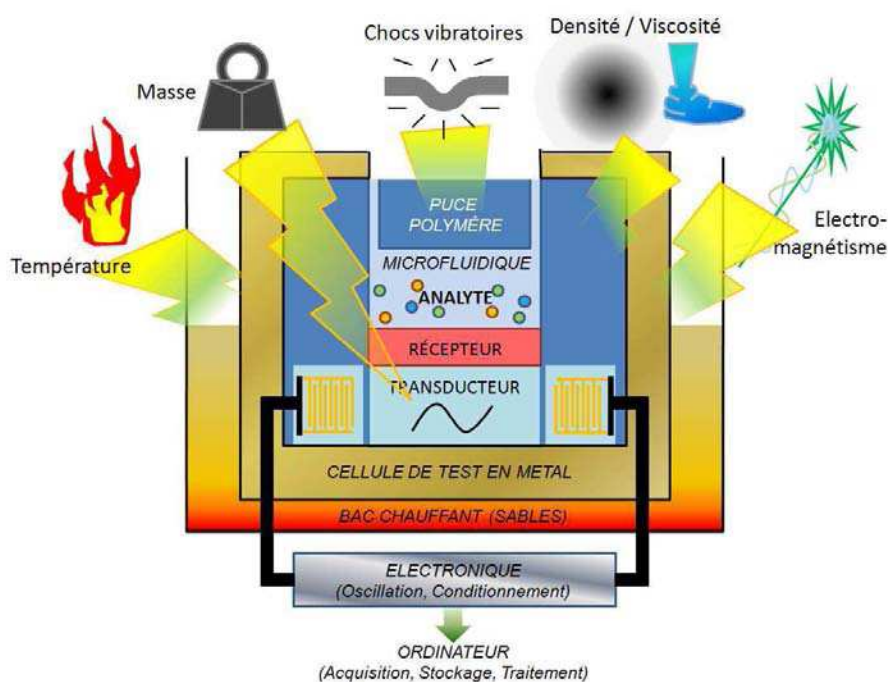


Fig. II-11: Schéma de la cellule de test complète. Les perturbations extérieures sont limitées, de sorte à privilégier l'effet de masse lors de la détection.

## BILAN

La détection d'espèces biologiques en milieu liquide à l'aide d'un capteur à ondes acoustiques regroupe plusieurs domaines scientifiques. Le comportement d'une ligne à retard fait appel à la science de l'acoustique, de la piézoélectricité et de l'électronique. L'ajout d'une couche sensible composée d'anticorps et greffée en surface implique des connaissances en biologie, chimie et biochimie. La présence d'un milieu liquide contrôlé nécessite une approche microfluidique qui doit être prise en compte dans l'étude de l'accroche dynamique des molécules en surface du capteur.

Chacun de ces domaines a été étudié, décrit, analysé, compris et partagé par les nombreux scientifiques qui les ont explorés durant plusieurs années. Prises séparément, ces découvertes ont déjà donné lieu à de nombreuses applications, aussi bien pour les expériences en laboratoire que pour l'industrie. Néanmoins, la combinaison et l'interfaçage de ces domaines scientifiques au sein d'un dispositif unique, fait apparaître des relations complexes non anticipées jusqu'alors. De plus, cette complexité s'accroît exponentiellement à mesure qu'un domaine est ajouté au système. Cette complexité n'empêche pas un système de fonctionner, même s'il n'est pas optimisé, mais peut s'avérer être un frein pour la compréhension du ou des nouveaux phénomènes résultants.

Ce deuxième chapitre a donc permis de décrire les capteurs à ondes acoustiques et de montrer l'intérêt de leur utilisation pour la biodétection. Leurs qualités en termes de sensibilité, rapidité, coût par expérience, possibilité d'automatisation, permettent en effet de les considérer pour répondre aux exigences posées par la problématique conchylicole exposée dans le premier chapitre. Une fois ce choix établi, les paramètres propres de ce type de capteur, en application à notre projet, ont alors été rapportés. En effet, la détection des phycotoxines se fera en milieu liquide, dans lequel elles évoluent naturellement, et étant compatible avec l'utilisation d'anticorps. Ce moyen de réception doit permettre une reconnaissance spécifique d'un type de phycotoxines. Les ondes acoustiques, constituant la partie "transducteur" du schéma de principe d'un capteur générique (Fig. II-1), doivent être en mesure d'atteindre une profondeur de pénétration à proximité de la surface de l'ordre de la

dizaine de microns, en y présentant une sensibilité maximum. Ceci est possible avec les ondes de Love dont l'énergie est confinée près de la surface, avec une composante transverse horizontale.

Afin d'exprimer uniquement les variations dues à l'immobilisation d'espèces en surface, les autres phénomènes influant sur la détection doivent être contrôlés. Les écarts de température, le bruit électromagnétique environnant, les vibrations, ainsi que les variations de densité et de viscosité même du fluide, seront réduits à un minimum. La cellule de test qui répond à ces conditions possèdera également une partie microfluidique, offrant à son tour ses avantages au système final.

Bien que tous les paramètres déterminant la réponse du biocapteur n'aient pu être étudiés et optimisés, la conception de la plateforme de détection a été abordée, dans son ensemble, en considérant les différents domaines mis en jeu: mécaniques, électronique, fluide, biologique... Aussi, ce chapitre nous a permis de proposer une introduction théorique aux applications numériques qui seront développées dans la suite. Les points critiques pour la conception de la plateforme ont également été mis en relief, ainsi que les paramètres à prendre en compte pour l'exploitation des résultats.

## BIBLIOGRAPHIE

- [Ach10] D.E. Achatz, R. Ali, O.S. Wolfbeis, Luminescent Chemical Sensing, Biosensing, and Screening Using Upconverting Nanoparticles, Topics in Current Chemistry, vol. 300, p. 29-50, 2010.
- [Aul90] B.A. Auld Acoustic fields and waves in solids, vol. 2, 2ième édition, Robert E. Krieger, Publishing Company, 1990.
- [Ben98] E. Benes, M. Groschl, F. Seifert, A. Pohl, Comparison between BAW and SAW sensor principles, Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on, vol. 45 (5), p. 1314-1330, 1998.
- [Bra04] D.W. Branch, S.M. Brozik, Low-level detection of a *Bacillus Anthracis* simulant using Love-Wave biosensors on 36°YX LiTaO<sub>3</sub>, Biosensors and Bioelectronics, vol. 19, p. 849-859, 2004.
- [Bra11] L. Braile, Love Wave Animation – Seismic Wave Demonstrations and Animations, Purdue University, <http://web.ics.purdue.edu/~braile/edumod/waves/WaveDemo.htm>, mars 2011.
- [Che00] C.L. Cheung, J.H. Hafner, C.M. Lieber, Carbon nanotube atomic force microscopy tips: Direct growth by chemical vapor deposition and application to high-resolution imaging, PNAS, vol. 97 (8), p.3809-3813, 2000.
- [Cra95] F. Cramer, Biochemical correctness: Emil Fischer's lock and key hypothesis, a hundred years after – an essay, Pharmaceutica Acta Helvetiae, vol. 69 (4), p.193–203, 1995.
- [Die74] E. Dieulesaint, D. Royer, Ondes élastiques dans les solides – Application au traitement du signal, éd: Masson et Cie, 1974.

- [Din07] D.H. Dinh, Nouvelles couches monomoléculaires auto-assemblées greffées possédant des fonctions glycidyles: applications aux immunocapteurs à ondes de Love, Thèse n°: 3467, Université Bordeaux 1, 2007.
- [Du96] J. Du, G.L. Harding, J.A. Ogilvy, P.R. Dencher, M. Lake, A study of Love-wave acoustic sensors. *Sensors and Actuators: A*, vol. 56, p. 211–219, 1996.
- [EOST11] V. Ansel, A. Cahier, J.-L. Van de Velde, J. Rey, N. Cuenot, T. Preveraud, A. C. Peter, Documents Pédagogiques de l'E.O.S.T., Ecole et Observatoire des Sciences de la Terre de Strasbourg, <http://eost.u-strasbg.fr/pedago/>, 2011.
- [Gfe04] K.Y. Gfeller, N. Nugaeva, M. Hegner, Rapid Biosensor for detection of Antibiotic-Selective Growth of *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71 (5), p. 2626-2631, 2004
- [Giz92] E. Gizeli, N.J. Goddard, C.R. Lowe, A Love plate biosensor utilising a polymer layer, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 6 (1-3), p. 131-137, 1992.
- [Her10] S. Herranz, M. Bockova, M.D. Marazuela, J. Homola, M.C. Moreno-Bondi, An SPR biosensor for the detection microcystines in drinking water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, p. 2625-2634, 2010.
- [Iqb00] S.S. Iqbal, M.W. Mayo, J.G. Bruno, B.V. Bronk, C.A. Batt, J.P. Chambers, A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 15 (11-12), p. 549-578, 2000.
- [Ivn99] D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins, Biosensors for detection of pathogenic bacteria, *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 14, p. 599-624, 1999.
- [Kov92] G. Kovacs, G.W. Lubking, M.J. Vellekoop, A. Venema, Love waves for (bio)-chemical sensing in liquids, *IEEE Ultrasonics Symposium Proceedings*, p. 281-285, 1992.

- [Lan06] K. Länge, G. Blaess, A. Voigt, R. Gotzen, M. Rapp, Integration of a surface acoustic wave biosensor in a microfluidic polymer chip, *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, p. 227-285, 2006.
- [Mol07] N. Moll, Etude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love: application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries, Thèse n° d'ordre: 3385, Université de Bordeaux 1, 2007.
- [Mor87] T. Moriizumi, Y. Unno, S. Shiokawa, New sensor in liquid using leaky SAW, *IEEE Ultrasonics Symposium*, vol. 121, p. 579-582, 1987.
- [Rai10] V. Raimbault, D. Rebière, C. Dejous, M. Guirardel, J. Pistré, J.L. Lachaud, High frequency microrheological measurements of PDMS fluids using saw microfluidic system, *Sensors and Actuators B.*, vol. 144, p.467-471, 2010.
- [Roc09] M.-I. Rocha-Gaso, C. March-Iborra, A. Montoya-Baides, A. Arnau-Vives, Surface Generated Acoustic Wave Biosensors for Detection of Pathogens: A Review, *Sensors* 9, p.5740-5769, 2009.
- [Rup08] S. Rupp, M. von Schickfus, S. Hunklinger, H. Eipel, A. Priebe, D. Enders, A. Pucci, A shear horizontal surface acoustic wave sensor for the detection of antigen-antibody reactions for medical diagnosis, *Sensors and Actuators B: chemical*, vol. 134 (1), p. 225-229, 2008.
- [Rus99] D.A. Russel, Rayleigh surface waves – Longitudinal and Transverse Wave Motion, *Acoustics Animations*, Kettering University Applied Physics, <http://paws.kettering.edu/~drussell/Demos/waves/wavemotion.html>, mars 2011.
- [Squ08] T.M. Squires, R.J. Messinger, S.R. Manalis, Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors, *Nature Biotechnology*, vol. 26 (4), avril 2008.

[Tar11] H. Tarbague, Etude et mise au point d'une plateforme de biodétection rapide de micro-organismes couplant immunocapteur à ondes de Love et dispositifs PDMS microfluidiques, Thèse n°: 4290, Université Bordeaux 1, 2011.

[Thi06] J.A. Thiele, M. Pereira da Cunha, High temperature LGS SAW gas sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 113 (2), p. 816-822, 2006.

[Tor09] G. Tortissier, Etude et développement d'une plateforme de détection chimique à ondes acoustiques de surface pour environnement sévère haute température, Thèse n°: 3859, Université Bordeaux 1, 2009.

[Tsu99] V. Tsukruk, I. Luzinov, D. Julthongpiput, Sticky Molecular Surfaces: Epoxysilane Self-Assembled Monolayers, *Langmuir*, vol. 15, p. 3029–3032, 1999.

[Von10] M.G. Von Mulhen, N.D. Brault, S.M. Knudsen, S. Jiang, S.R. Manalis, Label-Free Biomarker Sensing in Undiluted serum with Suspended Microchannel resonators, *Analytical Chemistry*, vol. 82, p. 1905-1910, 2010.

[Wol86] S. Wolf, R.N. Tauber, "Silicon Processing for the VLSI Era", vol. 1, 1986.

[Zim02] C. Zimmermann, Conception, réalisation et étude de micro-capteurs à ondes de Love pour applications en milieux gazeux. Cas de la détection de composés organophosphorés, Thèse n°: 2471, Université Bordeaux 1, 2002.

[Zho11] L. Zhou, M. Xuan, Y. Wu, J.-F. Manceau, F. Bastien, Multi-parameters decoupling method with Lamb wave sensor for improving the selectivity of label-free liquid detection, 2011 16th International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, TRANSDUCERS'11 2011, Article number 5969148, p.104-107, 2011.

[Zou09] M. Zourob (editor), *Recognition Receptors in Biosensors*, Springer, May 2009.

## **Chapitre III – Conception et développement de la plateforme à ondes acoustiques**

<b>Introduction .....</b>	<b>72</b>
<b>Partie III.1 – Géométrie des lignes à retard à ondes de Love .....</b>	<b>72</b>
<b>Partie III.2 – Développement de la puce microfluidique.....</b>	<b>74</b>
III.2.A) Architecture de la puce.....	74
III.2.B) Calcul d'écrasement, d'écoulement et de comportement fluide.....	76
III.2.B.1. Simulation de déformation par déplacement imposé .....	77
III.2.B.2. Simulation d'écoulement microfluidique.....	80
III.2.B.3. Calcul des nombres de la microfluidique de notre plateforme de détection.....	83
III.2.C) Fabrication de la puce microfluidique: moule et polymère.....	87
<b>Partie III.3 – Caractérisation et performances des capteurs à ondes de Love .....</b>	<b>88</b>
III.3.A) Pertes d'insertion et phase des capteurs à ondes de Love.....	88
III.3.B) Influence d'un milieu liquide .....	94
III.3.C) Comportement avec des fluides complexes (PEG) .....	95
<b>Partie III.4 – Banc de test microfluidique et fonctionnalisation du capteur .....</b>	<b>97</b>
III.4.A) Greffage des anticorps biorécepteurs .....	97
III.4.A.1. Protocole de greffage .....	97
III.4.A.2. Quantification et distribution des anticorps .....	97
III.4.B) Instrumentation .....	100
III.4.B.1. Banc de test .....	100
III.4.B.2. Protocole général de manipulation .....	101
<b>Bilan .....</b>	<b>103</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>104</b>



## INTRODUCTION

Ce chapitre fait directement suite au chapitre II qui décrivait les principaux éléments de la plateforme de détection. Il vise à présenter l'utilisation de ces bases théoriques pour concevoir une plateforme à ondes acoustiques dédiée à notre objectif de détection rapide de très petites molécules présentes en faible concentration en milieu liquide salin.

Nous aborderons ainsi l'architecture des lignes à retard à ondes de Love et celle de la puce microfluidique développée dans le cadre de cette étude. Une troisième partie sera consacrée à la caractérisation électrique des dispositifs à ondes de Love. La dernière partie décrit le banc de test ainsi que les étapes de validation préliminaires avant les expériences de détection qui seront exposées dans le chapitre IV.

### Partie III.1 – Géométrie des lignes à retard à ondes de Love

Comme nous l'avons vu au chapitre II, les dispositifs à ondes de Love sont adaptés pour une utilisation en milieu liquide grâce à leur polarisation transverse horizontale. Ils offrent une sensibilité importante aux variations de surface par le guidage de l'énergie dans leur couche guidante, d'épaisseur contrôlée. Cette couche guidante assure de plus une protection partielle des électrodes.

La ligne à retard à onde de Love développée lors de précédents travaux [Raz05] est composée d'un substrat piézoélectrique en quartz coupe AT (angles d'Euler:  $0^\circ$ ;  $121,5^\circ$ ;  $90^\circ$ ), de transducteurs interdigitaux (IDTs) servant de ports d'entrées et de sorties pour la génération et la réception de l'onde, d'une couche guidante en  $\text{SiO}_2$ , auxquels s'ajoute une couche immuno-sensible.

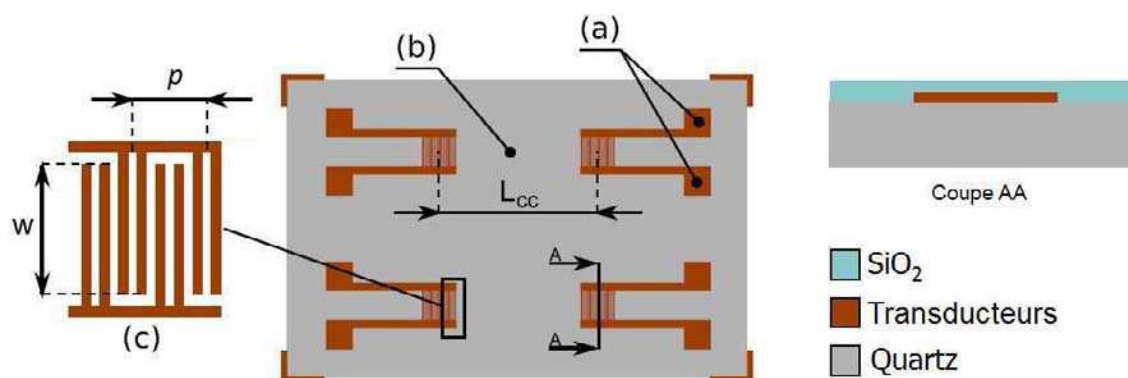


Fig. III-1: Géométrie d'une double ligne à retard à ondes de Love. (a) Plots d'entrées et / ou de sorties électriques des électrodes des IDTs. (b) Chemin de propagation acoustique (faisceau acoustique), distance centre-à-centre ( $L_{cc}$ ): 8,4mm. (c) Espace inter-doigts des IDTs  $p$ : 40 $\mu$ m. Recouvrement des doigts  $w$ : 1,6mm. [Raz05].

Les IDTs sont constitués de 44 paires de doubles doigts de 5  $\mu$ m espacés de 5  $\mu$ m comme représenté sur la figure Fig. III-1 ( $p = 8 \times 5 \mu$ m). Ils sont composés d'or et de titane (couche d'accroche), totalisant une épaisseur aux alentours de 200 nm, déposés par technique lift-off sur la surface polie du substrat piézoélectrique de quartz. Ce substrat est orienté pour une propagation perpendiculaire à l'axe cristallographique X générant ainsi des ondes pures avec une polarisation transverse horizontale.

La couche guidante de SiO<sub>2</sub>, d'environ 4  $\mu$ m, est déposée par technique PECVD<sup>1</sup>. La fréquence de synchronisme de la plateforme à ondes de Love est de l'ordre de 117 MHz. Une fois placée dans une configuration oscillateur, la stabilité à court terme est meilleure que 1 Hz.s<sup>-1</sup> dans des conditions statiques.

<sup>1</sup> PECVD: Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition.

## Partie III.2 – Développement de la puce microfluidique

Pour améliorer le contrôle des quantités et des concentrations des espèces cibles tout en facilitant l'automatisation, la microfluidique s'impose d'elle-même. De plus, pour permettre le nettoyage complet et la régénération de la ligne à retard après expérience, il est nécessaire que la puce microfluidique ne soit pas collée au capteur. Le but est donc de réaliser une cavité microfluidique au-dessus de la zone sensible du capteur qui puisse être démontable.

### III.2.A) *Architecture de la puce*

L'élaboration de la puce microfluidique se base sur l'architecture précédemment réalisée par Vincent Raimbault dans le cadre d'une collaboration avec le LOF (Rhodia, CNRS UMR 5258) [Rai10]. Ses travaux concernaient la caractérisation de fluides complexes et à haute viscosité ( $> 1$  Pa.s). Pour cette application, trois caractéristiques principales avaient été proposées:

- Entraînant de fortes pertes d'insertion, le passage de liquide, via les accès en haut et en bas, sur le chemin acoustique avait été réduit au maximum (2 mm) (Fig. III-2).
- La puce, réalisée par réticulation d'un polymère absorbant acoustique, le PolyDiMéthylSiloxane (PDMS), permet d'éliminer le bruit acoustique provoqué par les réflexions aux bords du capteur (jusqu'à trois échos).
- Enfin, les cavités d'air, situées au-dessus des IDTs, évitent l'absorption, par le PDMS, de l'onde générée. Les "murs", séparant le canal microfluidique de ces cavités, mesurent seulement 80  $\mu$ m chacun, provoquant seulement une faible atténuation du signal (-2 dB maximum). Cette séparation permet d'éviter la présence de liquide ionisé (eau de mer, solution tampon) au-dessus des IDTs, qui provoquait des perturbations électromagnétiques des signaux en affectant les champs électriques à cet endroit (cf. II.2.B.1).

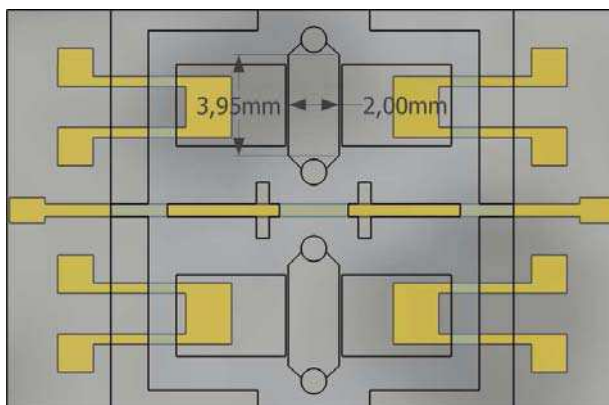


Fig. III-2: Schéma représentant l'ancienne architecture des motifs microfluidiques par rapport à un capteur à double ligne.

Dans le cadre de nos travaux, les deux derniers points devaient être conservés. Par contre, pour améliorer la zone sensible de la détection et les expériences se déroulant sous flux continu d'une solution tampon ionisée à faible viscosité ( $\sim 1$  mPa.s), les dimensions du canal microfluidique ont été augmentées de sorte à recouvrir au maximum le chemin de propagation acoustique situé entre les deux IDTs (Fig. III-3).

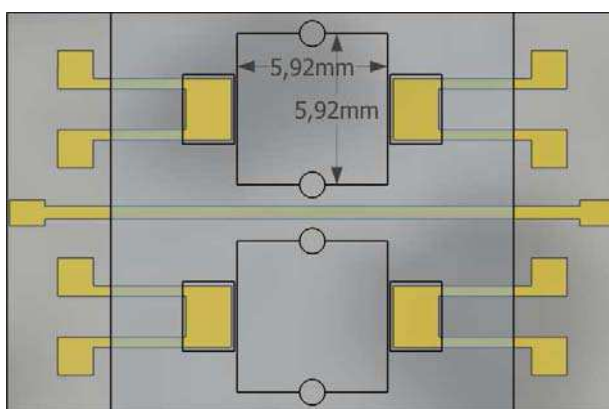


Fig. III-3: Schéma d'un motif microfluidique intermédiaire: motif épuré et canal agrandi.

Toutefois, cette géométrie de motifs (Fig. III-2) était utilisée pour des puces qui étaient collées de manière définitive sur le capteur. Nos travaux visant une nouvelle puce microfluidique posée et maintenue par pression, les forces exercées par appui de la puce, sur les murs inter-cavités ainsi que sur le plafond de la chambre microfluidique, doivent être réduites au maximum. Pour cela, les lignes et les angles ont été arrondis (Fig. III-4).

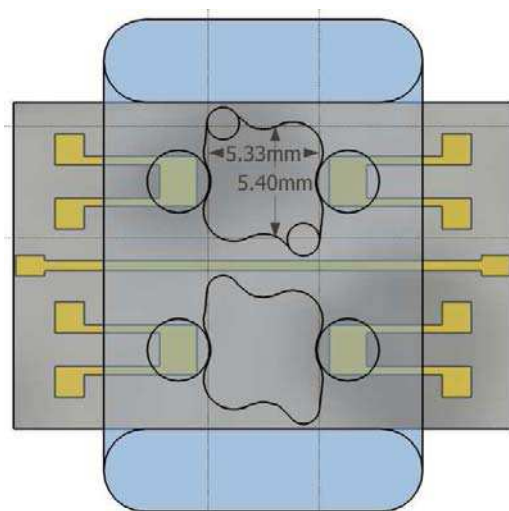


Fig. III-4: Schéma de la géométrie finale.

De plus, pour homogénéiser l'écoulement, la forme de la chambre microfluidique a été modifiée. Les accès fluidiques pour les tubulures se retrouvant alors très près du bord du capteur, un épaulement de chaque côté a été ajouté pour maintenir l'étanchéité.

### III.2.B) *Calcul d'écrasement, d'écoulement et de comportement fluide*

Cette sous-partie présente des résultats de simulations destinés à justifier la géométrie retenue (Fig. III-4).

Ces simulations ont été effectuées sous l'environnement du logiciel multi-physique COMSOL. Il permet de calculer, avec des modèles 2D ou 3D, des phénomènes multi-physiques complexes. Ces nombreuses possibilités, augmentant à chaque nouvelle version du logiciel, n'ont pas pu être totalement explorées dans le cadre de ces travaux. Seuls l'écrasement de la puce et l'écoulement microfluidique ont été simulés avec ce logiciel, en vue de valider le nouveau design des motifs microfluidiques. Les possibilités offertes par COMSOL permettraient une modélisation complète de la plateforme, incluant, en plus, les domaines de l'acoustique, de la thermique ou encore de la piézoélectricité.

La complexité du modèle, ainsi que son temps de résolution, s'accroît à mesure qu'un domaine physique y est ajouté (cf. Bilan du Chapitre II). Les simulations ont donc été segmentées par domaine pour cette raison.

Ainsi, une première série de simulations vise à vérifier l'avantage d'un motif de chambre microfluidique aux angles arrondis, face à la déformation mécanique de la puce entière, par appui à sa surface supérieure comme pour son maintien dans la cellule de test. La contrainte appliquée y est plus grande qu'elle ne le sera réellement lors des expériences; il s'agira surtout de faire la comparaison avec le motif intermédiaire (Fig. III-3). La puce microfluidique est alors modélisée dans sa totalité.

La deuxième série de simulations nous permet contrôler la bonne circulation d'un liquide au sein de cette chambre microfluidique et d'estimer les débits à appliquer lors des expériences de détection. Pour ces simulations, seule la chambre microfluidique est modélisée, allégeant ainsi le calcul, en termes de temps et de ressources mémoire. La déformation de la puce par appui, d'après les résultats des simulations précédentes, n'a pas été prise en compte.

### III.2.B.1. Simulation de déformation par déplacement imposé

Comme il apparaît sur la Fig. III-4, les lignes et les angles du motif microfluidique ont été arrondis afin de diminuer les contraintes sur les bords et de réduire le fléchissement du plafond. En effet, la puce ne sera pas collée au capteur comme auparavant, mais posée et maintenue par pression.

La hauteur de la chambre microfluidique, entre la surface du capteur et le plafond du canal, a été arbitrairement fixée à 100  $\mu\text{m}$  (cf. III.2.B.2). Le PDMS étant élastique (module de Young,  $E = 0,5 \text{ MPa}$ ), une déformation trop grande au sommet de la puce risque d'écraser complètement la chambre microfluidique, atténuant fortement le signal, et risquant de

provoquer des fuites de liquide par sa déformation à proximité du capteur. D'un autre côté, s'il n'y a pas assez de pression mécanique sur la puce, la pression engendrée par le passage continu de fluide dans la chambre pourrait provoquer un décollement de la puce de PDMS, provoquant également des fuites. Si ces fuites de liquide sont situées au niveau des murs inter-cavités, elles conduiraient à une dégradation immédiate du signal. Pour minimiser l'impact de la contrainte de déformation sur l'intégrité de la chambre, la hauteur de la puce de PDMS a été arbitrairement fixée à 10 mm.

Cette série de simulations a utilisé le mode d'application "Solide, Contraintes-Déformations" du "Module Mécanique des Structures" pour évaluer l'impact de la déformation par contrainte imposée.

Une image 2D du motif est importée dans le logiciel (fichier DXF). Elle a été générée par le module d'exportation 2D du logiciel Google Sketchup Pro, permettant la réalisation relativement aisée des formes complexes, et sert de base au modèle 3D. Pour cette simulation, il faut modéliser la forme de la puce en entier. Une fois extrudé, un maillage de la forme doit être effectué. Ce maillage permet au logiciel de déterminer quels points (coordonnées spatiales) seront utilisés par le solveur (programme inclus dans COMSOL) pour résoudre les équations du système selon les conditions aux limites du modèle et les propriétés des sous-domaines définies par l'utilisateur.

Dans ce cas de déformation de la puce microfluidique par contrainte imposée, la surface supposée en contact avec le capteur (non représenté) est définie comme encastree. La surface sur laquelle appuie le capot de la cellule de test subit alors une translation imposée de 0,1 mm vers sa face opposée et perpendiculairement (direction  $-R_z$ ).

Ici, les propriétés du sous-domaine sont celles du PDMS. Seule une partie des caractéristiques du polymère est nécessaire pour le calcul de contrainte. Le tableau III-1 ci-

dessous regroupe l'ensemble des paramètres, avec en vert ceux utilisés. Ces propriétés peuvent varier selon la base utilisée, elles permettent néanmoins d'estimer le comportement du matériau.

Caractéristiques	Valeur	Unité
Module de Young (E)	0,75 x10 <sup>6</sup> [Arm99]	Pa
Masse volumique (rho)	920 [Arm99]	kg.m <sup>-3</sup>
Coefficient d'expansion linéaire	325 [Dow08]	µm.m <sup>-1</sup> .°C <sup>-1</sup>
Coefficient de Poisson	0,5 [Arm99]	-
Test de dureté, shore A (adapté aux polymères, pénétrateur en acier, cône de 35°, tronqué)	48 [Dow08]	-
Conductivité thermique	0,16 [Dow08]	W.m <sup>-1</sup> .°K <sup>-1</sup>
	3,8 x10 <sup>-4</sup> [Dow08]	cal/cm.sec.°C

Tab. III-1: Propriétés du PDMS (série Sylgard de Dow Corning [Dow08]) réticulé avec un rapport base / réticulant de 10:1.

Une fois tous ces paramètres rentrés dans le modèle (maillage, conditions aux limites, caractéristiques du sous-domaine) de façon à faire converger le solveur choisi, le logiciel affiche la tendance avec une représentation graphique 3D dont les unités et domaines de calcul sont paramétrables par l'utilisateur *a posteriori* (post-traitement). Ainsi, ce mode d'application peut représenter à la fois la déformation du solide (en mètre), la pression (en Pascal), ou en d'autres grandeurs du système considéré (déformation / contrainte). Cette simulation a été effectuée pour deux motifs (Fig. III-3 et Fig. III-4): un rectiligne avec une chambre microfluidique agrandie et un autre arrondi avec une surface microfluidique équivalente (Fig. III-5a et c).



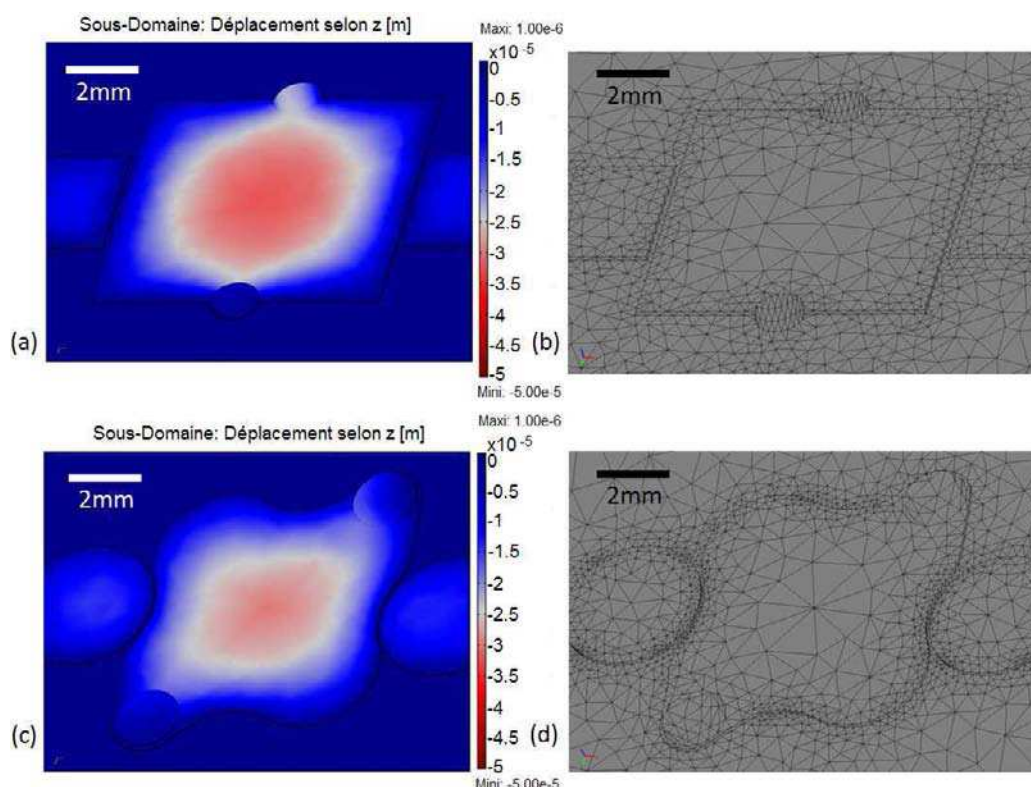


Fig. III-5: Représentation graphique de la tendance de la simulation COMSOL d'un écrasement sur deux types puces PDMS, la chambre microfluidique étant remplie de vide, avec leur maillage en vue de dessous.

- (a) géométrie de motifs rectilignes. (b) image du maillage au niveau du motif (56584 mailles au total)  
 (c) nouvelle géométrie de motifs microfluidiques. (d) maillage du nouveau motif (42113 mailles au total).

Sur la première figure, la zone de déformation rouge (déplacement supérieur à  $30 \mu\text{m}$ ) est plus importante que sur la seconde. La nouvelle géométrie, avec des formes arrondies, permettra donc un appui plus fort sur la puce microfluidique pour assurer une bonne étanchéité sans déformer l'intégrité de la chambre microfluidique.

### III.2.B.2. Simulation d'écoulement microfluidique

Comme dit précédemment, les simulations d'écoulements nous permettent de vérifier l'homogénéité du flux dans la chambre microfluidique. Elles nous fournissent également une évaluation des principales caractéristiques de l'écoulement au niveau de la zone centrale de la chambre microfluidique, localisée au-dessus du faisceau acoustique.

La conception du nouveau motif microfluidique permet d'obtenir un flux laminaire favorisant une distribution homogène des espèces, avec un nombre de Reynolds autour de 1 (cf. II.3.A.2). La chambre microfluidique est donc délimitée par le motif microfluidique de la puce de PDMS (murs et plafond) et par la surface du capteur. La surface résultante est de  $31,3 \text{ mm}^2$ , calculée par le logiciel Google Sketchup. Avec une hauteur fixée à  $100 \text{ }\mu\text{m}$ , la chambre microfluidique a un volume de  $3,13 \text{ mm}^3$  ou  $3,1 \text{ }\mu\text{l}$ .

De la même manière que pour la simulation d'écrasement, le motif microfluidique a été reconstitué en 3D à partir de l'importation du fichier image 2D (cf. Fig. III-6b) Et la simulation a été réalisée en utilisant le mode d'application "Ecoulement Laminaire Général" du module MEMS. Les passages d'accès à la chambre microfluidique ne sont pas modélisés sur le motif économisant ainsi du temps et de l'espace mémoire, mais l'écoulement dans le passage d'entrée est pris en compte par le logiciel comme étant un cylindre de longueur paramétrable.

Le sous-domaine correspond au fluide qui traversera la chambre microfluidique. Pour les besoins de la simulation, ce sont les caractéristiques de l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) qui ont été utilisées (masse volumique:  $1000 \text{ kg/m}^3$ ; viscosité dynamique:  $1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ). Ces paramètres représentent une première approximation par rapport à ceux des solutions utilisées dans nos expériences: la solution tampon, avec ou sans l'ajout des différentes espèces. Cette simulation permet ainsi de fournir une approximation des phénomènes mis en jeu et de juger d'une tendance avec un ordre de grandeur.

Les conditions aux limites du modèle sont définies par le débit d'entrée sur l'une des surfaces représentant l'accès d'entrée du fluide, et par la différence de pression en sortie sur la surface de l'accès opposé. La difficulté dans la simulation de ce modèle se situe au niveau du maillage; l'ordre de grandeur de la hauteur de la micro-chambre est 100 fois moindre que celui de la géométrie (Fig. III-6b), qui est elle-même difficile à mailler à cause de ses formes arrondies.

La figure suivante (Fig. III-6a) représente les champs des vitesses du liquide à l'intérieur de la chambre microfluidique.

Des expériences ont permis de vérifier les tendances obtenues par les simulations, en particulier au niveau des lignes de courants (trajets et vitesses associées) (Fig. III-6c).

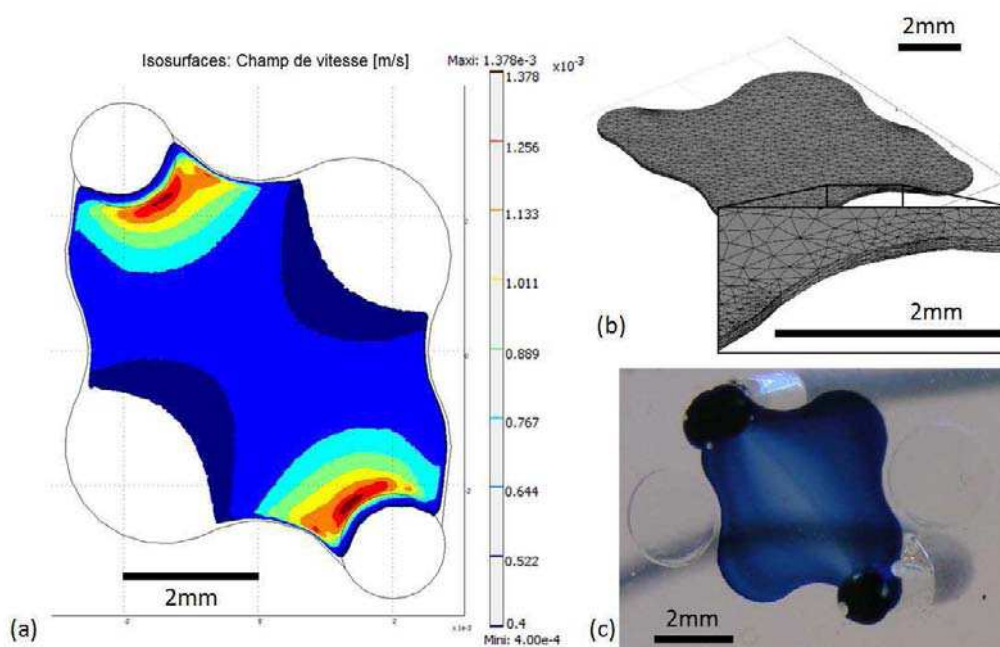


Fig. III-6: (a) Tendances de la simulation d'écoulement dans la chambre microfluidique: champs des vitesses. (b) maillage de la chambre en 3D (26769 mailles au total). (c) Lavage à l'eau claire d'une cavité pré-remplie d'une eau colorée bleu.

L'écoulement microfluidique à différents débits a été simulé, de  $1 \mu\text{l}/\text{min}$  à  $100 \mu\text{l}/\text{min}$ . Pour l'ensemble des débits, les lignes de courants sont continues, sans turbulence et le comportement de l'écoulement reste similaire, avec des vitesses de courants plus faibles à l'extérieur que sur le trajet direct ou à l'entrée et la sortie de la chambre. A un débit de  $10 \mu\text{l}/\text{min}$ , la vitesse au centre de la chambre est estimée à  $0,5 \text{ mm}/\text{s}$  avec un nombre de Reynolds correspondant de 0,2.

Les expériences (Fig. III-6c) nous ont permis d'évaluer le renouvellement de la quasi-totalité de la chambre en huit secondes environ, en appliquant un débit de  $100 \mu\text{l}/\text{min}$ . Même à ce haut débit, le nombre de Reynolds reste inférieur à 2; l'écoulement est donc bien laminaire.

### III.2.B.3. Calcul des nombres de la microfluidique de notre plateforme de détection

Le bon déroulement des futures expériences de détection dépend aussi du taux de collecte, et donc du bon convoyage, de l'ensemble des espèces cibles présentes dans le volume de la solution vers la surface du capteur. Cet acheminement peut être prédit à l'aide des nombres de la microfluidique décrits au chapitre précédent (II.3.A.2).

Le tableau III-2 ci-après regroupe les valeurs des nombres de la microfluidique pour trois molécules qui seront utilisées lors des expériences de détection: l'anticorps (immunoglobuline de type G), l'acide okadaïque et l'acide domoïque. Ces valeurs sont calculées en considérant des conditions expérimentales typiques: débit de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , température de 37°C, densité et viscosité du liquide de référence égales à celle de l'eau pure.

	Anticorps	Acide Okadaïque	Acide Domoïque
Demi-longueur ( $r_x$ , m)	$10 \times 10^{-9}$ [Che00]	$3,4 \times 10^{-9}$ *	$1,6 \times 10^{-9}$ *
Poids moléculaire ( $\text{Da}^2$ )	$140 \times 10^3$	$\sim 800$ *	$\sim 300$ *
Coefficient de diffusion ( $D_x$ , $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )	$3,3 \times 10^{-11}$	$9,7 \times 10^{-11}$	$2,05 \times 10^{-10}$
$Pe_H$	$\sim 1289$	$\sim 436$	$\sim 207$
$Pe_S$	$\sim 36 \times 10^6$	$\sim 12 \times 10^6$	$\sim 6 \times 10^6$

Tab. III-2: Valeurs obtenues avec:  $k_b = 1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ,  $T = 310,15 \text{ K}$  (37°C),  $\eta = 0,692 \text{ mPa} \cdot \text{s}$  (eau à 37°C),  $Q = 1,66 \times 10^{-10} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$  (10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) et  $Wc = 3,92 \text{ mm}$ . Les valeurs annotées d'un \* ont été calculées à partir de la formule chimique de la molécule en question (rayon atomique, longueur liaison covalente, poids atomique).

<sup>2</sup> Da: Dalton, 1 Da =  $1,67 \cdot 10^{-24} \text{ g}$ .

Dans ce tableau, le coefficient de diffusion est calculé pour chaque molécule à partir de l'équation Einstein-Stokes (équation II-3). La température et la viscosité étant relativement stables, ce coefficient dépendra surtout de la longueur de la molécule. Bien que les molécules ne soient pas sphériques, nous considérons pour rayon  $r_x$  la moitié de leur longueur. Cette équation (équation II.3) est valable car le nombre de Reynolds reste faible pour les débits inférieurs à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

De même, la valeur  $W_c$  retenue comme largeur du canal équivalent correspond à un intermédiaire entre la largeur du trajet "direct" d'un accès à l'autre et la largeur maximale au centre de la chambre (Fig. III-7). La vitesse de courant dans la zone centrale, délimitée par l'intersection entre ce canal et le faisceau acoustique, est relativement homogène (autour de 0,5 mm/s pour un débit de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ).

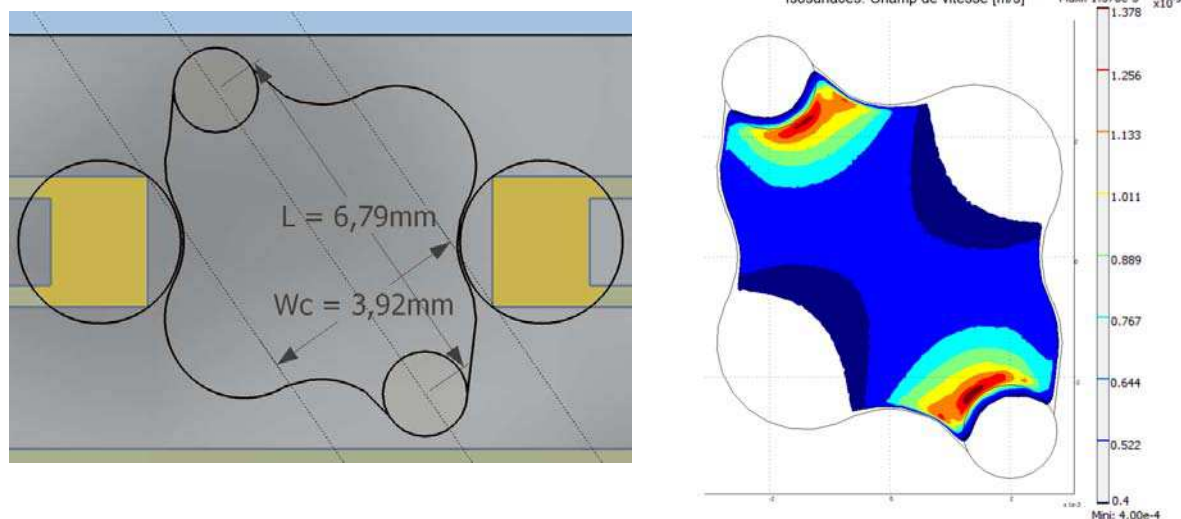


Fig. III-7: Largeur du canal  $W_c$  prise en compte pour le calcul du nombre de Peclet  $Pe_H$ .

Comme la conception de notre plateforme s'inscrit dans une démarche de faisabilité, il nous faut nous placer dans les meilleures conditions théoriques possibles. Nous cherchons donc à avoir une collecte totale (zone (i) de la figure II-6) dans un maximum de cas de figures, pour le plus d'espèces, tout en ayant un temps d'expérience acceptable, c'est-à-dire, un débit suffisamment rapide.

La figure Fig. III-8 peut nous aider à déterminer le meilleur compromis de hauteur de canal microfluidique de sorte à avoir une bonne collecte des molécules cibles. En abscisse est représenté le débit, seul paramètre qui pourra varier au cours des expériences, et en ordonnée, les nombres de Péclet  $Pe_H$  pour les trois molécules d'intérêts, tracées selon la formule donnée par l'équation II.2 et les valeurs du tableau III-3.

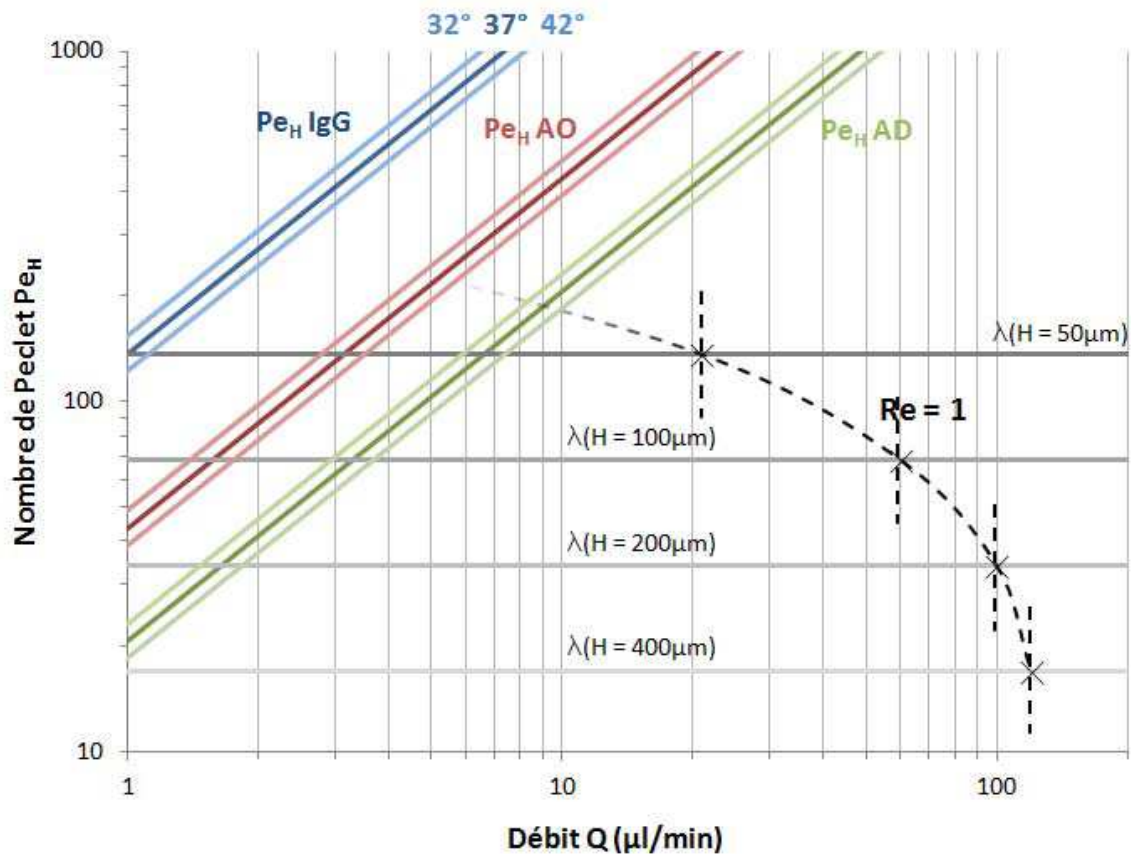


Fig. III-8: Graphique caractéristique de notre capteur surfacique regroupant les nombres de la microfluidique ( $L = 6,79$  mm).

La collecte totale d'une molécule sera théoriquement assurée si, à une hauteur donnée, le débit est suffisamment faible pour que le nombre de Péclet associé à cette molécule se situe en dessous de la limite définie par  $\lambda(H)$  selon la formule équation II.3, la longueur  $L$  étant fixe à 6,8 mm (Fig. III-7). Par exemple, pour une hauteur de 100  $\mu\text{m}$ , il faudrait un débit inférieur à  $\sim 3$   $\mu\text{l}/\text{min}$  pour prétendre à la collecte totale de l'acide domoïque en surface du capteur. A un débit supérieur, la collecte sera moins efficace mais reste tout de même partielle. En effet, avec les dimensions du motif microfluidique retenu, le nombre de Peclet  $Pe_S$  reste très



supérieur à 1. Ceci présume un bon renouvellement des espèces dans la zone de déplétion (voisinage de la surface de capture) lorsque l'écoulement microfluidique se situe dans la zone (ii) de la figure II-6 (dans notre cas, lorsque  $Pe_H$  est supérieur à  $\lambda$ ).

Ce graphique (Fig. III-8) indique également à partir de quel débit, à chaque hauteur de canal, la condition microfluidique  $Re < 1$ , définie en II.3.A.2, n'est plus respectée (cf. équation II.4). Au dessus de cette limite, à des débits plus élevés, le comportement des molécules pourrait être différent de celui envisagé.

Les variations de température, influençant la viscosité et donc le coefficient de diffusion ont également été prises en compte; quand elle diminue,  $Pe_H$  augmente et inversement. Les lignes de part et d'autre des lignes principales représentent le nombre de Peclet  $Pe_H$ , pour les molécules correspondantes, à 32° et 42°C (37°C  $\pm$  5°).

D'après ce graphique, une hauteur  $H$  du canal microfluidique de 400  $\mu\text{m}$  risque de ne pas nous permettre d'avoir une collecte suffisante des molécules pour des débits supérieurs à 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ . A 200  $\mu\text{m}$ , seul l'acide domoïque peut se retrouver dans la zone (i) mais à un débit à peine supérieur à 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ . A une hauteur de 50  $\mu\text{m}$ , il faudrait un débit en-dessous de 3  $\mu\text{l}/\text{min}$  pour espérer assurer une collecte totale de l'acide okadaïque, mais cette hauteur de canal risque d'être problématique par rapport à l'écrasement de la puce lors de l'assemblage de la cellule de test, dans le cadre de la géométrie retenue.

La hauteur de 100  $\mu\text{m}$  apparaît alors comme le meilleur compromis, avec une collecte susceptible d'être totale, d'après ces modèles, pour des débits de 1 à 2  $\mu\text{l}/\text{min}$  environ pour l'AO et l'AD, et une collecte partielle pour le biorécepteur (IgG).

### III.2.C) Fabrication de la puce microfluidique: moule et polymère

La puce microfluidique est réalisée en PolyDiMéthylSiloxane (PDMS, Dow Corning, Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit) selon un processus fondé sur la lithographie douce ou "soft lithography" [Whi98], aménagé pour la réalisation de puces PDMS sur capteurs à ondes acoustiques [Rai10], complété par une technique de moulage développée par Hakim Tarbague [Tar09].

Un film de résine négative photosensible (ETERNAL, LAMINAR DRY FILM PHOTOPOLYMER, réf: GA 40) est déposé sur un substrat de silicium (4 pouces) par thermocollage. Cette méthode présente l'avantage d'avoir une hauteur de dépôt contrôlée (100  $\mu\text{m}$ ) en s'affranchissant des étapes délicates de dépôt de résine et de spin-coating. Cette étape a été réalisée au LOF avec les conseils de Matthieu Guirardel. Après insolation du film par UV à travers un masque négatif des motifs sur film transparent imprimé, le substrat subit un recuit pour améliorer la définition des motifs en résine et permet, après révélation, d'obtenir ainsi un moule (empreinte en négatif) réutilisable de la structure (Fig. III-9a).

Un mélange de PDMS et de son réticulant (10 volumes pour 1) est versé par-dessus ces motifs pour en obtenir l'empreinte sur 3mm de haut (Fig. III-9b) [Duf98]. Elle se situera sur la partie inférieure de la puce microfluidique, en contact avec la surface du capteur (Fig. III-10). Après chauffage, une partie du PDMS réticulé contenant les motifs microfluidiques est découpée puis placée dans un moule en aluminium (Fig. III-9c).

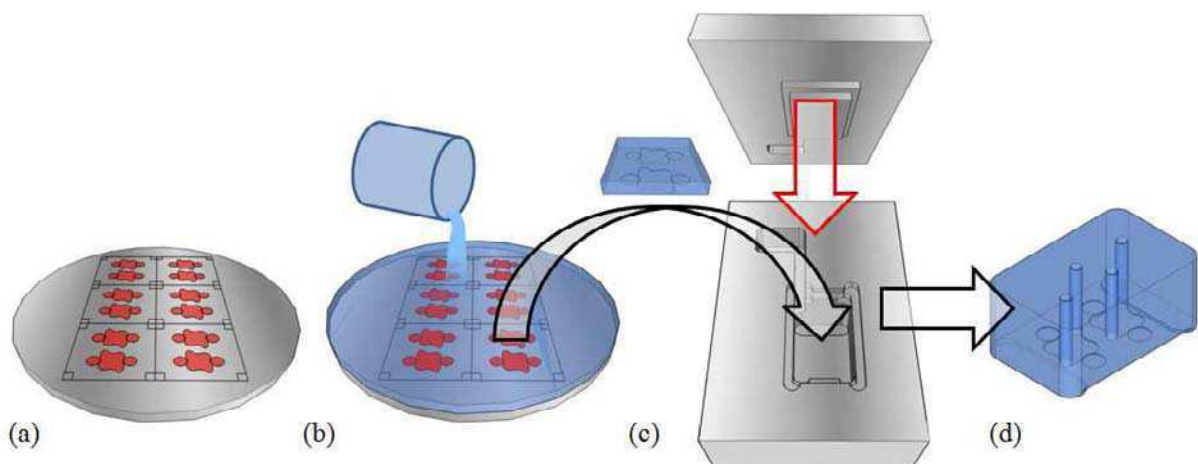


Fig. III-9: Protocole de moulage des puces microfluidiques de PDMS.



Le mélange de PDMS + réticulant est à nouveau versé et un capot referme le moule pour calibrer la hauteur de la puce microfluidique à 10 mm, le mélange excédentaire étant guidé vers un réservoir aménagé à cet effet. Après une nouvelle réticulation, la puce finale est démoulée et les accès pour l'entrée et la sortie des fluides sont percés à l'aide d'une aiguille affûtée (Fig. III-9d).

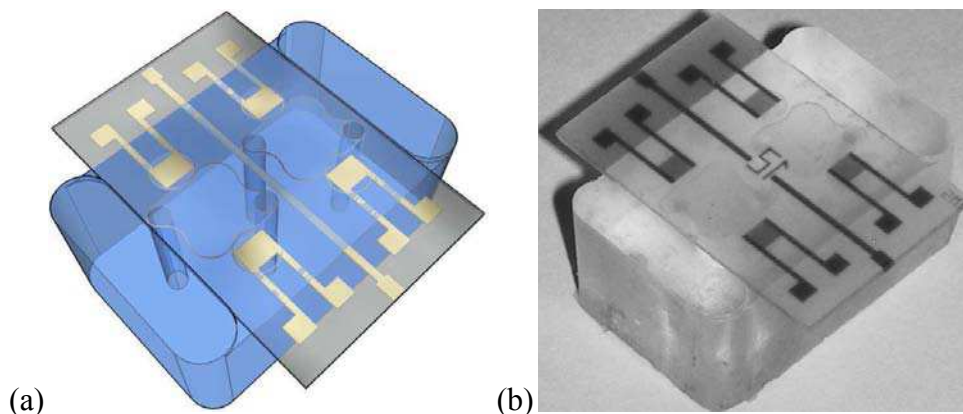


Fig. III-10: Vue de dessous du capteur sur la puce microfluidique. (a) Image Sketchup. (b) Photographie.

La nécessité de décomposer la fabrication d'une puce microfluidique en PDMS vise à obtenir un moulage fin des micro-motifs (les "murs" inter-cavités), tout en assurant une forme de puce, et particulièrement une hauteur, parfaitement contrôlée. Ces deux points permettent d'assurer une pression appliquée sur cette puce par la cellule de test de manière reproductible.

### Partie III.3 – Caractérisation et performances

#### des capteurs à ondes de Love

##### *III.3.A) Pertes d'insertion et phase des capteurs à ondes de Love*

Les capteurs utilisés sont fabriqués au LAAS à Toulouse, dans le cadre du réseau RTB, selon la géométrie souhaitée et avec un procédé technologique mis au point en collaboration. A leur réception, ils sont caractérisés afin de déterminer lesquels pourront être utilisés pour nos expériences de détection futures. Le critère de choix retenu consiste à sélectionner les lignes à retard présentant moins de 35 dB de pertes d'insertion sous air.

La caractérisation des capteurs se fait à l'aide d'un analyseur de réseau (Anritsu, réf: MS4623B) sous air ambiant. Cet appareil permet de mesurer les paramètres  $S_{ij}$  ("scattering parameters"), soit la puissance transmise du port  $j$  au port  $i$ , ou la puissance réfléchi sur le port  $i$  ( $S_{ii}$ ), sur une bande de fréquence, après une étape de calibrage pour s'affranchir du dispositif de test. L'onde acoustique se déplaçant du port 1 au port 2, la bande fréquentielle d'intérêt est caractérisée par le paramètre  $S_{21}$  (ou  $S_{12}$  pour un dispositif symétrique). La figure suivante (Fig. III-11) représente la mesure de ce paramètre pour une ligne d'un capteur dans une cellule de caractérisation.

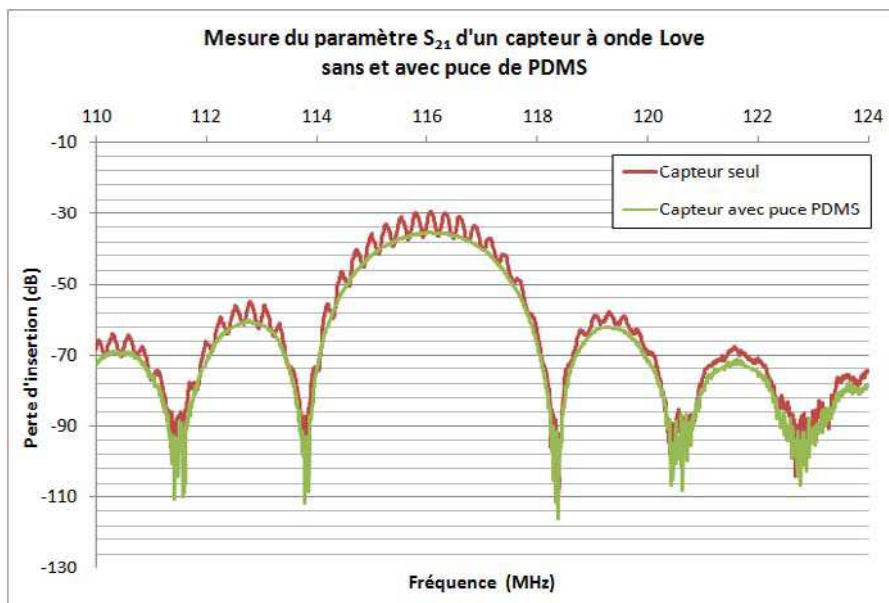


Fig. III-11: Mesure du paramètre  $S_{21}$  d'un capteur à onde de Love sans et avec puce de PDMS.

Le capteur seul présente de nombreux parasites sur sa courbe de réponse fréquentielle. En effet, les réflexions mécaniques sur les IDTs dans la bande passante sont minimisées par une structure en doigts dédoublés [Die74] mais il reste des parasites dus aux réflexions acoustiques sur les bords du capteur à cause du fort changement de densité quartz / air (Fig. III-12).

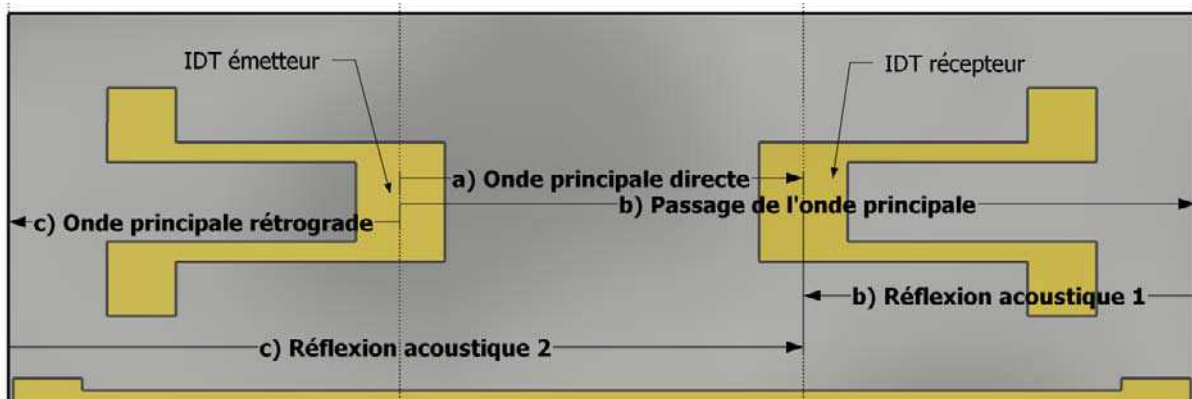


Fig. III-12: Représentation de la propagation des ondes acoustiques. a) Chemin de l'onde principale. b) Première réflexion due à la traversée de l'IDT récepteur par l'onde principale et la réflexion sur le bord droit du capteur. c) Deuxième réflexion due au retour de l'onde principale rétro-générée et de la réflexion sur le bord gauche du capteur.

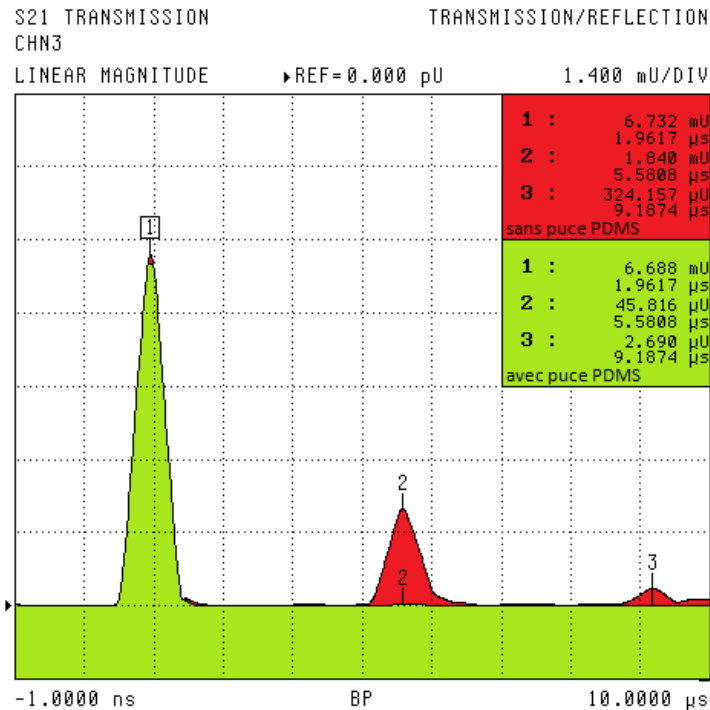


Fig. III-13: Réponse temporelle d'une ligne à retard à onde de Love. 1) Pic acoustique principal. 2) Pics des premières réflexions acoustiques. 3) Pics acoustiques après seconde réflexion.

Ce phénomène de réflexion peut être mesuré à l'analyseur de réseau grâce au domaine temporel (Fig. III-13). Le pic acoustique principal est centré à environ 2 µs après l'équivalent de l'envoi d'une l'impulsion électrique sur le premier IDT et correspond au temps de propagation vers l'autre IDT. Le sommet du pic apparaît lorsque l'onde générée atteint le

centre de l'IDT récepteur (convolution de deux fonctions carrées). La distance centre-à-centre  $L_{cc}$  (8,4 mm) est donc parcourue, dans cet exemple, en 1,96  $\mu\text{s}$ , soit une vitesse de propagation de l'énergie de l'onde acoustique proche de 4285  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . A cette vitesse, le deuxième pic (à  $\sim 5,6 \mu\text{s}$ ) correspond à une distance de parcours de 23,9 mm. Cette distance est égale au trajet de l'onde principal plus le double de la distance entre le bord et l'IDT récepteur (Fig. III-12, trajet "b"). Les capteurs étant symétriques et les IDTs bidirectionnels, la distance "c", parcourue par l'onde rétro-générée, est égale à la distance "b". Les deux ondes arrivent ainsi en même temps et les phénomènes de réflexion acoustique s'additionnent. Le troisième pic acoustique (à 9,2  $\mu\text{s}$ ) apparaît après une seconde réflexion sur le bord droit du capteur de l'onde rétro-générée.

Grâce à la puce de PDMS, les pics secondaires ainsi que les perturbations acoustiques parasites sont complètement atténués dès leur passage à l'extérieur du faisceau acoustique, alors que l'énergie du pic principal est à peine diminuée du fait des murs inter-cavités très fins. Le tableau III-3 synthétise ces résultats, montrant l'intérêt d'une puce en PDMS du point de vue de l'énergie acoustique.

	Energie du pic acoustique principal (1)	Pic (2)		Pic (3)	
		Energie	% du pic 1	Energie	% du pic 1
Sans PDMS	6,732 mU	1,84 mU	27 %	324,157 $\mu\text{U}$	4,8 %
Avec PDMS	6,688 mU	45,816 $\mu\text{U}$	0,7 %	2,69 $\mu\text{U}$	0.04 %
Atténuation	0,65 %	97,5 %		99 %	

Tab. III-3: Influence de l'ajout d'une puce de PDMS sur l'énergie des pics acoustiques.

L'élimination des parasites acoustiques permet d'améliorer la qualité de la courbe de phase (Fig. III-14). La fréquence de synchronisme mesurée correspond à une vitesse de phase. Un changement des propriétés en surface – densité du milieu, viscosité, apport de masse, etc – induit, généralement, un ralentissement de l'onde et donc une diminution de sa phase (augmentation du retard). La courbe de phase ayant une pente négative, la fréquence de résonance diminue alors proportionnellement. Ainsi, la puce de PDMS rendra la phase

rectiligne et assurera une plus grande stabilité de la fréquence, donc des courbes de réponse en détection plus nettes.

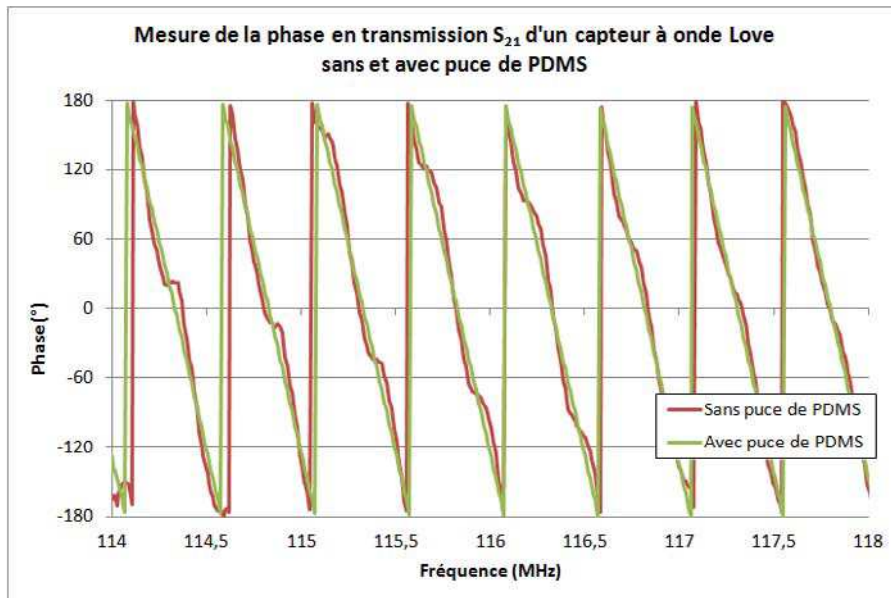


Fig. III-14: Mesure de la phase en transmission  $S_{21}$  d'un capteur à onde de Love sans et avec puce de PDMS.

Le blindage électromagnétique de la cellule de test a aussi son importance. La conformation des IDTs en font des antennes à ondes électromagnétiques qui peuvent perturber la propagation de l'onde acoustique (cf. II.3.B.2). Une nouvelle cellule de test, de réalisation plus standard sur circuit époxy, était en cours d'étude au sein de l'équipe (Fig. III-15). La figure Fig. III-16 permet de comparer les réponses obtenues, l'une avec une cellule de test en laiton, adaptée des cellules utilisées précédemment, l'autre avec une version préliminaire de cellule sur époxy, alors disponible.

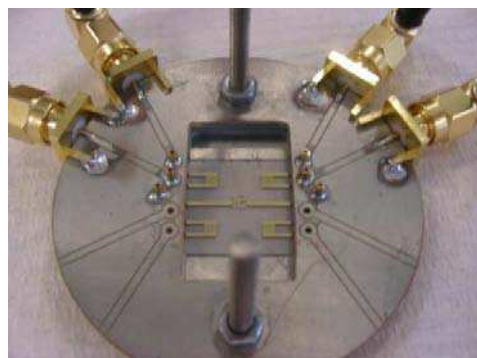


Fig. III-15: Photo de cellule de test (prototype) sans blindage.

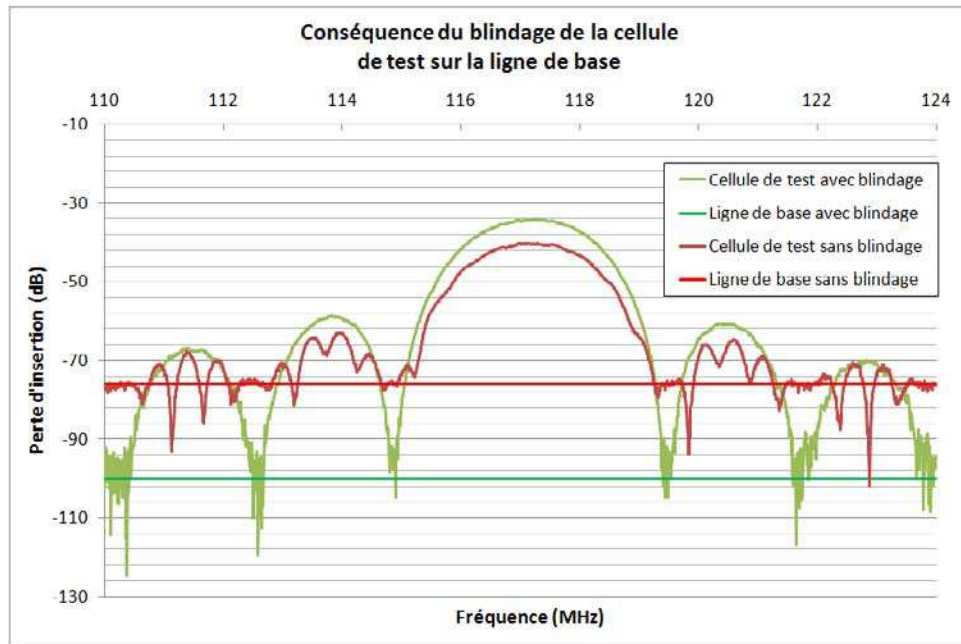


Fig. III-16: Conséquence du blindage de la cellule de test sur la ligne de base.

La courbe des pertes d'insertion en fonction de la fréquence, obtenue avec ce prototype, a mis en évidence des pertes d'insertion plus grandes, et des lobes (ainsi qu'une pente de phase, non représentée) moins bien définis. De plus, la ligne de base est rehaussée. Ces éléments témoignent d'un défaut de blindage électromagnétique, se traduisant notamment par une diminution de la réjection du lobe principal par rapport à la ligne de base. Or, ce dernier paramètre est très important car il définit le maximum de perte d'insertion supplémentaire admissible au cours de l'expérience, et donc la variation maximale de masse ou d'autres paramètres d'influence permettant une mesure correcte du signal du capteur.

En effet, les changements de l'état de surface du capteur peuvent entraîner une augmentation des pertes d'insertion. Plus elles augmentent, plus le pic principal, ainsi que les lobes secondaires, diminuent, se rapprochant de cette ligne de base. La réjection étant diminuée, le montage nécessite une amplification plus importante pour assurer l'oscillation dont la stabilité est alors dégradée, rendant plus difficile le suivi de la fréquence. Au-delà d'un certain seuil, le montage ne peut plus fonctionner.

Pour assurer une bonne "amplitude" de détection au cours des expériences, la ligne de base doit être la plus basse possible. Pour se placer dans les meilleures conditions

d'expérimentations possibles, les détections futures se feront en utilisant des cellules de tests métalliques blindées.

### III.3.B) Influence d'un milieu liquide

Lors des expériences, la présence d'un milieu liquide et l'apport en masse des différentes espèces font augmenter les pertes d'insertion, bien que l'électronique d'oscillation permette de les compenser en partie. Ainsi, les pertes d'insertion, dans l'exemple figure Fig. III-17, augmentent de 5 dB environ en présence de liquide, de type tampon salin.

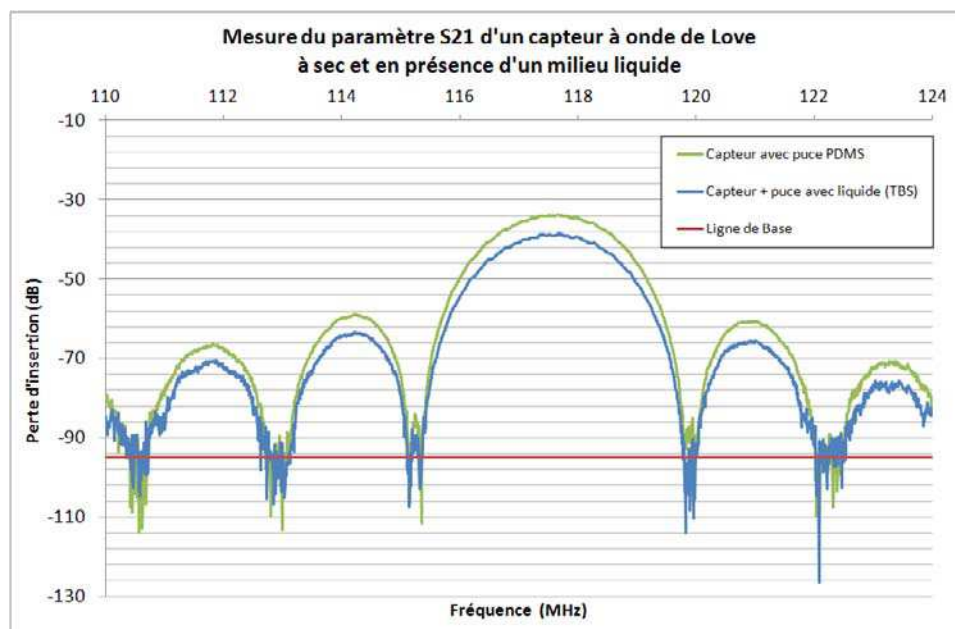


Fig. III-17: Mesure du paramètre  $S_{21}$  d'un capteur à onde de Love sous air et en présence d'un milieu liquide.

Par ailleurs, la présence du liquide induit une augmentation du retard et ainsi une diminution de la phase. L'oscillateur fonctionnant à point équiphase, la fréquence diminue alors de 70 kHz environ (Fig. III-18).



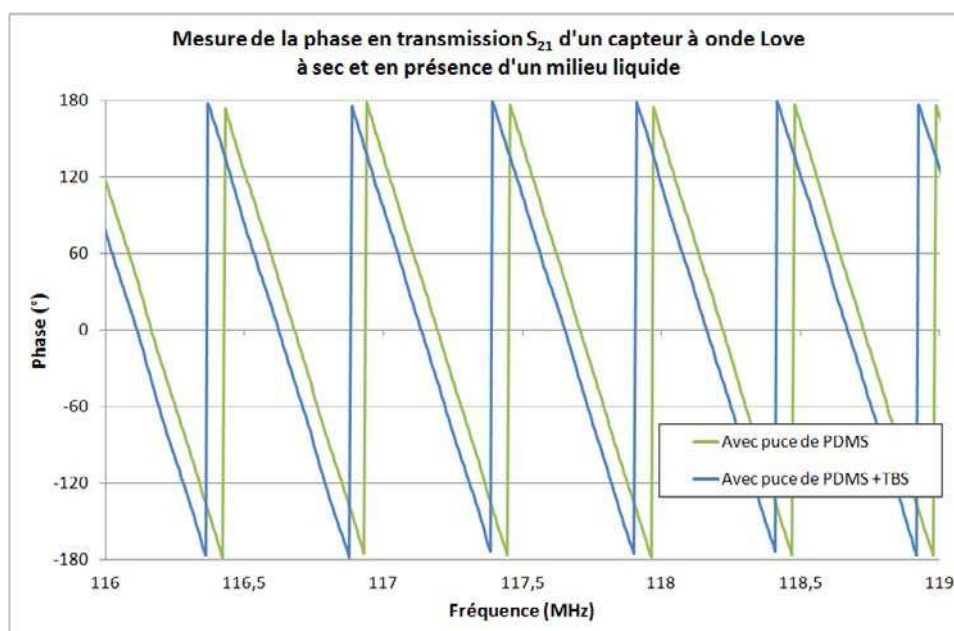


Fig. III-18: Mesure de la phase en transmission  $S_{21}$  d'un capteur à onde de Love à sec et en présence d'un milieu liquide. Echelle centrée sur le domaine fréquentiel du lobe principal.

Il apparaît également, sur la figure Fig. III-18, que, sur les lignes à retard à ondes de Love utilisées, la phase fait un tour complet ( $360^\circ$ , de  $180^\circ$  à  $-180^\circ$ ) sur 500 kHz environ. Ainsi, une variation importante de l'état de surface du capteur, induisant plus 500 kHz de variation de fréquence, de manière brutale, durant l'intervalle entre deux acquisitions du fréquencemètre (temps défini par le logiciel), pourrait être confondue avec un "saut de phase".

Ce phénomène de saut peut être visible lorsque deux points équiphasés ont des pertes ( $S_{21}$ ) similaires après compensation par l'électronique d'amplification. Pour limiter au maximum ces effets indésirables, les capteurs, les cellules de tests ainsi que l'électronique d'oscillation sont validés préalablement et alimentés par des sources de tension stables (Agilent Technologies, réf: E3648A, 100 W).

### III.3.C) Comportement avec des fluides complexes (PEG)

Pour caractériser la nouvelle chambre microfluidique, des mesures de fluides complexes à base de Polyéthylène glycol (PEG, Sigma Aldrich) ont été comparées avec les



travaux précédemment effectués par V. Raimbault [Rai08]. La figure Fig. III-19 suivante illustre l'influence de la largeur du canal microfluidique sur l'amplitude de variation de fréquence pour différentes solutions de PEG et de glycérol dilués dans de l'eau déionisée.

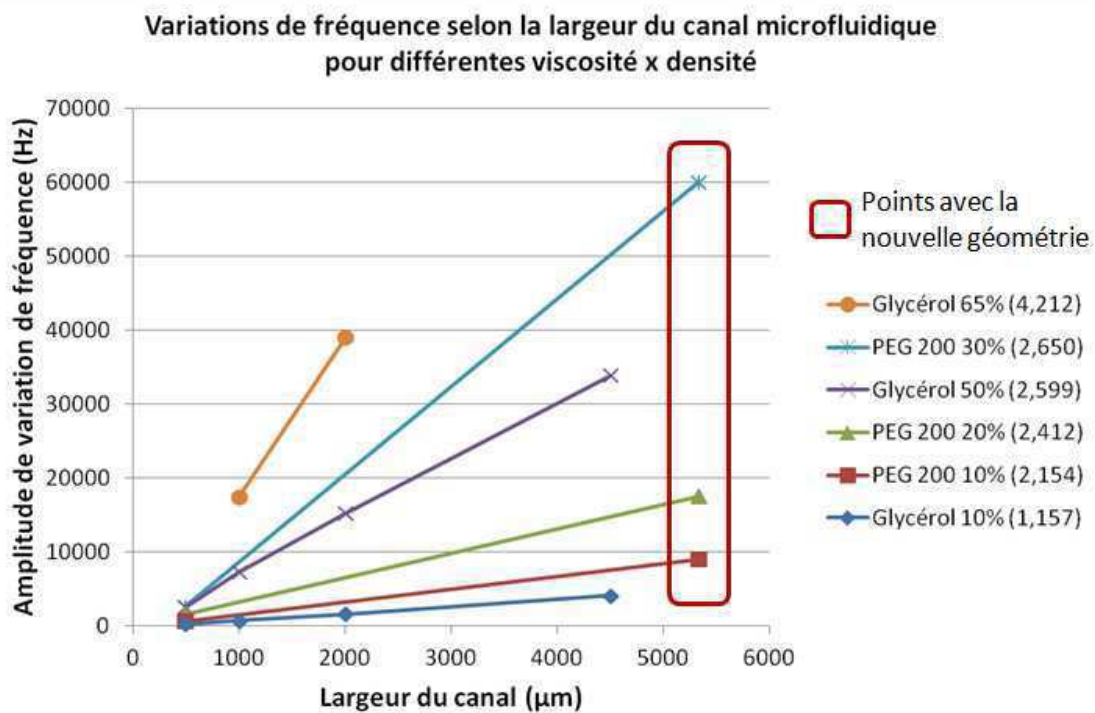


Fig. III-19: Variations de fréquence selon la largeur du canal microfluidique pour différents liquides. La racine du produit de la densité par la viscosité de chaque solution ( $\sqrt{\rho\eta}$ ) est indiquée entre parenthèses.

Ainsi, V. Raimbault a démontré que cette influence était linéaire sur quatre largeurs de canaux (500 µm, 1000 µm, 2000 µm et 4500 µm) dans la limite d'un comportement newtonien des fluides. Les points correspondant à la nouvelle géométrie sont ceux pour une largeur de canal de 5330µm (Fig. III-4). Ces nouvelles données s'intègrent bien dans le graphique, avec une pente qui augmente avec la valeur de la quantité  $\sqrt{\rho\eta}$ .

## Partie III.4 – Banc de test microfluidique et fonctionnalisation du capteur

### III.4.A) *Greffage des anticorps biorécepteurs*

#### III.4.A.1. Protocole de greffage

En vue d'immobiliser les anticorps à la surface du capteur, une monocouche auto-assemblée (Self Assembled Monolayer, SAM) composée de (3-glycidoxypropyl)-triméthoxysilane (GPTS) est préalablement greffée pour assurer la liaison entre les terminaisons silicium de la couche guidante en SiO<sub>2</sub> et les groupes amines des anticorps (cf. II.3.A.4). Cette étape de fonctionnalisation est effectuée au sein de l'ISM par Laurent Thomas. Les capteurs fonctionnalisés sont transportés au LIP, site où se trouve le banc de manipulation et où se dérouleront les expériences de détection. Les terminaisons de la couche chimique étant actives pendant 48 heures après greffage, les expériences doivent donc être effectuées dans cet intervalle de temps. Les différents anticorps à utiliser sont stockés dans un réfrigérateur (4°C) au LIP. Une fois mis à la température du capteur, en les plaçant dans le bain de sable thermostaté, ils sont injectés dans le cône d'entrée (cf. Fig. III-21). Le débit appliqué au liquide, permettant l'immobilisation des anticorps à la surface du capteur, leur concentration, le mélange ou non avec d'autres espèces, sont des conditions variables des différents protocoles expérimentaux.

#### III.4.A.2. Quantification et distribution des anticorps

En vue d'estimer la quantité et la concentration d'anticorps à présenter à la surface du capteur pour la saturer, et afin d'ajuster certains paramètres expérimentaux, des essais préliminaires de type test ELISA ont été réalisés. Une immunoglobuline de type G (IgG, chaîne- $\gamma$  spécifique) de chèvre anti-souris (Goat Anti-Mouse, GAM), marquée par une

molécule de peroxydase (HorseRadish Peroxidase, HRP), et disponible chez Sigma Aldrich (réf: A3673), a été retenue pour ces essais.

Des solutions à différentes concentrations (de 20 à 800 µg/ml) et avec différentes quantités d'anticorps (5 à 20 µg) ont été injectées sur le capteur, soit en dynamique via la puce microfluidique soit en statique (dépôt direct sur la surface, chambre ouverte). L'immobilisation des anticorps à la surface du capteur a été suivie par l'acquisition de la variation de fréquence de synchronisme, donnant une première indication de la quantité d'anticorps greffée.

Le capteur, extrait de la cellule, a ensuite été placé dans une solution contenant de l'ortho-phénylène diamine (OPD) et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), réalisée à partir d'*o*-phenylenediamine dihydrochloride (SIGMAFAST™ OPD, Sigma Aldrich, réf: P9187). Le peroxyde d'hydrogène, en présence de peroxydase, va subir une transformation enzymatique le dégradant en H<sub>2</sub>O et oxygène. L'oxydation de l'OPD qui en résulte provoque un changement de couleur de la solution, mesuré par photospectromètre à une longueur d'onde de 450 nm après 3 à 6 minutes de temps de réaction. Une gamme étalon servant de référence est réalisée à chaque nouvelle mesure, simultanément et dans les mêmes conditions (temps de réaction, température ambiante, protection contre la lumière). Cette gamme étalon est réalisée en injectant différentes quantités connues d'anticorps dans un même volume de solution de SIGMAFAST™ OPD.

Les mesures par photospectrométrie, contrôlées à l'aide de la gamme étalon, ont en effet permis de valider la présence d'anticorps et d'estimer une quantité de l'ordre de 14 ng en moyenne. Cependant, la quantité d'anticorps ainsi mesurée varie assez fortement (jusqu'à 40 ng) sans être corrélée avec la quantité injectée, la concentration en anticorps ou le mode d'injection. Cette différence pourrait s'expliquer par le masquage aléatoire de la peroxydase par d'autres anticorps (cf. Fig. II-8), induisant un changement de colorimétrie moins important.

Par contre, les variations de fréquence relevées en statique et en dynamique restent sensiblement aux alentours de 14 kHz (écart-type ±1,5 kHz sur 12 mesures), laissant supposer

---

que l'on se trouve dans des conditions de saturation pour l'ensemble de ces solutions. Aussi, nous avons proposé de retenir une quantité typique de 8  $\mu\text{g}$  pour la suite de nos travaux. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle utilisée dans le cadre de travaux antérieurs [Mol07]. Par rapport à ces travaux, l'utilisation de faibles volumes avec une puce microfluidique nous amènera à considérer des concentrations plus élevées, typiquement de 400  $\mu\text{g/ml}$ , pour des volumes d'échantillons de 20  $\mu\text{l}$ .

Par ailleurs, pour vérifier la distribution des anticorps sur la surface du capteur, un autre produit révélateur de la peroxydase a été employé (AEC Staining Kit, Sigma Aldrich, réf: AEC101-1KT). Ce kit contient du peroxyde d'hydrogène et un chromogène, le 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC), qui, en réagissant avec les peroxydases de surface, précipitent en une tâche rougeâtre de la forme de la chambre microfluidique (Fig. III-20).

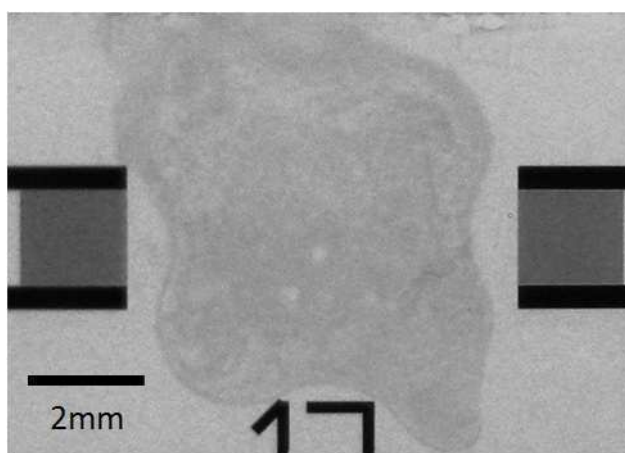


Fig. III-20: Photographie (noir et blanc) de la distribution des anticorps à la surface du capteur dans la chambre microfluidique, révélée après passage du AEC Staining Kit.

### *III.4.B) Instrumentation*

#### **III.4.B.1. Banc de test**

Le banc de test (Fig. III-21) pour les détections de phycotoxines est composé de différents éléments acoustiques, électroniques, fluidiques et microfluidiques, ainsi que thermiques.

Il est constitué de trois cellules de tests, chacune d'entre elle reliée à deux dispositifs d'oscillations pour expériences en milieu liquide à une voie, portant le tout à six lignes. Trois fréquencesmètres double voies (HP 53131A) sont donc reliés à ces dispositifs, eux-mêmes connectés entre eux par câbles IEEE GPIB. Un ordinateur portable permet le pilotage des fréquencesmètres par le port PCMCIA et l'acquisition de fréquence se fait via une interface précédemment développée sur LabWindows / CVI.

La partie fluidique est composée de six seringues (Hamilton, 10ml, réf: GASTIGHT #1010) placées en sortie des six lignes. Des tubulures PTFE relient les puces de PDMS à ces seringues ainsi qu'aux cônes plastiques (gradués 10, 50, 100 et 200 $\mu$ l) placés comme réservoirs d'entrée. Un pousse-seringue 8 voies (BioSeb, BS-9000-8) est utilisé pour appliquer un débit régulier au cours de l'expérience. Ce montage assure la circulation du fluide par aspiration plutôt que par poussée, améliorant ainsi l'étanchéité de la puce PDMS sur le capteur.

Les cellules de mesures, équipées des capteurs prêts à recevoir les anticorps, sont posées sur un bain de sable thermostaté pour obtenir 37°C environ au niveau de la surface des capteurs, température optimale pour la formation du complexe antigène / anticorps. Pour éviter les changements de température, un tube contenant le liquide de référence (environ 10 ml) est également chauffé en préparation aux expériences à suivre.

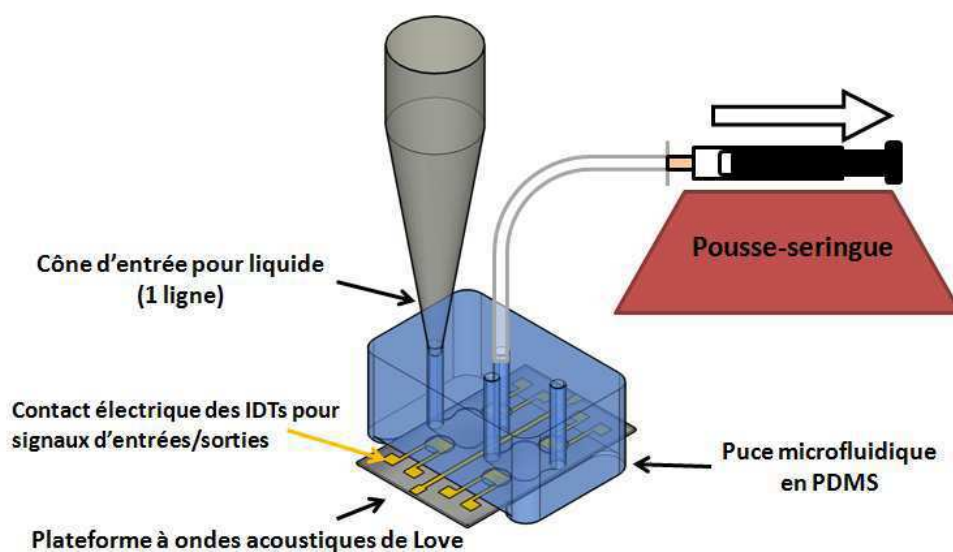


Fig. III-21: Schéma simplifié de l'instrumentation.

### III.4.B.2. Protocole général de manipulation

Ce banc de test est mis en route pour une mise en température de l'ensemble et afin de contrôler le fonctionnement des capteurs (oscillation à la fréquence de synchronisme). La puce microfluidique précédemment décrite est ensuite positionnée au-dessus du capteur, les épaulements s'emboîtant sur les bords latéraux des lignes à retard. Un bon positionnement de la puce sur le capteur est important pour éviter l'augmentation des pertes d'insertion du lobe principal en cas de contact avec la surface sensible. Le positionnement du capot de serrage, des tubulures et des cônes d'entrées se font avec la même attention, en contrôlant que les fréquences observées n'ont pas changé au cours de ces manipulations.

Avant utilisation, chaque seringue et son piston sont nettoyés avec de l'éthanol puis séchés à l'air libre. L'embout du piston est ensuite légèrement humidifié avant d'être inséré complètement dans la seringue; cela permet de diminuer les frottements tout en préservant l'étanchéité au niveau de l'embout.

Le protocole de l'annexe 3 décrit les connexions de l'ensemble des éléments constituant la partie fluide du banc, ainsi que les précautions de manipulation à prendre pour la mise en route des expériences.

Les adresses GPIB de chaque fréquencesmètre utilisé sont entrées dans le logiciel d'acquisition. A chaque nouvelle expérience, le logiciel génère un fichier EXCEL; il comprend la date et l'heure de l'acquisition, le temps écoulé et la fréquence acquise toutes les secondes pour chacun des fréquencesmètres. Pour faciliter le traitement des données, les noms des capteurs sont renseignés, la voie 1 du fréquencesmètre correspondant, par convention, à la ligne du haut du capteur et la voie 2 à celle du bas.

Pour repérer chaque phase de l'expérience, le logiciel intègre un système de marqueur, permettant de spécifier quelle action va être effectuée. L'utilisateur doit alors "marquer" l'action, la faire puis la "démarquer". Le texte inscrit sera répété dans la colonne marqueur du fichier d'acquisition jusqu'à ce qu'il soit démarqué. Cette procédure facilite l'analyse des courbes en ayant un point de repère précis à partir duquel observer les variations de fréquences.

## BILAN

Fort de l'expérience du laboratoire IMS en matière d'ondes acoustiques, nous avons conçu et développé une plateforme visant la détection spécifique d'espèces à faible poids moléculaire en milieu liquide.

Un capteur à ondes de Love, et plus généralement une ligne à retard à ondes acoustiques, possède une grande sensibilité envers de nombreux phénomènes physiques. La température, la pression, la densité et la viscosité du fluide à sa surface, ainsi que la masse apportée sont autant de paramètres à prendre en compte lors de la conception. La coupe cristallographique, l'utilisation d'une puce microfluidique et d'une solution de référence permettent de minimiser l'impact de ces phénomènes, laissant un maximum d'amplitude pour l'effet de masse, ou tout autre effet mécanique lié à l'immobilisation des espèces cibles.

La puce microfluidique apporte un réel avantage pour la biodétection par ondes de Love. D'un point de vue acoustique, elle atténue toutes les ondes parasites grâce au polymère qui la constitue. Ceci entraîne des répercussions positives sur le signal électrique qui devient plus net, se traduisant par un signal de sortie plus stable. D'un point de vue expérimental, la quantité et la concentration des espèces apportées à la surface du capteur sont mieux contrôlées. L'impact du manipulateur sur l'expérience se retrouve réduit et la reproductibilité améliorée. Ce dernier paramètre est très important lors de l'élaboration d'un protocole visant la faisabilité d'une biodétection.

Les expériences qui vont être réalisées avec cette plateforme de détection, délicates du fait des petites molécules à détecter, nécessitent de se placer dans les meilleures conditions dès le départ. C'est dans cette optique qu'a été choisi chaque composant de la plateforme. Les lignes à retard à ondes de Love doivent présenter des pertes d'insertion les plus faibles possibles. Les pointes de contact, les cellules de test, les connexions, doivent également satisfaire ce niveau d'exigence. Les systèmes électroniques, d'alimentation, d'oscillation et d'acquisitions sont tout aussi primordiaux que le système fluidique utilisé pour l'injection des solutions biologiques.



**BIBLIOGRAPHIE**

- [Arm99] D. Armani, C. Liu, N. Alura, Re-configurable Fluid Circuits by PDMS Elastomer Micromachining, *Micro Electro Mechanical Systems* (17), p.222-227, 1999.
- [Che00] C.L. Cheung, J.H. Hafner, C.M. Lieber, Carbon nanotube atomic force microscopy tips: Direct growth by chemical vapor deposition and application to high-resolution imaging, *PNAS*, vol. 97 (8), p.3809-3813, 2000.
- [Die74] E. Dieulesaint, D. Royer, *Ondes élastiques dans les solides – Application au traitement du signal*, éd: Masson et Cie, 1974.
- [Dow08] Dow Corning, Information about Dow Corning Brand Silicone Encapsulants, Product Information, 2000-2008.
- [Duf98] D. C. Duffy, J. C. McDonald, O. J. A. Schueller, G. M. Whitesides, Rapid Prototyping of Microfluidic Systems on Poly(dimethylsiloxane), *Analytical Chemistry*, vol. 70, p.4974-4984, 1998.
- [Rai10] V. Raimbault, D. Rebière, C. Dejous, M. Guirardel, J. Pistré, J.L. Lachaud, High frequency microrheological measurements of PDMS fluids using saw microfluidic system, *Sensors and Actuators: B*, vol. 144, p.467-471, 2010.
- [Raz05] F.A. Razan, Etude de microcapteurs à ondes acoustiques dédiés à la détection fine de produits chimiques à l'échelle laboratoire et industrielle, Thèse n° 3079, Université Bordeaux 1, 2005.
- [Tar09] H. Tarbague, J.-L. Lachaud, S. Destor, L. Vellutini, J.-P. Pillot, B. Bennetau, D. Moynet, D. Rebière, J. Pistre, C. Dejous, PDMS (Polydimethylsiloxane) Microfluidic Chip Molding for Love Wave Biosensor, *ECS Transactions*, vol. 23 (1), p.319-325, 2009.
- [Whi98] G.M. Whitesides, Y. Xia, Soft lithography. *Annual Review of Materials Science*, vol. 28 (1), p. 153–184, 1998.

## Chapitre IV – Applications à la détection de phycotoxines

Introduction .....	106
<b>Partie IV.1 – Détection d'acide okadaïque (DSP) .....</b>	<b>106</b>
IV.1.A) Préparatifs pour la détection de l'acide okadaïque.....	106
IV.1.A.1. L'acide okadaïque et la 6xhistidine.....	106
IV.1.A.2. L'anticorps anti-acide okadaïque.....	107
IV.1.A.3. Préparation de la couche immuno-sensible .....	109
IV.1.B) Détection de l'acide okadaïque (phycotoxine DSP).....	113
IV.1.B.1. Protocole de détection par méthode sandwich .....	113
IV.1.B.2. Réponse du capteur à la seconde injection de l'anticorps .....	114
IV.1.C) Interprétation et Seuil sanitaire.....	115
<b>Partie IV.2 – Détection de l'acide domoïque (ASP).....</b>	<b>116</b>
IV.2.A) Préparatifs pour la détection de l'acide domoïque .....	116
IV.2.A.1. Retour sur la problématique du projet ASCOBAR .....	116
IV.2.A.2. Synthèse de l'haptène .....	117
IV.2.A.3. Fabrication et caractérisation des anticorps .....	119
IV.2.B) Détection d'acide domoïque par la plateforme acoustique à ondes de Love..	122
IV.2.B.1. Particularité pour la détection de l'acide domoïque .....	122
IV.2.B.2. Préparatif et Protocole .....	123
IV.2.B.3. Variations de fréquence et Comparaison des résultats .....	125
a. Greffage de la couche sensible .....	125
b. Etape de compétition à l'acide domoïque-thyroglobuline .....	128
c. Analyse des résultats .....	130
IV.2.C) Détection au seuil sanitaire .....	131
<b>Bilan &amp; Perspectives.....</b>	<b>133</b>

## INTRODUCTION

Ce dernier chapitre détaille les protocoles et les expériences de détection de deux phycotoxines, l'acide okadaïque et l'acide domoïque, appartenant chacune à une famille responsable d'un type d'empoisonnement différent, respectivement la DSP et l'ASP.

Pour chaque phycotoxine, les préparatifs sont décrits et le raisonnement conduisant à l'élaboration du protocole final est exposé. Chaque étape du protocole est détaillée, les résultats obtenus sont présentés puis analysés.

Notre méthode de détection, au stade de faisabilité, s'attache à détecter s'il y a présence ou non de phycotoxine dans une solution donnée. Les seuils sanitaires sont définis selon une concentration de phycotoxine contenue dans le coquillage, exprimée en microgrammes (de toxine) pour 100 g de chair de coquillage. Aussi, les résultats obtenus expérimentalement, seront ramenés à une quantité de chair de coquillage minimum permettant une détection (réponse significative du capteur) au seuil sanitaire de la phycotoxine correspondante.

Pour finir, le bilan de ces expériences sera dressé et des perspectives seront mentionnées en vue de futures améliorations.

## Partie IV.1 – Détection d'acide okadaïque (DSP)

### *IV.1.A) Préparatifs pour la détection de l'acide okadaïque*

#### IV.1.A.1. L'acide okadaïque et la 6xhistidine

Les tests expérimentaux ont été réalisés dans un premier temps avec un couple acide / anticorps disponible commercialement, afin de valider notre plateforme pour la détection d'une petite molécule d'intérêt. Dans ce cadre, l'acide okadaïque (AO, LC Laboratories, réf: Cat O-2220 ou chez Sigma-Aldrich, O8010) a été retenu comme modèle de

phycotoxine (cf. I.1.B.4). Il a été solubilisé dans de l'eau distillée à une concentration de 100 µg/ml.

L'acide okadaïque a une masse molaire de 805 g.mol<sup>-1</sup> avec 44 atomes de carbone par molécule (Fig. IV-1).

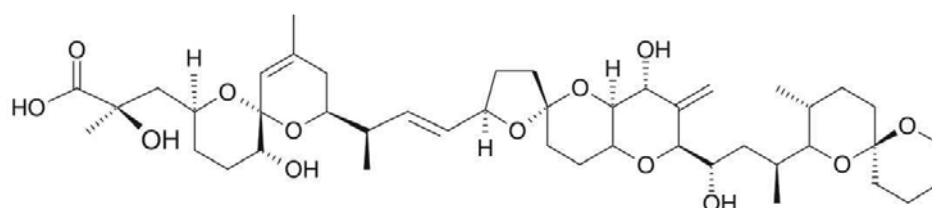


Fig. IV-1: Rappel de la formule chimique de l'acide okadaïque.

Pour analyser la future réponse, notamment avoir une information sur la spécificité du détecteur, une référence est nécessaire. Un peptide, avec approximativement la même masse molaire et une géométrie proche, a été utilisé pour effectuer ce contrôle. Une molécule d'histidine (Fig. IV-2a) a une masse molaire 155,15 g.mol<sup>-1</sup> pour six atomes de carbone. Le peptide 6xhistidine (6xHis, Fig. IV-2b) synthétisé sur demande par Genecust est composé de 6 molécules d'histidine, réalisant ainsi un compromis entre une masse molaire, autour de 930,9 g.mol<sup>-1</sup>, et un nombre de 36 atomes de carbone, équivalent à l'AO.

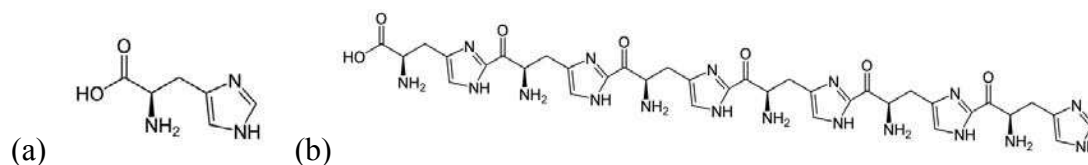


Fig. IV-2: (a) Formule chimique de l'histidine. (b) Formule chimique théorique du peptide 6xHistidine synthétisé.

#### IV.1.A.2. L'anticorps anti-acide okadaïque

Pour satisfaire à une détection spécifique de l'acide okadaïque (AO), nous avons utilisé un anticorps polyclonal de lapin anti-AO, Ac<sub>AO</sub>, (Abcam, réf: ab-2897). La concentration de la solution commerciale n'étant pas disponible, les paramètres de solutions d'anticorps

proposées précédemment (cf. III.4.A.2) n'étaient pas directement utilisables dans ce cas. Aussi, un test ELISA a été réalisé préalablement, dans le cadre des travaux de post-doctorat de Maria Mamani-Matsuda du LIP, pour déterminer la dilution optimale de la solution en vue de son utilisation sur le capteur.

Une solution contenant 10  $\mu\text{g/ml}$  d'AO est ainsi déposée dans chaque puits de la plaque de titration. Puis différentes dilutions de la solution  $\text{Ac}_{\text{AO}}$ , de 1/100 à 1/64000, diluée dans un tampon salin à base de phosphate (PBS), sont injectées. Enfin, 28,5  $\mu\text{g/ml}$  d'un anticorps de chèvre anti-lapin couplé à une peroxydase (GAR-HRP, Sigma Aldrich, réf: A3673) sont également injectés pour révéler les formations de complexes par une mesure de densité optique (D.O.) au spectromètre à 450 nm en absorbance (Fig. IV-3).

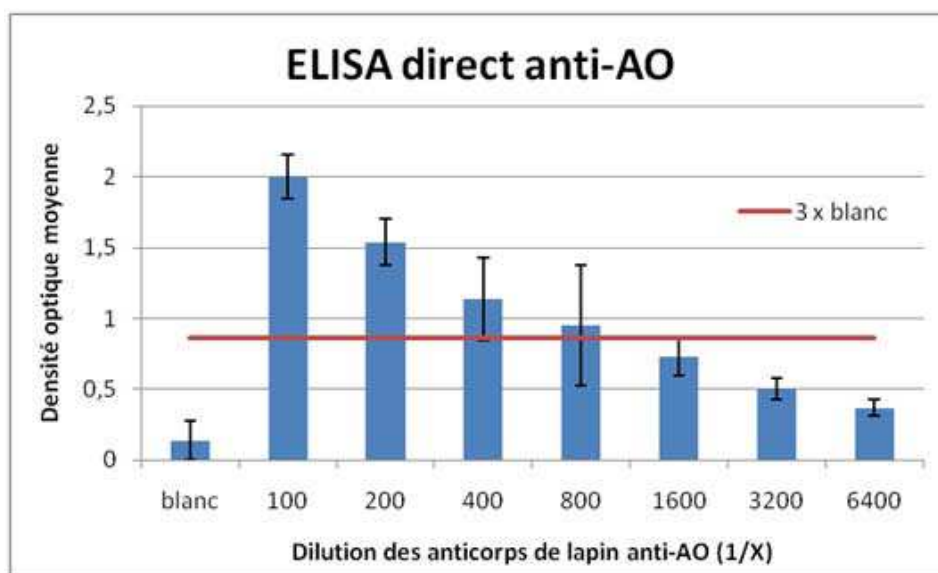


Fig. IV-3: Titration par test ELISA direct de l'anticorps commercial de lapin anti-acide okadaïque.

D'après ces résultats de test ELISA, la limite de détection spécifique, déterminée classiquement pour une D.O. triple de celle obtenue pour le "blanc", en tenant compte de l'écart-type dans chaque cas, se situe à la dilution à 1/400. De plus, dans le protocole de biodétection par ondes de Love (cf. IV.1.A.3), la solution d'anticorps est diluée par 3,5 lorsqu'elle est injectée dans le cône d'entrée, avant d'atteindre la chambre microfluidique. Ainsi, c'est la solution diluée à 1/100 qui a été choisie pour les injections. D'autres

expériences avec des solutions plus concentrées ont donné des résultats similaires, prouvant que la saturation a été atteinte.

Il faut remarquer que cet anticorps est polyclonal; la solution contient donc plusieurs types d'anticorps avec différents paratopes, reconnaissant chacun une partie différente de l'acide okadaïque (épitopes). Cette caractéristique nous sera utile pour la suite.

#### IV.1.A.3. Préparation de la couche immuno-sensible

Après le processus de fonctionnalisation chimique (cf. III.4.A.1), les capteurs sont placés dans la cellule de test et la plateforme est installée comme décrit précédemment (cf. III.4.B).

Une solution de référence de Tris Buffer saline (TBS, Sigma, réf: T664-10PAK) est utilisée comme liquide de référence; c'est par ce liquide que seront transportées toutes les espèces et particules à venir. Cela garantit une densité et une viscosité sensiblement homogènes tout au long de l'expérience (cf. II.3.B.1).

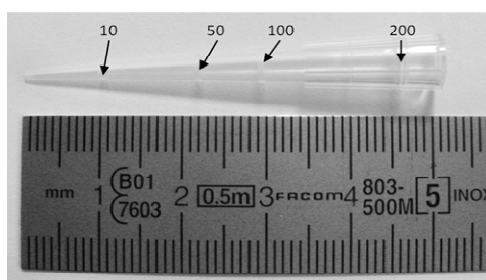


Fig. IV-4: Photo d'un cône gradué en  $\mu\text{l}$ , utilisé en entrée du circuit liquidien.

Lorsqu'il ne reste plus que 50  $\mu\text{l}$  environ dans le cône d'entrée (Fig. IV-4), un volume de 20  $\mu\text{l}$  de la solution d'anticorps anti-acide okadaïque diluée à 1/100 est alors injecté (Fig. IV-5a). Après un laps de temps de 20 min permettant l'évacuation des anticorps non-greffés par la circulation de liquide de référence, une solution de 20  $\mu\text{l}$  d'agent bloquant (Starting Block Blocking Buffer, SBBB, Thermo Scientific, réf: 37542) est injectée sur la ligne,

toujours avec 50  $\mu$ l de TBS restant dans le cône (Fig. IV-5b). Cet agent est composé de molécules de différentes tailles permettant ainsi l'inhibition des sites restés libres de la couche de GPTS, et limitant ainsi les accroches non spécifiques des molécules à venir. Un débit à 10  $\mu$ l/min est suffisant pour permettre le greffage, induisant un effet de masse, ainsi que l'évacuation de ces grandes molécules qui n'auraient pas été liées de façon covalente à la surface (cf. Fig. II-6).

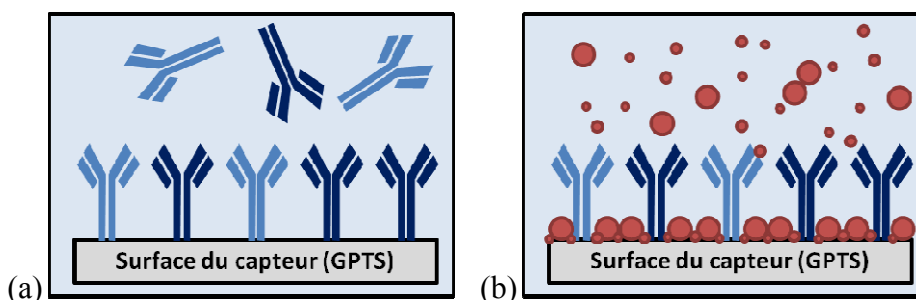


Fig. IV-5: Description schématique du protocole de préparation de la couche immuno-sensible.

- (a) Greffage des anticorps sur la surface du capteur. La couleur des anticorps les différencie selon leur paratope.  
(b) Saturation de la couche d'accroche par le SBBB.

L'acquisition des fréquences de synchronisme est effectuée de manière continue tout au long de l'expérience. Bien que les mêmes solutions (concentrations et quantités identiques) soient utilisées, l'amplitude de la variation de fréquence est différente d'un capteur à l'autre, voire d'une ligne à l'autre. Ces différences proviennent de la variabilité issue des différentes étapes de fabrication et de traitements du capteur, du substrat initial de quartz à la fonctionnalisation de surface. De plus, des phénomènes extérieurs, quoique minimisés au maximum (cf. II.3.B.), peuvent influencer l'amplitude, voire la forme même, de la réponse fréquentielle.

Aussi, en vue d'illustrer les formes des courbes obtenues pour l'accrochage des anticorps et celui du saturant (respectivement figures Fig. IV-6 et Fig. IV-7), les réponses fréquentielles des capteurs sont représentées de manière normalisée, chacune par rapport à l'amplitude finale de la variation de fréquence (100%). Les valeurs des amplitudes seront indiquées sous la forme d'une moyenne et d'un écart-type.

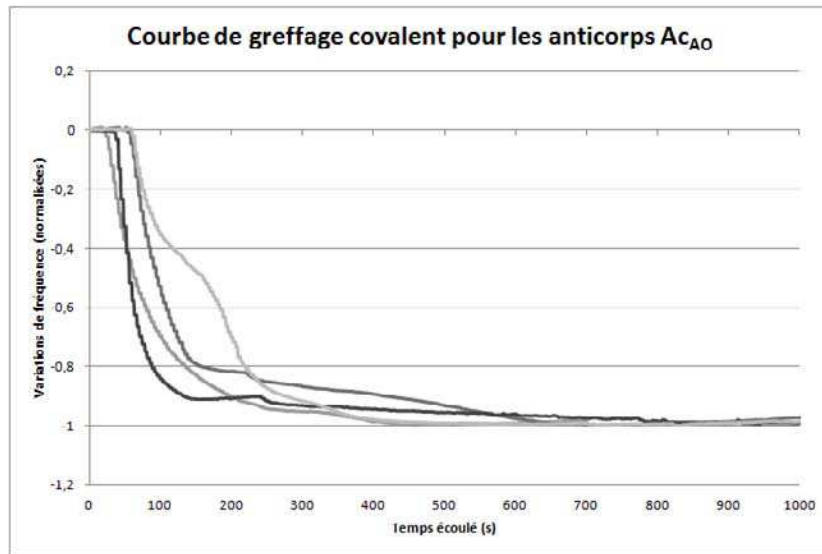


Fig. IV-6: Variations de fréquence normalisées par rapport à l'amplitude de la variation de fréquence pour le greffage des anticorps anti-acide okadaïque.

Lors du greffage des anticorps anti-acide okadaïque sur la couche GPTS, la variation de fréquence est en moyenne de  $-7,4 \text{ kHz} \pm 23\%$ . L'accrochage des molécules constituant le SBBB à la surface du capteur provoque une variation de fréquence de  $-1,8 \text{ kHz} \pm 24\%$  en moyenne.

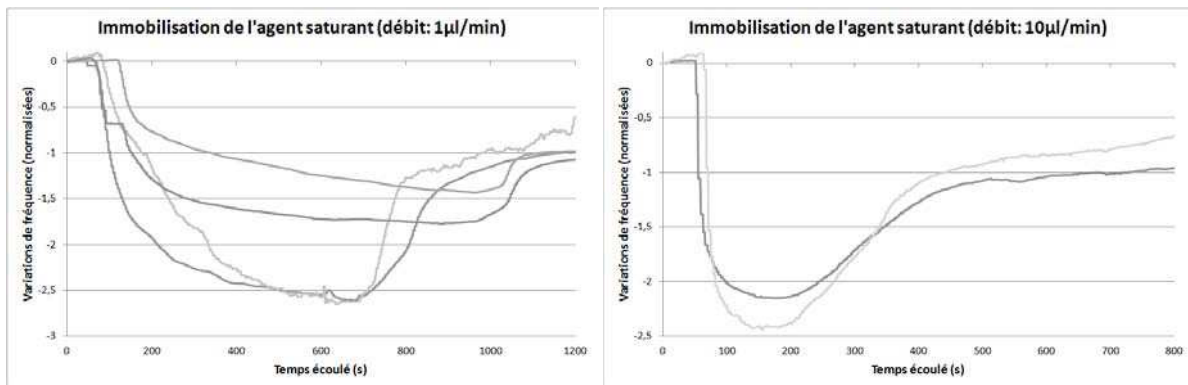


Fig. IV-7: Variations de fréquence normalisées par rapport à l'amplitude de la variation de fréquence pour l'accrochage de l'agent saturant, à  $1 \mu\text{l}/\text{min}$  et  $10 \mu\text{l}/\text{min}$ .

Sur les courbes de la figure Fig. IV-7, il apparaît une diminution de fréquence au passage de l'agent saturant, suivie d'une remontée avant d'atteindre le régime permanent (stabilisation normalisée à 100 %), après 2 à environ 15 minutes selon le débit. Cette remontée apparaît sur les courbes à  $1 \mu\text{l}/\text{min}$  alors même que la solution de saturant circule encore dans la chambre microfluidique. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le balayage



des molécules, faiblement liées à la couche sensible, sous l'effet de la circulation du fluide. La stabilisation complète de la fréquence apparaît environ 5 minutes après l'injection à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , et en 15 minutes à 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

La grande variabilité obtenue sur les réponses précédentes nous a amenés à rechercher une méthode fiable de discrimination de nos capteurs. Le but était de trouver un paramètre représentatif du capteur, possédant une bonne reproductibilité, comme indicateur de la qualité du capteur en vue des étapes de détection. Le paramètre retenu ( $T_{xA}$ ), est calculé à partir des variations de fréquence au passage des anticorps ( $\Delta f_A$ ) et de l'agent saturant ( $\Delta f_S$ ) selon la formule suivante:

$$T_{xA} = \Delta f_A / (\Delta f_A + \Delta f_S) \quad (\text{Equ. IV-1})$$

En première approximation, en considérant une réponse globale du capteur due à un effet de masse surfacique, le calcul de ce paramètre correspond à estimer un taux de recouvrement massique de la surface fonctionnalisée (GPTS) en anticorps. Les valeurs élevées obtenues avec une bonne reproductibilité ( $80 \pm 5 \%$ ), nous ont permis de mieux contrôler la qualité de greffage des anticorps, par rapport aux paramètres bruts  $\Delta f_A$  et  $\Delta f_S$  (Fig. IV-8), et de discriminer quelques capteurs susceptibles de présenter une réponse non satisfaisante.

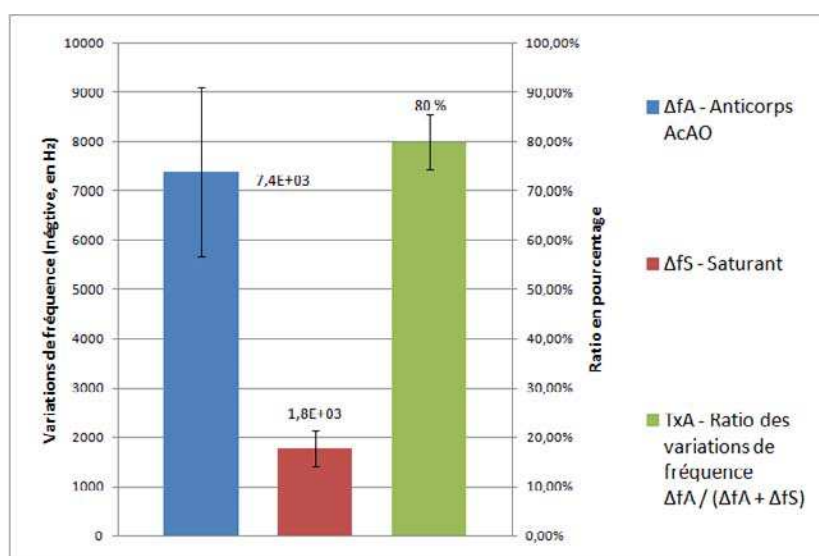


Fig. IV-8: Variations de fréquence et écarts types pour les anticorps, l'agent saturant et le taux de recouvrement d'anticorps.

En incluant les temps de stabilisation, la préparation de la couche immuno-sensible dure environ 20 minutes en fixant le débit à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

#### IV.1.B) Détection de l'acide okadaïque (phycotoxine DSP)

##### IV.1.B.1. Protocole de détection par méthode sandwich

Directement après l'étape de préparation de la couche immuno-sensible, 20  $\mu\text{l}$  d'acide okadaïque (2  $\mu\text{g}$ ) sont injectés sur la ligne à retard de test, tandis que 20  $\mu\text{l}$  de 6xhistidine (2  $\mu\text{g}$ ) sont injectés sur la ligne de contrôle. La concentration résultante dans les cônes d'entrées est de 28  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour les deux lignes. Le débit, préalablement réduit à 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ , permet à ces particules de petites tailles d'être collecter à la surface du capteur (Fig. IV-9a, cf. Fig. III-8).

Ni l'acide okadaïque, ni la 6xhistidine n'ont été directement détectées avec des variations de fréquences significatives. Ceci est dû en partie à leur faible poids moléculaire de 800 Daltons (Da) contre 140 kilo Daltons (kDa) pour une molécule d'immunoglobuline de type G (IgG). Cependant, la formation des complexes antigéniques ( $\text{Ac}_{\text{AO}} / \text{AO}$ ) peut être révélée par une seconde injection d'anticorps polyclonal  $\text{Ac}_{\text{AO}}$ . En effet; un paratope différent pourrait s'accrocher à un autre épitope de l'AO, comme dans un test ELISA sandwich (Fig. IV-9b). Le passage du second anticorps a été réalisé soit à 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ , soit à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

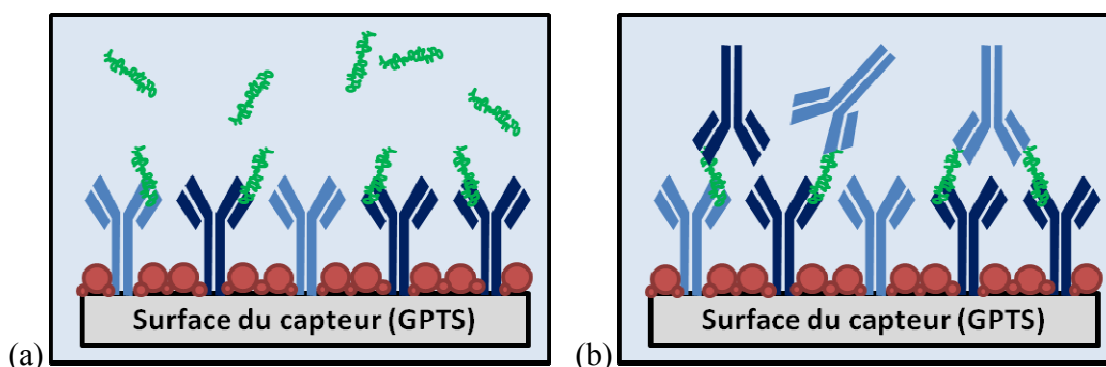


Fig. IV-9: Description schématique du protocole de détection de l'acide okadaïque. (a) Immobilisation de l'acide okadaïque par les anticorps immobilisés. (b) Immobilisation du second anticorps par un autre épitope de l'acide, resté libre.

#### IV.1.B.2. Réponse du capteur à la seconde injection de l'anticorps

La figure Fig. IV-10 représente les réponses en variations de fréquences typiques associées à la dernière phase du protocole (Fig. IV-9b), durant l'injection de l'anticorps polyclonal Ac<sub>AO</sub> pour révéler les AO immobilisés sur un capteur. Les variations de fréquences obtenues (6 expériences concluantes) sur les lignes de test sont significatives, de -1 à -4 kHz environ, comparées à l'injection précédente d'AO. Quoique peu reproductibles en valeurs absolues, leur comparaison à la ligne de contrôle respective permet de retrouver un même rapport de 3 ( $\pm 9\%$ ) pour les deux débits testés, 1 et 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

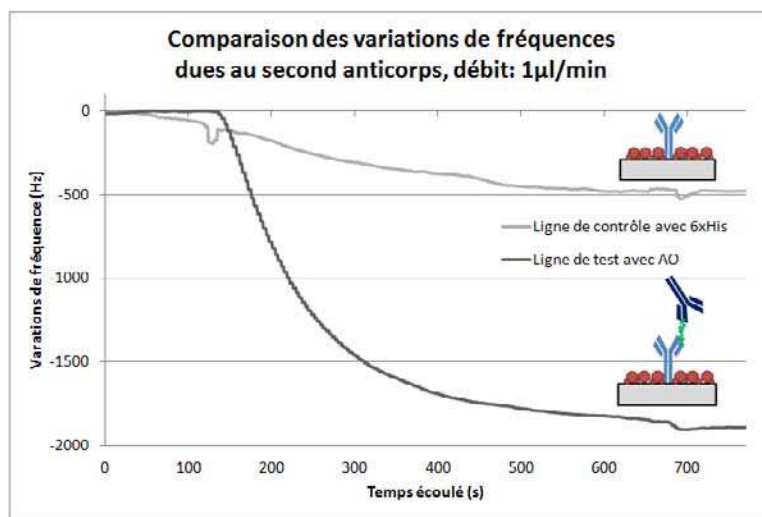


Fig. IV-10: Variations de fréquence à la seconde injection de l'anticorps, Ac<sub>AO</sub>.

Les fréquences se stabilisent au bout de 10 minutes lorsque le débit est de 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  (Fig. IV-10). A cette vitesse, la dynamique de stabilisation est très similaire aux expériences passées réalisées en milieu statique par l'équipe MDA de l'IMS. Dans ce cas particulier, la microfluidique prouve son intérêt dans l'amélioration de la qualité de la réponse en évitant notamment tout bruit lors du changement de liquide. À 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , la principale différence observée est une stabilisation légèrement plus rapide (3 à 5 minutes).

#### *IV.1.C) Interprétation et Seuil sanitaire*

Les contrôles prouvent que la variation de fréquence sur la ligne de test lors de la seconde injection de l'anticorps est à rapprocher de la formation de complexe antigène / anticorps avec l'acide okadaïque. L'amplitude totale et le rapport des variations de fréquences sur la ligne test, contenant l'acide okadaïque, et la ligne de contrôle restent significatifs et ne sont pas influencés par le débit.

Ceci démontre la faisabilité de détection de phycotoxines par capteurs à ondes acoustiques utilisant un protocole modifié du test ELISA sandwich. En comptant le temps de préparation de la couche immuno-sensible, les injections de phycotoxines et d'anticorps, ainsi que les temps de stabilisation entre chaque phase, la durée du test ne dépasse pas trois heures.

Notre méthode peut détecter de manière significative 2 µg d'acide okadaïque; une quantité moindre pourrait entraîner des réponses erronées (faux négatifs ou faux positifs). Pour savoir s'il y a contamination, il faut extraire les phycotoxines de la chair des coquillages. Cette étape, non réalisée dans le cadre de ces travaux, permet d'obtenir une solution concentrée en phycotoxines pour laquelle il est primordial de noter la quantité de chair utilisée.

La Food & Drug Administration (FDA) a fixé la concentration maximale en toxine de type DSP pour la vente à 20 µg d'acide okadaïque pour 100 g de chair de coquillages. Ainsi, un capteur capable de détecter 2 µg d'acide okadaïque, permettrait d'identifier un lot de coquillages contaminé à partir de 10 g de chair seulement, en supposant une efficacité d'extraction des phycotoxines de 100%, dans un volume de 20 µl. Pour une efficacité d'extraction moindre, la quantité de chair alors nécessaire sera plus importante.

## Partie IV.2 – Détection de l'acide domoïque (ASP)

### *IV.2.A) Préparatifs pour la détection de l'acide domoïque*

#### IV.2.A.1. Retour sur la problématique du projet ASCOBAR

Les tests avec l'acide okadaïque ont démontré la faisabilité de détection de petites particules, comme les phycotoxines, à l'aide de notre plateforme à ondes acoustiques de Love. Le volet microcapteur du projet ASCOBAR a axé ses efforts sur la détection de l'acide domoïque et ses phycotoxines associées. Ce choix est justifié par l'efficacité de détecter une famille de phycotoxines plutôt qu'une seule variante, et par la nécessité de sélectionner une molécule simple pour faciliter la synthèse de l'haptène nécessaire à la fabrication d'anticorps de reconnaissance (cf. IV.2.A.2).

Le long travail de synthèse du mimotope, partie de l'antigène mimant la partie commune des phycotoxines d'une même famille, a été réalisé dans le cadre des travaux de thèse d'Etienne BACO du laboratoire de l'Institut des Sciences Moléculaire (ISM) (E. Baco, Synthèse d'haptènes de phycotoxines pour l'élaboration d'un immunocapteur, Thèse n° d'ordre: 4260, Université Bordeaux 1, 2011). L'haptène, composé du mimotope et d'un bras espaceur (Fig. IV-12) assurant la liaison à une molécule plus grosse de Bovine Serum Albumine (BSA, ~66 kDa), fut injecté par voie intraveineuse dans des lapins pour provoquer une réaction immunitaire. Les anticorps ainsi fabriqués ont été purifiés, déplétés, testés puis mis à notre disposition pour être utilisés sur la plateforme à ondes acoustiques.

Avant de décrire les tests de détection, et afin de permettre une meilleure lecture de leur description et de l'analyse des résultats obtenus, les principaux éléments relatifs à la synthèse de l'haptène, la fabrication et la caractérisation des anticorps doivent être présentés.

### IV.2.A.2. Synthèse de l'haptène

L'acide domoïque et ses dérivés (Fig. IV-11a), comme toutes les petites molécules d'un poids inférieur à 1kDa, ne sont pas immunogènes, c'est-à-dire que leur injection dans un organisme receveur ne provoque pas de réaction immunitaire permettant la création d'anticorps. Pour fabriquer des anticorps dirigés contre cette famille de phycotoxines, la démarche retenue a été de synthétiser un substitut chimique d'une partie commune à l'acide domoïque et ses dérivés. Cette molécule pourra ensuite être couplée à une protéine d'un poids moléculaire suffisant afin d'être détecté par le système immunitaire. Cet analogue synthétique est appelé un mimotope.

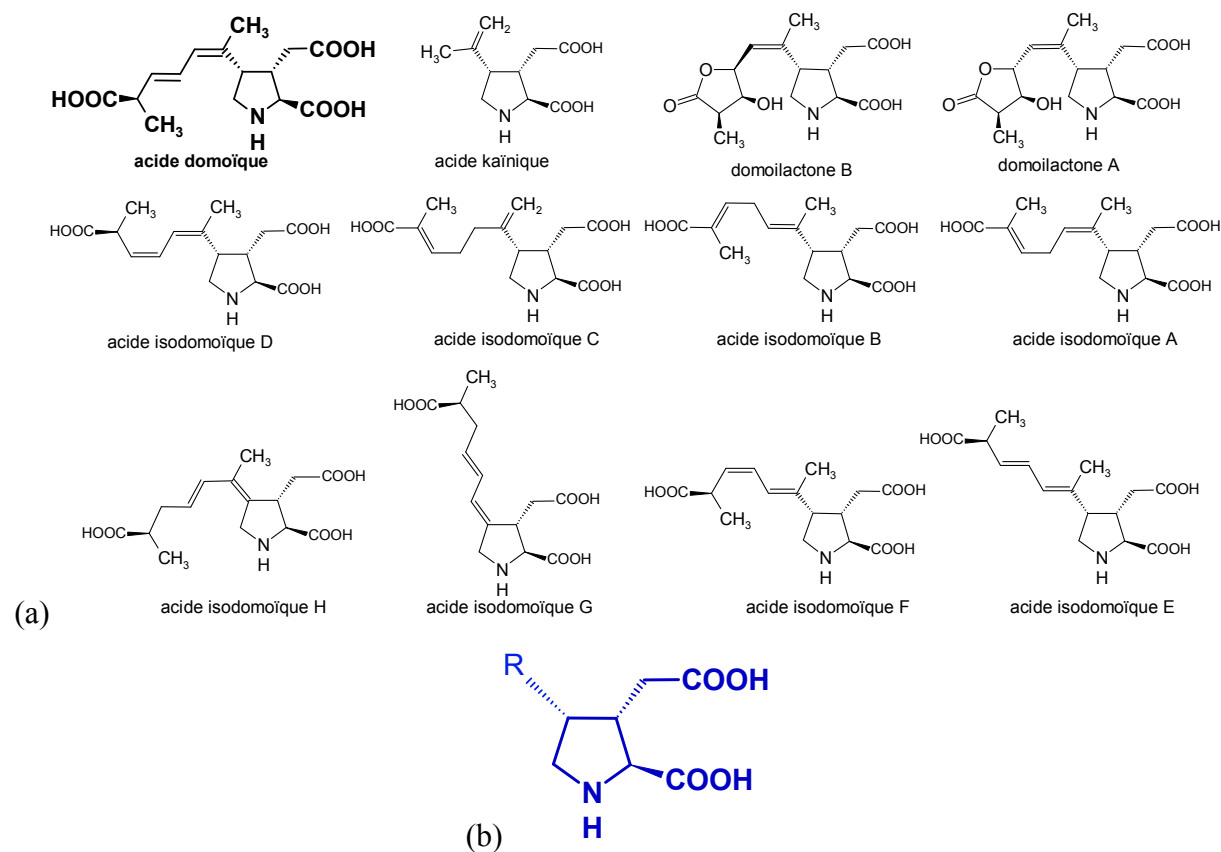


Fig. IV-11: (a) Structure chimique de l'acide domoïque et dérivés. (b) Partie commune des toxines (mimotope) [Bac11].<sup>1</sup>

<sup>1</sup> [Bac11] E. Baco, Synthèse d'haptènes de phycotoxines pour l'élaboration d'un immunocapteur, Thèse N° 4260, Université de Bordeaux 1, 2011.

Dans un premier temps, une fois la partie commune à la famille des ASP identifiée (Fig. IV-11b), un schéma de rétro-synthèse est proposé pour la fabrication de l'haptène (Fig. IV-12). Il permet de visualiser les étapes successives de réactions chimiques (décrites dans la littérature) et de savoir à partir de quel composé, disponible sur le marché, la synthèse peut débuter.

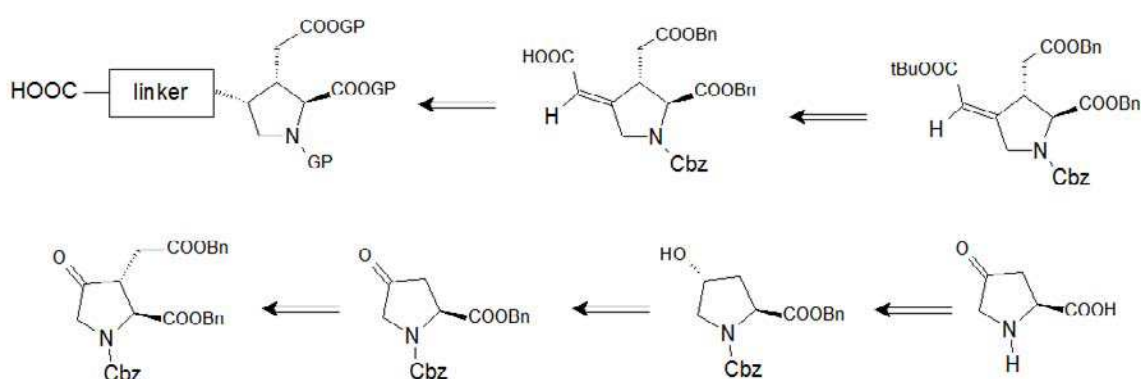


Fig. IV-12: Schéma de rétro-synthèse global de l'haptène [Bac11].

Sur ce schéma, des groupes benzyles et benzyloxy carbonyles, le chloroformate de benzyle (Cbz) et le bromure de benzyle (Bn), sont utilisés pour protéger les fonctions acides et amines. La molécule de départ, la *trans*-4-hydroxy-*L*-proline (Sigma Aldrich, réf: H54409), a été choisie pour son analogie structurale avec le mimotope retenue.

Un bras espaceur apparaît en dernière étape (linker, ~170 Daltons), destiné à relier le mimotope à une protéine de BSA. La molécule résultante du couplage de l'haptène à la BSA est ainsi assez grosse pour déclencher une réaction immunitaire une fois injecté au lapin. L'espacement avec la BSA est nécessaire pour que le mimotope soit "visible" par le système immunitaire. Sans l'espaceur, les anticorps fabriqués ne seraient dirigés qu'envers la BSA, 400 fois plus grosse.

### IV.2.A.3. Fabrication et caractérisation des anticorps

L'haptène, couplé à la BSA, est injecté dans plusieurs lapins en deux fois, avec un rappel, avec ou sans adjuvants. Cette étape de fabrication a une durée de 4 à 5 mois. Après la période d'immunisation du lapin, les anticorps sont récupérés par saignée dans des solutions appelées "sérum". Un premier test ELISA (Fig. IV-13) est effectué pour contrôler le pouvoir antigénique des différentes solutions de sérum en les comparant à celui d'avant l'injection de l'haptène (sérum pré-immun obtenu par simple prélèvement sanguin). Les tests biochimiques qui suivent ont été réalisés au Laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie (LIP) par Maria Mamani-Matsuda, post-doctorante qui a rejoint le projet en 2009 (figures Fig. IV-13 à Fig. IV-15).

Pour effectuer ce test, les antigènes cibles sont tout d'abord immobilisés aux parois des puits de tests. Ces antigènes doivent être accessibles aux anticorps et seuls les anticorps à titrer doivent se fixer aux parois (via la formation de complexes antigéniques); c'est donc l'haptène qui a été utilisé, couplé à une thyroglobuline au lieu de la BSA, prévenant ainsi des faux-positifs induits par les anticorps anti-BSA.

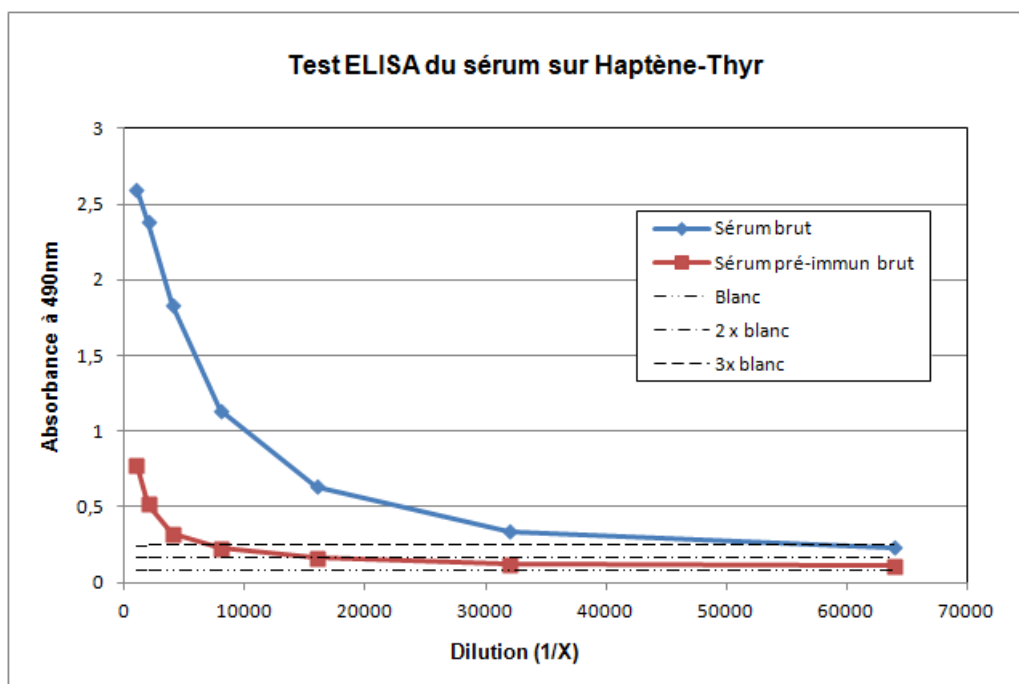


Fig. IV-13: Résultat du test ELISA Anti-haptène-thyroglobuline.



Ce test compare les absorbances des solutions de sérum pré- et post- immuns à différentes dilutions. Le niveau pour le sérum antigénique est plus élevé que celui du pré-immun. Même aux dilutions les plus élevées, le signal reste supérieur à trois fois le niveau du "blanc", représentant la réponse d'un puits sans antigène.

Comme les lapins ont été immunisés avec un couplage haptène-BSA, il est probable qu'ils aient également fabriqué des anticorps dirigés contre la BSA. Le test suivant (Fig. IV-14) vise à déterminer la proportion d'anticorps anti-BSA dans un sérum post-immun.

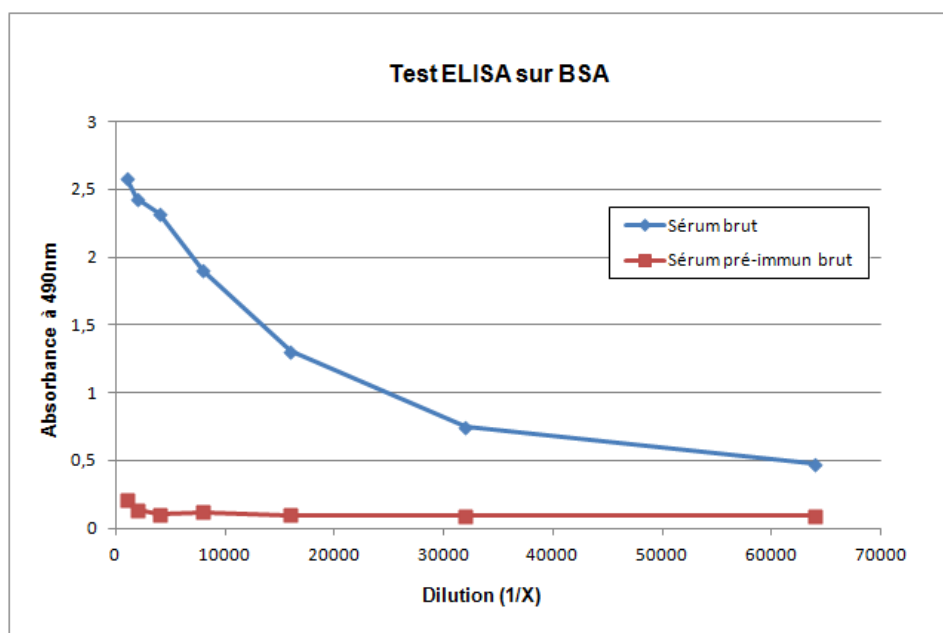


Fig. IV-14: Résultat de test ELISA anti-BSA.

Ici aussi, le signal du sérum après injection est plus élevé que celui avant injection. Cela signifie qu'il y a tout autant, voire plus, d'anticorps dirigés contre la BSA que contre l'haptène.

De la même manière, les solutions de sérum extraites des lapins contiennent d'autres anticorps dirigés contre les molécules que leur système immunitaire a rencontrées pendant la période d'immunisation. La purification du sérum permet de filtrer les protéines, par une chromatographie, ne gardant que les Immunoglobuline de type G (IgG). Une autre étape, la

déplétion, permet de retirer les IgG anti-BSA à l'aide de billes magnétiques auxquelles sont attachées des molécules de BSA.

La figure suivante (Fig. IV-15) compare les différentes réponses de test ELISA à l'haptène-thyroglobuline pour le sérum brut, le sérum déplété des anti-BSA, les IgG seuls et les IgG seuls déplétés des anti-BSA. Ces quatre solutions viennent du même sérum de lapin.

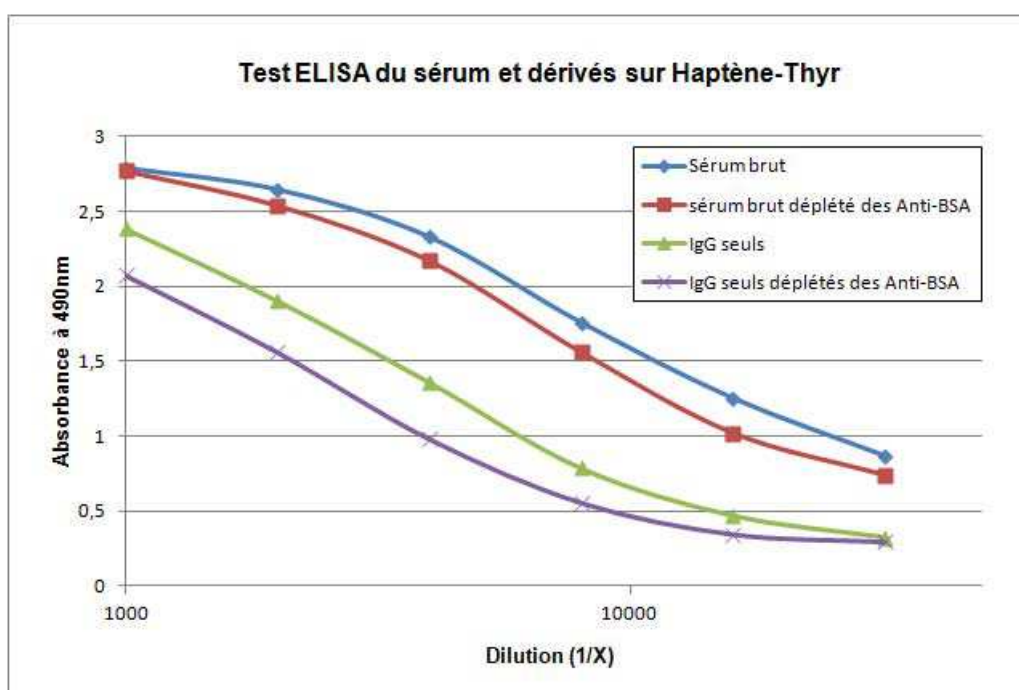


Fig. IV-15: Résultats des tests ELISA avec coating haptène-thyroglobuline.

La révélation se fait à l'aide d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à une peroxidase (HRP). La réponse à l'absorbance diminue à chaque étape de purification. En effet, des accroches non-spécifiques d'anticorps sur la plaque de test peuvent provoquer une augmentation du signal pour les solutions les moins pures. Toutefois, la solution d'IgG purifiée et déplétée des anti-BSA présente une bonne titration; c'est donc cette solution, concentrée en anticorps spécifiques anti-acide domoïque (Ac<sub>AD</sub>), qui sera utilisée pour fonctionnaliser notre capteur. Sa concentration est typiquement de 400 µg/ml ou un peu moins selon le sérum utilisé.

#### IV.2.B) *Détection d'acide domoïque par la plateforme*

##### *acoustique à ondes de Love*

Le but est d'obtenir une réponse significative à une détection d'une quantité connue d'acide domoïque libre par rapport à un contrôle effectué simultanément.

#### IV.2.B.1. Particularité pour la détection de l'acide domoïque

Premièrement, le seul ajout de l'acide domoïque, comme pour l'acide okadaïque, ne pourrait pas provoquer de réponse significative du capteur. En effet, en considérant une quantité moyenne d'IgG greffée sur le capteur de 14 ng (cf. II.4.A.2), que deux acides domoïques peuvent être accrochés à un anticorps (deux paratopes), et un rapport de poids moléculaire AD / IgG d'environ  $2,14 \cdot 10^{-3}$ , il faudrait 60 pg pour saturer les sites récepteurs des anticorps immobilisés en surface du capteur. Cette quantité, comparée à la variation de fréquence lors du greffage des anticorps (cf. Fig. IV-19), n'engendrerait seulement que 22 Hz de variation de fréquence, difficilement différenciable du bruit.

Deuxièmement, les anticorps produits ( $Ac_{AD}$ ) auront peu d'espace pour se lier à l'acide domoïque si celui-ci est déjà fixé à un autre anticorps; la partie mimotope de l'haptène, vers laquelle les anticorps sont dirigés, semble être trop petite, d'un point de vue encombrement stérique, pour être accrochée à deux anticorps simultanément. De plus, il est probable que l'acide domoïque disparaisse presque entièrement dans le paratope (site d'accroche). En effet, une molécule d'acide domoïque a une longueur d'environ  $3,2 \times 10^{-9}$  m contre  $\sim 20 \times 10^{-9}$  m pour l'anticorps (cf. tableau du III.2.B.3). Une fois le complexe antigénique formé entre l'acide domoïque et l'anticorps, il ne pourra donc pas être révélé par un second passage d'anticorps.

Des tests préliminaires ont été effectués pour vérifier la possibilité d'accrochage, entre l'acide domoïque et ses anticorps spécifiques, en milieu microfluidique. Le couplage acide

domoïque-thyroglobuline (AD-Thyr) a été utilisé de façon à augmenter la réponse du capteur lors de cet accrochage.

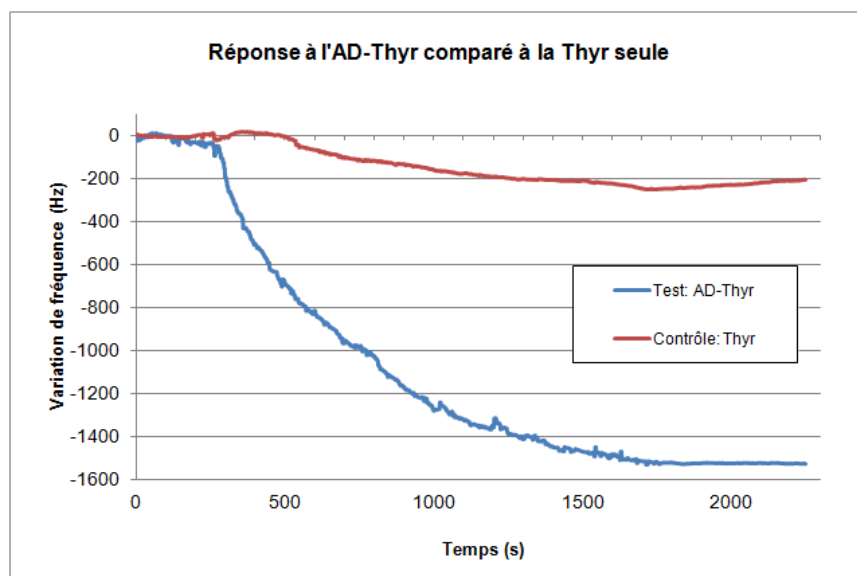


Fig. IV-16: Variations de fréquences au passage de l'acide domoïque-thyroglobuline (AD-Thyr) et de la thyroglobuline seule (Thyr). Le taux de greffage en anticorps était de 93% et 92,5% pour la ligne de test et de contrôle, respectivement.

Cette forte variation de fréquence (Fig. IV-16) est à corrélérer avec le fort poids moléculaire de la thyroglobuline (660 kDa). Cette protéine étant près de 6 fois plus grosse qu'un anticorps, il est fort probable que plusieurs acides domoïques y soient couplés.

#### IV.2.B.2. Préparatif et Protocole

Le schéma suivant (Fig. IV-17) représente les principales étapes du protocole utilisé pour la détection de l'acide domoïque, et détaillé en Annexe 3. La détection de l'AD se fait indirectement à l'aide de l'AD-Thyr et de manière compétitive. La ligne de test est fonctionnalisée avec des anticorps  $AC_{AD}$ , dont certains paratopes accueillent déjà des molécules d'acide domoïque de la solution d'analyse (Fig. IV-17a). La ligne de contrôle est fonctionnalisée avec des anticorps non pré-mélangés, laissant l'ensemble des sites antigéniques non occupés. Une étape de saturation est ensuite assurée sur les deux lignes (Fig. IV-17b).

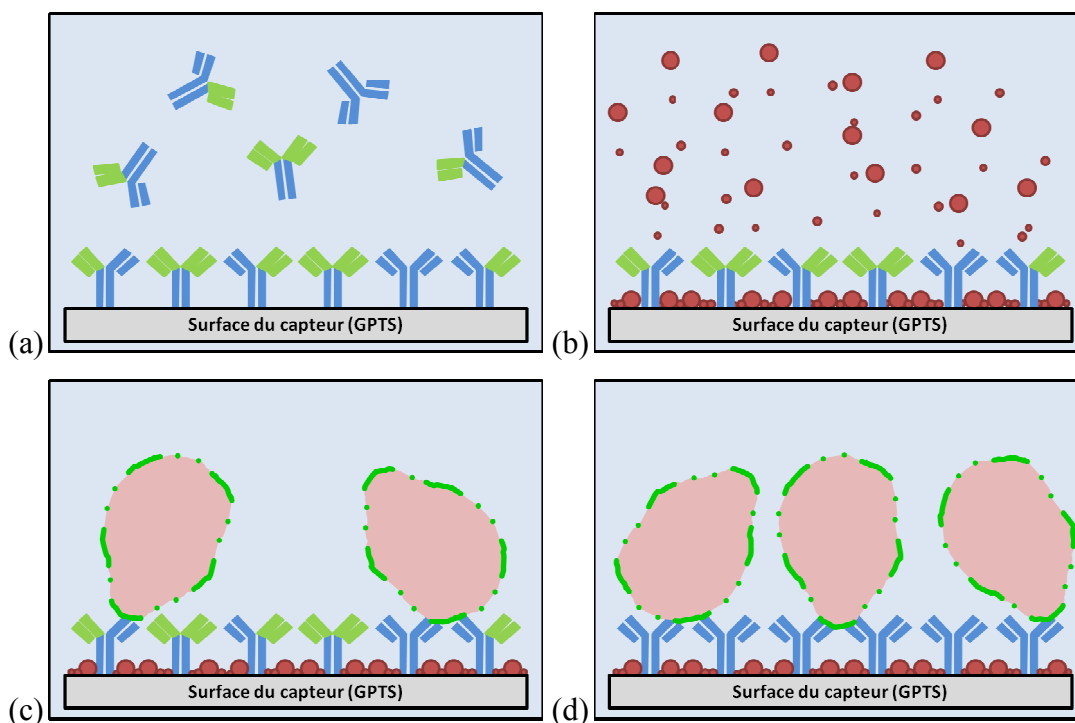


Fig. IV-17: Description schématique du protocole de détection de l'acide domoïque au niveau de la surface de capteur.

- (a) Greffage des anticorps sur la surface du capteur. Les paratopes bloqués par une molécule d'AD sont coloriés en vert.  
 (b) Saturation de la couche d'accroche par le SBBB. (c) Ligne de test: accroche de l'AD-Thyr sur les paratopes restés libres.  
 (d) Ligne de contrôle; tous les épitopes des anticorps sont libres pour accrocher l'AD-Thyr.

Une solution d'AD-Thyr est alors injectée sur les deux lignes. Seuls les sites antigéniques encore non occupés par l'acide domoïque de la solution d'analyse pourront immobiliser l'AD-Thyr (Fig. IV-17c), induisant ainsi une variation de fréquence moins importante que celle de la ligne de contrôle (Fig. IV-17d).

Pour favoriser une mise en contact des molécules d'acide domoïque libres de l'échantillon test avec les anticorps, nous avons choisi de les pré-mélanger mécaniquement avant de les injecter sur le capteur. Un agitateur mécanique de type vortex (plaque vibrante) a été utilisé dans le but d'augmenter les chances de formation de complexes antigène / anticorps.

Pour valider le principe de la détection avec le protocole proposé, la quantité d'AD (200 ng) a été déterminée avec l'objectif de saturer les sites de liaisons (paratopes) des anticorps, en vue d'inhiber totalement la réponse de la ligne de test à l'AD-Thyr. Ces anticorps étant des immunoglobulines de type G (IgG), leur poids moléculaire est de 140 kDa contre 0,3 kDa pour l'acide domoïque. Pour effectuer un mélange efficace, un volume de 60 µl est nécessaire. A une concentration initiale de 400 µg/ml (cf. IV.2.A.3), cela correspond à 24 µg d'anticorps, soit  $103 \times 10^{12}$  molécules (avec 1 Da correspondant à  $1,67 \times 10^{-24}$  g). Chaque IgG possédant 2 paratopes, il faudrait alors  $206 \times 10^{12}$  molécules d'AD, soit une quantité de 103 ng, pour bloquer tous les sites récepteurs des anticorps; cette quantité d'AD a été doublée pour tendre vers la saturation des anticorps en solution. Après une agitation mécanique de 40 minutes, la solution obtenue contient des anticorps sur lesquels sont fixés des molécules d'acide domoïque ( $Ac_{AD+AD}$ ).

Selon cette méthode de détection par compétition, plus il y a d'anticorps inhibés par l'acide domoïque lors du pré-mélange, moins forte sera la variation de fréquence sur la ligne de test ( $\Delta f_{MEL}$ ). La ligne de contrôle, quant à elle, définit la variation de fréquence maximum ( $\Delta f_{NMEL}$ ), car tous les anticorps sont libres pour fixer l'AD-Thyr. Le pourcentage d'inhibition ( $TAUX_{Inhib.}$ ) est alors défini par la formule suivante:

$$TAUX_{Inhib.} = (\Delta f_{NMEL} - \Delta f_{MEL}) / \Delta f_{NMEL} \quad (Equ. IV-2)$$

### IV.2.B.3. Variations de fréquence et Comparaison des résultats

#### a. Greffage de la couche sensible

Comme pour la détection de l'acide okadaïque, les variations de fréquences dues à l'effet de masse induit par les anticorps (pré-mélangés ou non) et l'agent saturant, normalisées par rapport à l'amplitude maximale de la variation, sont présentées sur la figure Fig. IV-18. Le

débit, fixé à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , permet une collecte partielle suffisante en un minimum de temps (cf. III.2.B.3).

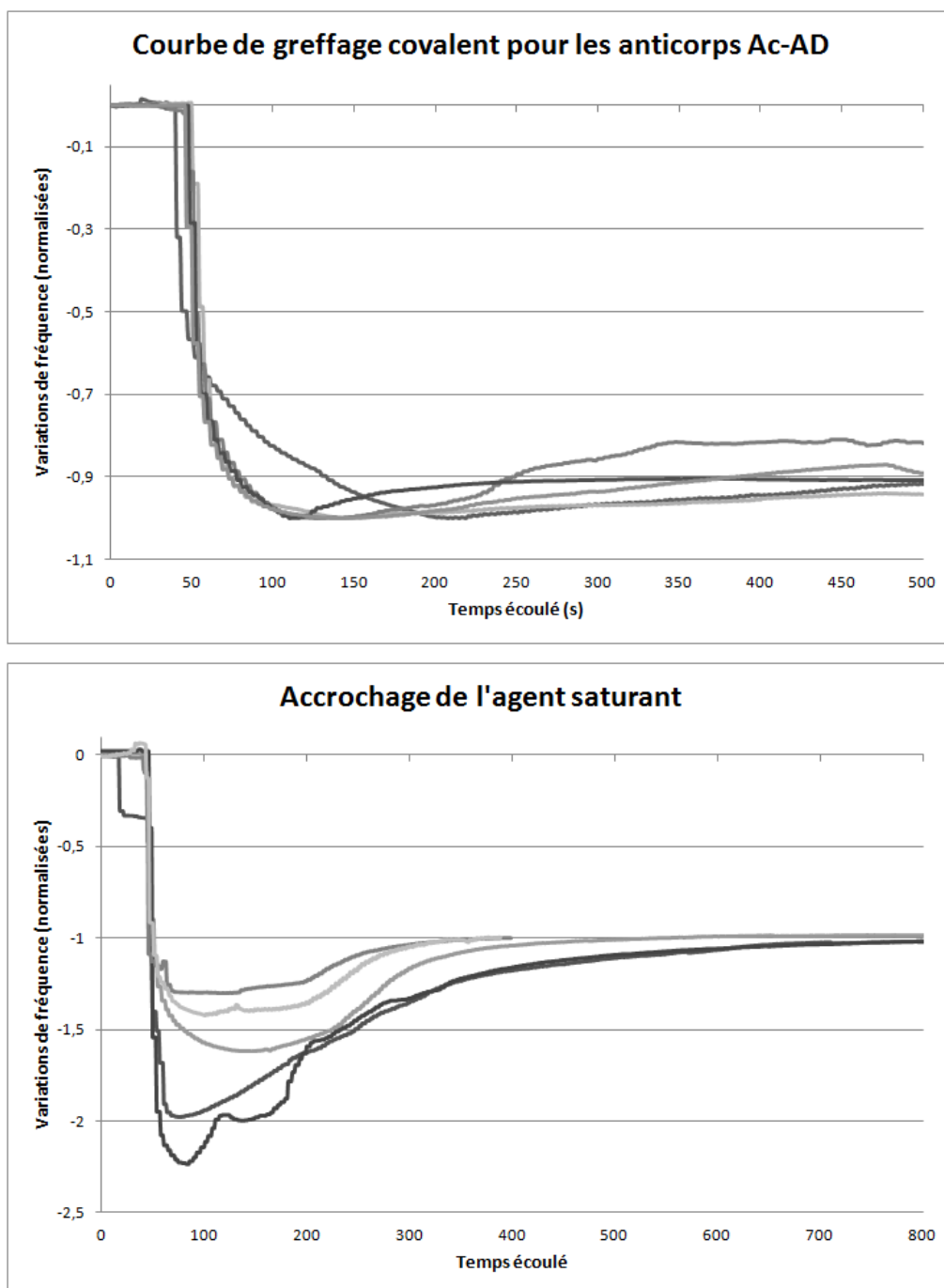


Fig. IV-18: Variations de fréquence normalisées par rapport à l'amplitude de la variation de fréquence pour le greffage des anticorps anti-acide domoïque et l'accrochage de l'agent saturant. Remontée: 5 min ( $\pm 1$  min) après injection à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

Ici encore, les variations de fréquence induites par les anticorps ( $\Delta f_A$ ) et par l'agent saturant ( $\Delta f_S$ ) ne sont pas reproductibles d'un capteur à l'autre (Fig. IV-19): les valeurs et écarts-types obtenus sont de  $-5,3 \text{ kHz} \pm 20\%$  pour l'Ac<sub>AD</sub> et de  $-2,0 \text{ kHz} \pm 30\%$  pour le SBBB. Il faut noter qu'aucune distinction ne peut être faite à cette étape entre les anticorps pré-mélangés et non pré-mélangés. Ceci était prévisible du fait du très petit changement de masse entre ces deux éléments.

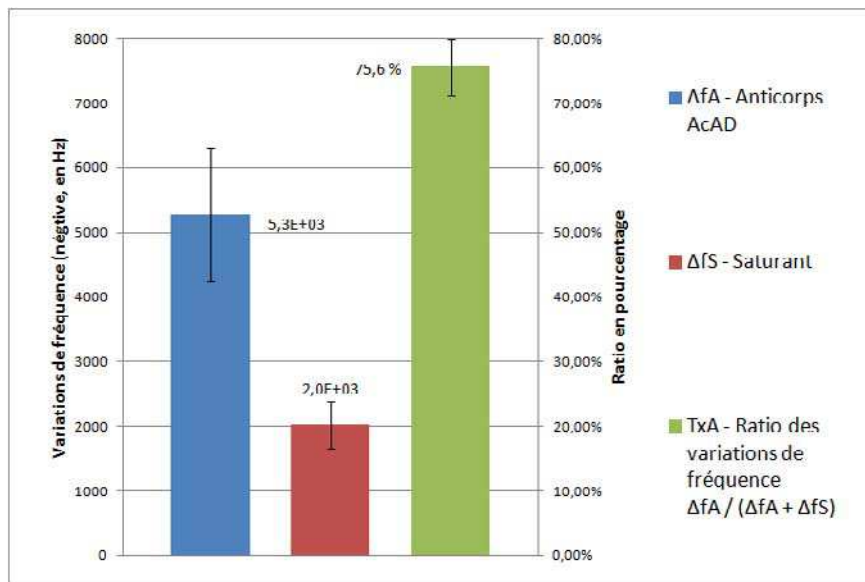


Fig. IV-19: Variations de fréquence et écarts types pour les anticorps Ac<sub>AD</sub>, l'agent saturant et le taux de recouvrement d'anticorps.

Le taux de recouvrement d'anticorps Tx<sub>A</sub>, calculé comme précédemment (équation IV-1), est de  $75,6 \pm 4 \%$ . Le taux de recouvrement ainsi calculé pour l'anticorps Ac<sub>AD</sub> est légèrement inférieur à celui de l'Ac<sub>AO</sub>.



## b. Etape de compétition à l'acide domoïque-thyroglobuline

Après saturation de la surface du capteur, une solution de 20  $\mu\text{l}$  contenant 2  $\mu\text{g}$  d'AD-Thyr est injectée dans les 50  $\mu\text{l}$  de TBS de chaque cône d'entrée (concentration résultante de 28,5  $\mu\text{g/ml}$  en supposant une homogénéisation dans le cône). Le débit est réduit à 1  $\mu\text{l/min}$ . La figure Fig. IV-20 montre la réponse du capteur induite par l'accrochage de cette molécule aux anticorps spécifiques, comme décrit dans les schémas des figures Fig. IV-17c et Fig. IV-17d.

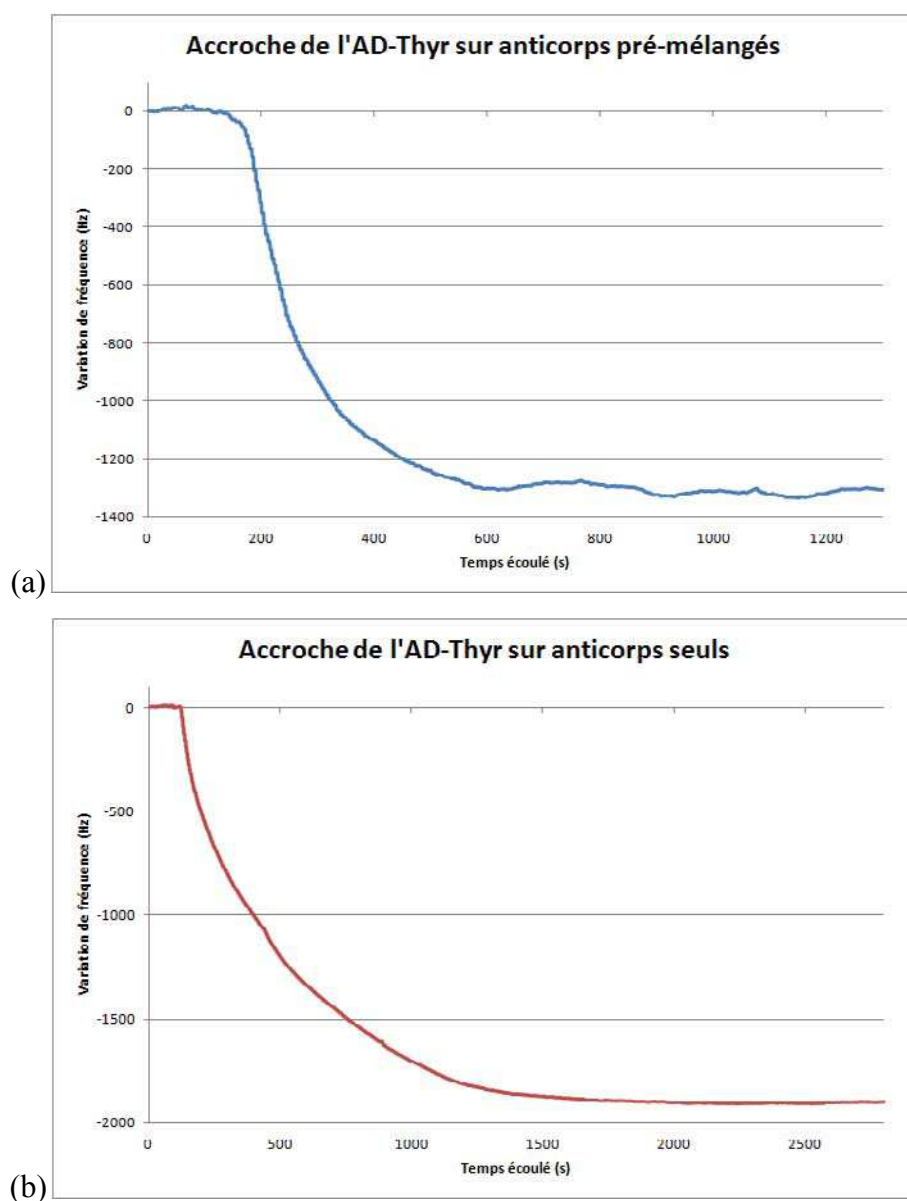


Fig. IV-20: Courbes de réponse à l'étape de compétition avec l'AD-Thyr sur la ligne de test (a) et la ligne de contrôle (b).

La variation de fréquence lors de l'injection de l'AD-Thyr sur des anticorps non pré-mélangés est en moyenne de -1,7 kHz. Toutefois, cette diminution de fréquence n'est pas la même d'un capteur à l'autre ni même d'une expérience à l'autre. C'est pourquoi ce contrôle doit être ré-effectué à chaque fois et simultanément au test.

Le tableau ci-après représente les résultats obtenus pour l'expérience représentée en figure Fig. IV-20:

	Réponses aux anticorps	Réponses au saturant	Taux de recouvrement	Réponses à l'AD-Thyr
Ligne de test, Anticorps mélangés avec AD	-4,5 kHz	-2,5 kHz	64%	-1,3 kHz
Ligne de contrôle, Anticorps seuls	-3,4 kHz	-1,5 kHz	69%	-1,9 kHz

Tab. IV-1: Tableau d'analyse de la réponse du test de détection de l'acide domoïque.

Dans ce cas, le pré-mélange induit une baisse de 25% de signal sur la ligne de test par rapport au contrôle lors de la dernière étape de l'expérience, calculé selon l'équation IV-2. Bien que ces expériences de détection de l'acide domoïque ne furent réalisées qu'un nombre limité de fois, elles ont toutefois montré une inhibition entre 25 et 36 % sur 3 expériences concluantes. Ces résultats encourageants mériteraient cependant une campagne d'expériences plus poussée qui n'a pas pu être effectuée dans le cadre de ces travaux.

### c. Analyse des résultats

Sur ces résultats, la baisse de signal due à l'injection d'AD-Thyr sur la ligne de test n'est que de 30% en moyenne par rapport à la ligne de contrôle, indiquant une saturation incomplète des anticorps pré-mélangés. Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de cela :

- L'étape de pré-mélange est délicate et il est probable que certains anticorps n'accrochent qu'une seule molécule d'acide domoïque voire aucune. De ce fait, tous les anticorps greffés sur le capteur ne sont pas nécessairement saturés en acide domoïque (Fig. IV-17a).
- La liaison anticorps / antigène du complexe immunitaire n'est pas permanente. Même dans des conditions fluidiques statiques, ces liaisons se font et se défont. Ainsi, des molécules préalablement accrochées aux anticorps pré-mélangés ont pu se détacher. Le courant étant continu, ces molécules ont pu quitter la chambre microfluidique sans pouvoir se lier à nouveau à un autre anticorps.
- Comme illustré sur la figure Fig. IV-17c, la molécule d'AD-Thyr utilisée pour la compétition ne nécessite qu'un paratope de libre pour pouvoir s'accrocher au capteur et induire un effet de masse. Aussi, même avec une faible proportion de paratopes restés libres, l'AD-Thyr parviendra à s'accrocher.
- Parallèlement, l'AD-Thyr pèse près de 5 fois un anticorps IgG, aussi la réponse de la ligne de contrôle est limitée du fait de l'encombrement de l'AD-Thyr par rapport à la densité de paratopes disponibles (Fig. IV-17d). La réponse du capteur sur le contrôle est donc moins forte, diminuant ainsi la différence avec la variation de fréquence de la ligne test.

#### *IV.2.C) Détection au seuil sanitaire*

En considérant ce résultat de détection comme significatif (25 à 36 % d'inhibition obtenue avec 200 ng d'AD), et un seuil de vente définie par la FDA pour les toxines de types ASP de 2 mg d'AD pour 100 g de chair de coquillages, la quantité minimale de chair de coquillage à extraire pour détecter des toxines à ce seuil serait de 10 mg (avec une efficacité d'extraction de 100%).

Cette quantité de 10 mg de chair de coquillage est largement raisonnable par rapport au protocole sanitaire de détection de phycotoxines qui nécessite un échantillon représentatif d'un ensemble d'huîtres. En effet, plusieurs huîtres sont disséquées pour préparer la purée de chair de coquillages dont sont extraites les toxines. A titre indicatif, le poids minimal légal d'une huître pour sa commercialisation est de 30 g (calibre N°5, le plus petit). Avec un indice de remplissage minimal de 6,5%, la masse sèche d'une huître est de 1,95 g.

Pour conclure, notre plateforme à ondes acoustiques de Love semble pouvoir, grâce à ce protocole, détecter si le seuil de commercialisation est atteint, et ce à partir d'une faible quantité de chair de coquillage. Les prochaines étapes de développement de ce projet seraient:

- une optimisation encore plus avancée de la cellule microfluidique et de la fonctionnalisation de surface, par exemple pour limiter l'immobilisation d'espèces en dehors de la zone sensible, augmenter le taux de capture, ou encore augmenter la surface de capture par l'utilisation de matériaux poreux,
- l'intégration de l'étape du pré-mélange dans la puce microfluidique, en utilisant des réseaux microfluidiques aménagés à cet effet,
- l'amélioration de l'immunité aux perturbations non souhaitées, en particulier certains "à-coups" du pousse-seringue,
- la miniaturisation de la plateforme, en intégrant la partie chauffante et l'électronique d'oscillation,

- l'analyse temps-réel des courbes de réponse, en corrigeant la dérive à long terme et en calculant les taux de recouvrement d'anticorps.

De nouveaux protocoles de détection pourraient également sans doute être imaginés. Des efforts seront à produire à tous les niveaux pour augmenter la reproductibilité de l'expérience ainsi que la sensibilité, tant sur la réalisation du système que sur les protocoles utilisés, dont l'étape du pré-mélange reste mal contrôlée à ce jour.

## BILAN & PERSPECTIVES

La plateforme de détection à ondes acoustiques de Love précédemment décrite a été utilisée sur deux types de phycotoxines différentes: l'acide okadaïque, responsable d'empoisonnement par consommation de chair de coquillages provoquant des diarrhées, et l'acide domoïque, provoquant des amnésies (perte de mémoire immédiate). En plus d'anticorps spécifiques pour pouvoir les immobiliser, il a fallu prendre en compte leur géométrie et plus particulièrement leur taille.

L'acide okadaïque pourrait être détecté dans 10 grammes de chair avec le protocole élaboré. Cette molécule à faible poids moléculaire peut tout de même être immobilisée par des anticorps greffés en surface du capteur sous flux contrôlé. Même si cette accroche de provoque pas un effet de masse suffisant pour être détectée, le second passage de l'anticorps polyclonal induit une réponse significative par sa liaison avec l'autre épitope de l'acide okadaïque tel qu'il fût pressenti.

Ce test de détection avec des anticorps commerciaux, intéressant en soit, a permis de réaliser les premières mises au point en vue du test pour l'acide domoïque et des toxines associées.

Concernant les tests de détection de l'acide domoïque, le changement de taille de la phycotoxine et la nature différente des anticorps impliquaient une adaptation du protocole. Tous les acteurs du projet sur lequel nous étions réunis ont apporté leur contribution pour la résolution de ce problème. Les réponses obtenues à l'aide d'un test par compétition, avec un mélange préalable des anticorps avec l'échantillon contenant l'AD, semblent prometteuses.

La faisabilité de détection de l'acide domoïque semblant être établie, il reste à affiner et améliorer la procédure. L'étape de pré-mélange des anticorps spécifiques, développés dans le cadre du projet ASCOBAR, avec la phycotoxine à détecter, est cruciale. L'intégration de cette étape dans la puce de PDMS, avec un mélangeur microfluidique, assurerait une meilleure reproductibilité. Un protocole visant à définir la concentration de toxines présentes

dans l'extrait de chair de coquillage, à l'aide de différentes dilutions, reste à être élaboré et testé.

Au-delà des pistes d'améliorations envisagées en fin du paragraphe précédent (IV.2.C), la quantification d'acide réellement accroché en surface passera par l'amélioration de la reproductibilité des expériences et notamment de la couche sensible du biocapteur (cf. Fig. II-8).

Une première étape pourrait consister à utiliser les solutions sol-gel à base de silicium étudiées par Pascal Massé alors en post-doctorat à l'ISM au début de la rédaction de ces lignes. Ces solutions ont d'abord été déposées sur des dispositifs équipés d'une fine couche de  $\text{SiO}_2$ , pour assurer le guidage même de l'onde. Elles pourraient permettre de réduire la rugosité de surface du  $\text{SiO}_2$ : une couche sol-gel homogène de seulement  $0,15 \mu\text{m}$  d'épaisseur possède une rugosité de  $0,2 \text{ nm}$ . Composée de silicium, elle serait compatible avec la couche guidante et l'inter-couche chimique, répondant à l'exigence de continuité des couche (cf. II.3.A.4).

Le GPTS de cette inter-couche chimique pourrait être remplacé par le triméthoxy-(22-oxiranylméthoxy-docosyl)-silane développé par Duy Hai DINH au cours de sa thèse. Cette monocouche est mieux organisée que le GPTS et pourrait augmenter la reproductibilité.

La création d'un entrelacement autour des anticorps au niveau de la couche sensible pourrait également améliorer la sensibilité du capteur en améliorant le comportement élastique de ce film biorécepteur et ainsi le couplage de l'onde. Ceci pourrait être envisagé par des molécules avec des terminaisons oxiranes (oxyde d'éthylène), idéalement d'une longueur de l'ordre de quelques anticorps, créant des liaisons covalentes entre eux au niveau de leurs acides aminés (cf. Fig. II-7).

L'autre objectif de ces améliorations serait de permettre la modélisation théorique des résultats et de pouvoir exprimer la quantité de masse accrochée par analyse des courbes de détection.

## CONCLUSION GENERALE

La problématique conchylicole du Bassin d'Arcachon a entraîné la création de projets ambitieux en termes d'acteurs et de moyens. Divers spécialistes scientifiques ont été impliqués pour tenter de comprendre pourquoi et comment les huîtres et autres mollusques sont infectés, contaminés par du phytoplancton toxique.

Dans ce contexte, les laboratoires IMS, ISM et le LIP ont joint leurs connaissances pour développer une plateforme à ondes acoustiques pour la détection de phycotoxines. Le choix du capteur à ondes de Love s'est fait sur des critères de sensibilité, de facilité d'utilisation et de potentiel d'évolution. Une première étape de faisabilité concluante a permis de montrer la capacité de notre plateforme à détecter l'acide okadaïque.

Des anticorps ont été développés grâce au travail d'Etienne Baco. Il a pu synthétiser une nouvelle molécule dont une partie est commune aux phycotoxines de la famille des ASP, et la relier à une molécule de BSA par un bras espaceur pour lui conférer un pouvoir immunogène. Plusieurs solutions de sérum ont été récupérées par saignée des lapins inoculés. Elles ont été filtrées et déplétées pour en extraire des anticorps spécifiques. Les tests biochimiques préliminaires ont indiqué qu'elles étaient utilisables pour une immuno-détection d'acide domoïque et c'est le meilleur sérum qui a été utilisé pour la réalisation de la couche sensible du biocapteur.

La réalisation de la plateforme en elle-même a été suivie avec la même exigence; montrer la faisabilité d'une méthode impose de se placer dans les meilleures conditions. Les lignes à retard, les cellules de tests et l'électronique d'oscillation ont été sélectionnées et validées préalablement. La conception de la partie microfluidique de la plateforme a pris en compte les particularités de notre capteur et des espèces à détecter.



Les expériences de détection ont pu être réalisées sur deux types de phycotoxines. Il a été montré que la biodétection par ondes acoustiques est tout à fait réalisable avec notre protocole, en l'adaptant à la toxine à mesurer.

Les résultats obtenus sont plutôt satisfaisants mais restent qualitatifs, ne fournissant qu'une réponse tout-ou-rien. L'amélioration de notre plateforme vers un système quantitatif nécessitera une meilleure reproductibilité des couches constituant notre capteur, du système de transduction au biorécepteur, ainsi que des éléments associés (cellule microfluidique de contrôle du convoyage des espèces vers la surface, protocoles chimiques et biologiques utilisés) pour en faire un bon moyen complémentaire au test chimique maintenant de vigueur.

# ANNEXES

## Table des matières

1.	Nomenclature .....	138
2.	Toxicité de toxines communément rencontrées .....	140
3.	Protocoles expérimentaux .....	141
	Préparation du banc de mesure / montage des capteurs: _____	141
	Détection de l'acide okadaïque: _____	142
	Détection de l'acide domoïque: _____	143

## 1. Nomenclature

Liste non exhaustive des principaux sigles et acronymes utilisés:

6xhistidine (6xHis)	Molécule synthétisée à partir de six molécules d'histidine
Ac <sub>AD</sub>	Anticorps anti-acide domoïque
Ac <sub>AO</sub>	Anticorps anti-acide okadaïque
AD	Acide Domoïque
ADN / ARN	Acide DésoxyriboNucléique / Acide RiboNucléique
AD-Thyr	Acide domoïque couplé à la thyroglobuline
ANSES (ex-AFSSA)	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AO	Acide Okadaïque
AOAC	Association Of Analytical Communities
ASCOBAR	Apport SCientifique à la problématique Ostréicole du Bassin d'Arcachon, 2007-2009
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning
BSA	Bovine Serum Albumine
CFP	Ciguatera Fish Poisoning
CNRS	Centre National de Recherche Scientifique
D.O.	Densité Optique
Da (Dalton)	= 1,67.10 <sup>-24</sup> g
DSP	Diarrheic Shellfish Poisoning
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPOC (laboratoire)	Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drugs Administration
FEDER	Fonds Européen de Développement Régional
GPTS	(3-GlycidylPropyl) TriméthoxySilane
IDT	InterDigitated Transducer
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER
IgG	Immunoglobuline de type G
IMS (laboratoire)	Intégration du Matériau au Système
ISM (laboratoire)	Institut des Sciences Moléculaires
LAAS (laboratoire)	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes
L <sub>cc</sub>	Distance centre-à-centre
LCR	Laboratoire Communautaire de Référence
LIP (laboratoire)	Laboratoire d'Immunologie-Parasitologie
LNR	Laboratoire National de Référence
LOF (laboratoire)	Laboratory Of the Future

---

MDA (équipe)	Microsystèmes à Détection Acoustique
NSP	Neurologic Shellfish Poisoning
OSQUAR	OStréiculture et QUalité du milieu: approche dynamique du bassin d'Arcachon, 2009-2011
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
QCM	Quartz Crystal Microbalance
RRLA	Réseau de Recherche Littoral Aquitain
SAM	Self Assembled Monolayer
SAW	Surface Acoustic Wave
SBBB	StartingBlock Blocking Buffer
TBS	Tris Buffer Saline
Thyr	Thyroglobuline

## 2. Toxicité de toxines communément rencontrées

Le tableau ci-après exprime la concentration nécessaire à une toxine donnée pour provoquer la mort de la moitié des souris injectées (dose létale à 50%, DL50). Plus cette valeur est faible, plus la toxine est dangereuse.

<b>TOXINES (avec nombres de dérivés)</b>	<b>DL 50 SUR SOURIS (en µg/g)</b>
Acide domoïque (7)	120
Acide okadaïque	190
Brevetoxine	100-200
Saxitoxine (21)	9-11
Tetrotoxine	8-20
Ciguatoxine (8)	0,25-3,6
Venin du Taipan australien (serpent)	13
Venin de vipère commune	7000

### 3. Protocoles expérimentaux

#### *Préparation du banc de mesure / montage des capteurs:*

- Allumer le bac chauffant, l'alimentation générale, l'ordinateur, les fréquencemètres.
- Positionner un tube de 200 ml de solution tampon (TBS) dans le bac pour préchauffage.
- Insérer délicatement les capteurs (substrats) sur leur socle et visser la partie intermédiaire (avec contacts électriques).
- Régler la voie 1 de l'alimentation à 15V et augmenter la tension sur la voie 2 jusqu'à affichage de la fréquence de synchronisme des capteurs sur les fréquencemètres correspondants.
- Positionner la puce microfluidique en PDMS en s'aidant des épaulements, puis visser le capot par-dessus.
- Insérer un cône à l'entrée du circuit fluide de chaque ligne (au centre de la puce).
- Insérer une tubulure dans les sorties de la puce.
- Connecter une seringue (piston enfoncé au maximum) à l'extrémité de chaque tubulure.
- Injecter 200  $\mu$ l de TBS dans chaque cône d'entrée.
- Pour chaque ligne, tirer manuellement sur le piston de la seringue et contrôler si le niveau de liquide dans le cône baisse de manière continue et que l'oscillateur continue de fonctionner correctement (la fréquence diminue typiquement de quelques kilohertz en présence de liquide).
- Réinjecter 200  $\mu$ l de TBS dans chaque cône d'entrée.
- Positionner les seringues sur le pousse-seringue, de manière symétrique par rapport à la vis sans fin, en serrant d'abord les seringues puis les pistons.
- Démarrer le pousse-seringue de façon à aspirer 100  $\mu$ l à un débit de 100  $\mu$ l/min en surveillant la vitesse de baisse des niveaux de liquide dans chaque cône.
- Baisser le débit à 10  $\mu$ l/min et lancer le programme d'acquisition.

*Détection de l'acide okadaïque:*

- **Ligne de base** : Attendre la stabilisation de la fréquence de synchronisme (<100 Hz sur 2 min) sous TBS à 10 µl/min.
- **Anticorps** : Lorsqu'il ne reste plus que 50 µl dans les cônes d'entrée, marquer l'étape (Anticorps), ajouter 20 µl d'anticorps anti-acide okadaïque (dilué à 1/100, débit à 10 µl/min) dans les cônes et démarquer l'étape.
- Attendre 2 minutes avant d'injecter 200 µl de TBS.
- **Saturant** : Lorsqu'il ne reste plus que 50 µl dans les cônes d'entrée, marquer l'étape (Saturant), ajouter 20 µl d'agent saturant (SBBB, débit à 10 µl/min) sur les deux lignes, démarquer l'étape.
- Attendre 2 minutes avant d'injecter 200 µl de TBS.
- **Acide Okadaïque / 6xHistidine** : Lorsqu'il ne reste plus que 50 µl dans les cônes d'entrée, diminuer le débit à 1 µl/min, marquer l'étape (Acide Okadaïque / 6xHistidine), ajouter 20 µl d'acide okadaïque (2 µg) sur la ligne de test, et 20 µl de 6xhistidine (2 µg) sur la ligne de contrôle, démarquer l'étape.
- Attendre 20 minutes avant d'injecter 200 µl de TBS, puis augmenter le débit à 10 µl/min.
- **Anticorps 2** : Lorsqu'il ne reste plus que 50 µl dans les cônes d'entrée, diminuer le débit à 1 µl/min, marquer l'étape (Anticorps 2), ajouter 20 µl d'anticorps anti-acide okadaïque (dilué à 1/100) sur les deux lignes, démarquer l'étape.
- **Nettoyage final** : Attendre 20 minutes avant d'injecter 200 µl de TBS puis augmenter le débit à 100 µl/min.
- Fin du protocole.

*Détection de l'acide domoïque:*

- **Pré-mélange** : Pré-mélanger 24  $\mu\text{g}$  d'anticorps anti-acide domoïque (60  $\mu\text{l}$ ) avec 200 ng d'acide domoïque (2  $\mu\text{l}$ ) avec un agitateur / vortex pendant 30 min.
- **Ligne de base** : Attendre la stabilisation de la fréquence de synchronisme (<100 Hz sur 2 min) sous TBS à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ .
- **Anticorps** : Lorsqu'il ne reste plus que 50  $\mu\text{l}$  dans les cônes d'entrée, marquer l'étape (Anticorps), ajouter 20  $\mu\text{l}$  d'anticorps anti-acide domoïque pré-mélangés ( $\text{Ac}_{\text{AD}}+\text{AD}$ , 8  $\mu\text{g}$ , débit à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) sur la ligne de test, et 20  $\mu\text{l}$  d'anticorps anti-acide domoïque seuls ( $\text{Ac}_{\text{AD}}$ , 8  $\mu\text{g}$ , débit à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) sur la ligne de contrôle, démarquer l'étape.
- Attendre 2 minutes avant d'injecter 200  $\mu\text{l}$  de TBS.
- **Saturant** : Lorsqu'il ne reste plus que 50  $\mu\text{l}$  dans les cônes d'entrée, marquer l'étape (Saturant), ajouter 20  $\mu\text{l}$  d'agent saturant (SBBB, débit à 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) sur les deux lignes, démarquer l'étape.
- Attendre 2 minutes avant d'injecter 200  $\mu\text{l}$  de TBS.
- **AD-Thyr** : Lorsqu'il ne reste plus que 50  $\mu\text{l}$  dans les cônes d'entrée, diminuer le débit à 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ , marquer l'étape (AD-Thyr), ajouter 20  $\mu\text{l}$  d'acide domoïque-thyroglobuline (2  $\mu\text{g}$ ) sur les deux lignes, démarquer l'étape.
- **Nettoyage final** : Attendre 20 minutes avant d'injecter 200  $\mu\text{l}$  de TBS puis augmenter le débit à 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ .
- Fin du protocole.

Les quantités, concentrations, débits, etc, peuvent être ajustés par l'expérimentateur pour évaluer les différents paramètres influençant la détection des phycotoxines.





---

## Étude d'une plateforme à ondes acoustiques de Love pour la détection de phycotoxines dans le Bassin d'Arcachon

---

Ces travaux de thèse, financés par la Région Aquitaine et partie intégrante des projets ASCOBAR et OSQUAR (2007-2009 et 2009-2011), ont été effectués au sein du laboratoire IMS-Bordeaux (Université Bordeaux 1, CNRS, UMR 5218) et sont le fruit de la collaboration de trois laboratoires. Ils ont visé l'étude d'une plateforme à ondes acoustiques transverses horizontales guidées, ou ondes de Love, dédiée à la détection de phycotoxines responsables d'empoisonnement par consommation de chair de coquillage.

Cette plateforme intègre une partie microfluidique destinée à assurer un contrôle du flux de l'échantillon d'analyse au voisinage de l'interface sensible, tout en réduisant les volumes utilisés.

Des tests de détections ont été réalisés, en collaboration avec le Laboratoire d'Immunologie-Parasitologie de l'Université Bordeaux 2, en équipant le capteur d'un biocapteur spécifique de type anticorps, commercial pour la détection d'acide okadaïque, ou, pour l'acide domoïque, fabriqué à partir d'un haptène formé avec un mimotope d'une famille de toxines du type amnésiante (ASP) synthétisé par l'Institut des Sciences Moléculaires (Université Bordeaux 1, CNRS UMR 5255).

Grâce aux efforts synergiques de ce consortium et à l'élaboration de protocoles de détections spécifiques, les premiers résultats permettent de discriminer un échantillon empoisonné au seuil sanitaire, soit 0,2 ppm pour l'acide okadaïque, 20 ppm pour l'acide domoïque (200 ng d'acide domoïque dans seulement 10 mg de chair de coquillage).

Mots clefs:    Biocapteur                      Onde de Love                      Microfluidique  
                  Phycotoxines                      Polydiméthylsiloxane

---

### Love wave platform dedicated to phycotoxin detection

---

These works have been funded by "la Région Aquitaine" as part of the projects ASCOBAR (2007-2009) and OSQUAR (2009-2011). They have been done in the IMS-Bordeaux (Université Bordeaux 1, CNRS, UMR 5218) with the collaboration of two others laboratories.

The main goal was to create a guided transverse horizontal acoustic wave (Love wave) platform for specific detection of phycotoxins, responsible of shellfish poisoning. The microfluidic chip integrated into this platform allows control of the sample flow above the sensitive surface while saving biological liquid consumption.

Detection tests have been done with the collaboration of the "Laboratoire d'Immunologie-Parasitologie" (Université Bordeaux 2). The sensitive surface was made of antibodies, created from a hapten made with a mimotope synthesized by "l'Institut des Sciences Moléculaires" (Université Bordeaux 1, CNRS UMR 5255). This mimotope is a molecule part which is common to a family of amnesic phycotoxin (ASP).

Thanks to the synergistic efforts of this consortium and development of specific detection protocols, results can discriminate poisonous samples at sanitary threshold, that is, containing 0.2 ppm of okadaic acid, 20 ppm of domoic acid (200 ng of domoic acid into only 10 mg of shellfish flesh).

Keywords:    Biosensor                      Love wave                      Microfluidic  
                  Phycotoxins                      Polydiméthylsiloxane

---

Discipline: électronique

Université Bordeaux 1, CNRS UMR 5218, IMS-Bordeaux – Bâtiment A31  
351, cours de la Libération – 33405 TALENCE