

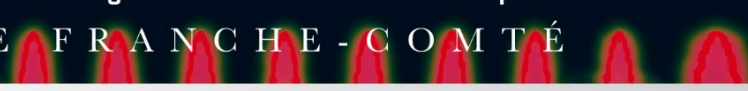


SPIM

Thèse de Doctorat



école doctorale **sciences pour l'ingénieur et microtechniques**
UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ



THÈSE DE DOCTORAT

Préparée dans le cadre d'une cotutelle entre

L'Université Bourgogne Franche-Comté (UFBC) et l'Université Amar Telidji-Laghouat (UATL)

École doctorale n°37 : Sciences Pour l'Ingénieur et Microtechnique à **UFBC**

Préparée au Laboratoire de Nanomédecine, imagerie, thérapeutique à **UFBC**

Spécialité Génie de l'environnement option, Option Analyse et synthèse à **UATL**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Par

Kahlouche Karima

Microsystème pour la nanomédecine : application aux maladies nosocomiales et à la détection des agents pathogènes

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 19/12/2018

Composition du Jury :

Pr. Bahoueddine TANGOUR , Professeur des Universités	Université de Tunis El Manar	Président du Jury
Pr. Omar EL MAZRIA , Professeur des Universités	Université de Lorraine	Rapporteur
Pr. Slimane MEKAOUI , Professeur des Universités	Université d'Alger (USTHB)	Examinateur
Dr. Guillaume HERLEM Maître de Conférences	Université de Franche-Comté	Directeur de thèse
Dr. Marhoun FERHAT , Maître de Conférences	Université de Laghouat (UATL)	Directeur de thèse
Dr. Réda YAHIAOUI , Maître de Conférences	Université de Franche-Comté	Codirecteur de thèse

Titre : *Microsystème pour la nanomédecine : application aux maladies nosocomiales et à la détection des agents pathogènes*

Mots clés : Infections nosocomiales, oxyde de graphène réduit, biocapteurs électrochimiques, dépôt électrophorétique, dopamine, anticorps anti-fimbrial E. Coli.

Ce travail a pour objet l'étude et le développement d'un capteur électrochimique pour la détection sélective quantitative des analytes biologiques à l'échelle nano. Il se divise en deux parties après une présentation de l'état de l'art sur les maladies nosocomiales et les capteurs électrochimiques. Tout d'abord, nous avons développé un protocole spécifique qui repose sur la fonctionnalisation localisée de la microélectrode de travail par dépôt électrophorétique d'oxyde de graphène réduit/polyéthylèneimine (rGO/PEI) pour amplifier le signal de détection. Le microsystème réalisé en salle blanche, été exploité avec succès pour la détection sélective de la dopamine avec une limite de détection de 50 nM.

Ensuite, nous avons utilisé la même plateforme constituée d'électrodes de plus grande taille (mm) pour la réalisation d'un capteur immunologique. Il a démontré son efficacité, de manière spécifique et sélective, pour discriminer la souche sauvage E. Coli UTI89 de UTI89 Δ fim (sans opéron), avec une limite de détection de 10 cfu. mL⁻¹. En outre, le concept d'utilisation d'une électrode modifiée par rGO/PEI par la modification covalente avec des anticorps pathogènes est général. Il peut être facilement adapté à toute autre espèce pathogène, rendant l'approche générique. Le capteur a donc abouti à des résultats intéressants en milieu aqueux, sérique et urinaire, ce qui est essentiel pour son utilisation potentielle pour le diagnostic clinique des maladies pathogènes

Title : Microsystem for Nanomedicine: Application to nosocomial diseases and detection of pathogens

Keywords : Nosocomial infections, Electrochemical biosensors, Reduced graphène oxide, Electrophoretic deposition, Dopamine, Anti- fimbrial E. Coli antibodies.

The purpose of this work concerns the study and development of an electrochemical sensor for both quantitative and selective detection of biological analytes at the nanoscale. It is divided into two parts after a presentation of the state of the art on nosocomial diseases and electrochemical sensors. First, we have developed a specific protocol based on the localized functionalization of the working microelectrode by electrophoretic deposition. We have developed a specific protocol. The strategy is based on the localized functionalization of the working microelectrode by electrophoretic deposition of reduced graphène oxide / polyethyleneimine (rGO / PEI) to amplify the detection signal. The microsystem built in a clean room has been successfully exploited for the selective detection of dopamine with a detection limit of 50 nM. In addition, the microsystem showed good performance in

detecting dopamine levels.

Then, we have also used the same electrode platform at a larger scale (mm) for the specific and selective detection of the immunological sensor which has demonstrated its effectiveness in distinguishing the UTI89 E. Coli wild-type strain of UTI89 Δ fim (without operon), with a detection limit of 10 cfu mL⁻¹. In addition, the concept of rGO / PEI modified electrode by covalent modification with pathogenic antibodies is general and can be easily transposed to any other pathogenic species, making the approach very versatile and generic. The sensor works in aqueous, serum and urinary media, which is essential for its potential use in clinical diagnosis of pathogenic diseases.

Remerciements

Ce travail de thèse est un travail d'équipe et je voudrais en ce sens remercier mes trois encadrants de thèses, Dr Guillaume HERLEM, Dr Marhoun FERHAT et Dr Réda YAHIAOUI pour leurs soutiens et orientations lors de la préparation de ma thèse.

Ces travaux de recherche ont été également effectués au sein du laboratoire NANO BIO INTERFACES de IEMN à Lille, sous la direction du Dr Rabah Boukherroub et le professeur Sabine Szunerits et Alexandre Barras, qui m'ont ouvert l'esprit dans les domaines de la bio-fonctionnalisation des interfaces et tout ce qui concerne à l'électrochimie et son application dans le domaine biodétection.

Je remercie également le Pr Tijani Gharbi pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité, l'accueil chaleureux et les conseils staff techniques de la centrale technologique de Femto-ST, par leurs conseils et leurs encouragements et spécialement Dr Laurent Robert pour sa patience, ses remarques pertinentes et explications concernant les procédés de lithographie, Dr Rabah Zeggari pour ces conseils, son soutien dans la microfabrication des microélectrodes, A Marina Raschetti, à David Raddenzati et à Ludovic Gauthier-Manuel pour son aide et monsieur Franck Chollet le responsable scientifique de la plateforme Micro/Nanotechnologie.

Merci au Dr Etienne Hertz et mon collègue Elmar Yussifli pour le soutien et leur bonne humeur et leurs encouragements.

Je tiens à remercier chaleureusement les professeurs Bahoueddine TANGOUR et Omar EL MAZRIA pour avoir accepté de rapporter mon travail ainsi que le professeur Slimane MEKAOUI, pour leurs participations à ma soutenance. Je les remercie pour leurs conseils leurs remarques pertinentes qui m'ont permis d'améliorer le manuscrit et de mettre l'accent sur certains points que j'avais négligé.

Table des matières

Table des figures.....	ix
Introduction Générale.....	1
1. État de l'art.....	4
1.1. Introduction.....	4
1.2. L'infection nosocomiale	5
1.2.1. Modes de contamination	6
1.2.2. Origines des bactéries responsables d'infections nosocomiales	6
1.2.3. Généralités sur les bactéries pathogènes	7
1.2.4. Les agents pathogènes responsables des maladies nosocomiales	8
1.2.5. Les outils pour tracer des épidémies.....	10
1.3. Les bactéries pathogènes et la biodétection.....	18
1.3.1. La bactérie d'intérêt : Escherichia Coli uropathogène	21
1.3.2. Adhésions fimbriales d'Escherichia Coli	23
1.3.3. La reconnaissance du pathogène par le système immunitaire.....	24
1.3.4. L'obtention des anticorps anti-fimbriaux l'UPEC.....	24
1.4. Le biocapteur.....	25
1.4.1. Le métabolisme microbiologique du Biocapteur	28
1.5. Principaux types de biocapteurs	30
1.5.1. Biocapteurs électrochimiques.....	32
1.5.2. Biocapteurs ampérométriques.....	34
1.6. La biodétection et les anticorps	39
1.6.1. Introduction.....	39
1.6.2. La biodétection avec les anticorps	41
1.6.3. Introduction aux anticorps	42
1.6.4. Procédures d'immobilisation	44
1.6.5. Ingénierie d'Anticorps pour l'immobilisation.....	51
1.7. Méthodes Electrochimiques et fonctionnalisation des surfaces intégrées dans un microsystème	53
1.7.1. Méthodes de mesure électrochimiques.....	53
1.7.2. Fonctionnalisation des microsystèmes à base de carbone	55
1.7.3. Le Graphène	55

1.7.4.	Électrodes modifiées	56
1.8.	Conclusion	62
	Bibliographie.....	64
2.	Biodétection ÉLECTROCHIMIQUE des bactéries	74
2.1.	Biodétection des bactéries par rGO/PEI.....	74
2.1.1.	Introduction.....	75
2.1.2.	Produits chimiques	75
2.1.3.	Synthèse de N-(26-azide-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxahehexacosyl)pyrene-1-carboxamide (Pyrene-PEG).....	76
2.1.4.	Formation d'anti-fimbrial E. Coli modifié avec pyrene-PEG recouvert de GO/PEI d'électrodes modifiée (PEG/rGO/PEI-anti-fimbrial	76
2.1.5.	Caractérisation	77
2.1.6.	Culture bactérienne et détection à base d'anticorps E. Coli anti-fimbriae sur interface modifiés PEG / rGO / PEI	79
2.1.7.	Résultats et discussion	79
2.1.8.	Mesures dans des échantillons réels.....	88
2.1.9.	Conclusion	90
2.2.	Biodétection électrochimiques des bactéries modifiée par un sel de diazonium	91
2.2.1.	Electrogreffage des sels d'aryl diazonium	91
2.2.2.	Les différentes méthodes de greffage du sel diazonium	92
2.2.3.	Le greffage du sel diazonium sur électrode d'or	93
2.2.4.	Expérience	94
2.2.5.	Caractérisations.....	97
2.2.6.	Discussions	99
2.2.7.	Conclusion	104
	Bibliographie.....	105
3.	Application à notre microsystème	111
3.1.	Introduction.....	112
3.2.	Réalisation d'un capteur électrochimique	112
3.2.1.	Procédé de la photolithographie par lift off.....	114
3.2.2.	Comparaison entre le procédé lift off et le procédé de gravure.....	116
3.3.	Caractérisation électrochimique	116
3.3.1.	Validation du microsystème par la voltammétrie cyclique.....	Erreur ! Signet non défini.
3.4.	La fonctionnalisation chimique	118
3.4.1.	Synthèse de l'oxyde de graphène (GO)	119

3.4.2.	Dépôt électrophorétique de rGO / PEI sur une microélectrode Au d'un microsystème	121
3.5.	Résultats et discussions	124
3.5.1.	Déposition électrophorétique de rGO/PEI	124
3.6.	La Détection de la Dopamine	129
3.6.1.	Introduction.....	Erreur ! Signet non défini.
3.6.2.	Les différentes techniques de mesures de la dopamine.....	130
3.6.3.	Détection électrochimique de la dopamine	130
3.6.4.	La biodétection de la dopamine par notre microsystème	131
3.7.	Conclusion	137
	Bibliographie.....	138
	Conclusions générales	141
	ANNEXE A :	144
	(Chapitre 2).....	144
1	Caractérisation de l'oxyde de Graphène	145
	ANNEXE B	146
	(Chapitre 3).....	146
1	Process technologique pour la fabrication des microélectrodes :	147
1.1.	Process Liftoff	148
1.1.1	Promoteur d'adhérence HMDS	149
1.1.2.	La résine négative AZ 5214 :	149
1.1.3	Remarques générales :	150
1.1.4	Les masques :	150
1.1.5	La passivation (l'oxyde de silicium)	152
1.1.6	Le découpage.....	152
1.	2 Caractérisation des microélectrodes:.....	153

Table des figures

Figure 1: évolution du nombre de publications médicales traitant des biocapteurs et de la plupart des maladies pathogènes et comparaison avec l'ensemble des publications médicales sur les maladies nosocomiales. Source: Pubmed.	1
Figure 2 : Schéma de principe d'un biocapteur.....	2
Figure 3 : graphes suivants représentent : (A) l'incidence des infections nosocomiales, (B) l'infection nosocomiale dans le sang pour plusieurs bactéries pathogène chez des patients traités à l'hôpital universitaire à Taiwan [11].	16
Figure 4 : architecture bactérienne et cibles pour la biodétection. Les deux types de bactéries peuvent avoir des flagelles. Les cibles intracellulaires pour la biodétection comprennent les protéines, l'ADN et l'ARN [14].	19
Figure 5 : représente une image réelle d'une souche E Coli pathogène indiquant l'organelle responsable de la pathogénicité [28]	22
Figure 6 : représente une illustration schématisée d'un modèle d'E Coli [28]	22
Figure 7 : représente une illustration schématisée de l'adhésion d'E. Coli à l'aide des fimbriae [30]	23
Figure 8 : schéma simplifié d'un biocapteur avec l'analyte, le ligand immobilisé sur le support, le transducteur et l'appareil de mesure du signal [43].	26
Figure 9 : capteur ampérométrique, d'après Clark et Lyons [70]	35
Figure 10 : (a-e) Différent designs la microfabrication des électrodes (f) électrode électrodéposé. (copyright 2000 John Wiley & Sons, Inc) [76]	37
Figure 11 : capteur potentiométrique, d'après Schmitt, 1995	38
Figure 12: publications sur biocapteurs par rapport à la détection spécifique de bactéries entières. (A) des méthodes de détection différents utilisés dans les plates-formes de biocapteurs, y compris la littérature publiée trouvés dans ISI Web of Science en utilisant les termes de recherche "biocapteur" et "technique utilisée" de 1983 à 2013. (B) Différentes techniques utilisées pour la détection de bactéries entières. La taille du cercle ou d'une bactérie est proportionnelle au nombre de publications associées à cette technique [79].	40
Figure 14 : structure d'un anticorps [84].....	43
Figure 13 : les différentes méthodes d'immobilisation des biorécepteurs [86]	45
Figure 15: différents types de méthodes d'immobilisation et groupes fonctionnels utilisés pour l'immobilisation d'AC aléatoire et orientée sur des surfaces [90]	46
Figure 16 : représentation schématisée de diverses méthodes d'immobilisation. (A). Structure typique d'AC. (B) immobilisation non-covalente d'un Ab sur un capteur de surface solide représenté par le piégeage et les interactions électrostatiques. (C) Liaison covalente d'un AC à la surface solide fonctionnalisée via des groupes amine, thiol et aldéhyde. (D). Cohésion des interactions d'affinité avec la surface solide représentée par les systèmes à base de protéines A/G et d'affinité biotine-avidine [90]	47
Figure 17 : (a) immobilisation d'une biomolécule présentant un groupement amine sur une surface fonctionnalisée par un groupement époxyde par formation d'un aminoalcool (b) activation par la voie EDC/NHS d'une surface acide carboxylique pour l'immobilisation de biomolécule aminées. (c) immobilisation covalente d'une biomolécule présentant un groupement amine sur une surface fonctionnalisée par des groupements amine grâce à un espaceur homofonctionnel, le glutaraldéhyde (pentane-1,5-dial). (d) immobilisation covalente d'une biomolécule présentant un groupement thiol sur une surface fonctionnalisée par des groupements amine grâce à un espaceur hétérofonctionnel, le SMCC (succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl) cyclohexanecarboxylate) [99]	50
Figure 18 : représentation schématisée de divers types d'approches d'immobilisation utilisées pour immobiliser des Ac recombinants sur des surfaces de capteurs [90].....	52

Figure 19: Arbre généalogique mettant en évidence un certain nombre de techniques électrochimiques interfaciales	54
Figure 20 : schéma d'une monocouche auto-assemblée sur un substrat [137]	57
Figure 21 : différentes voies radicalaires de chimigreffage [137].....	59
Figure 22: représentation schématique de la technique de dépôt par électrophorèse.	60
Figure 23 : (A) différentes étapes utilisées pour la construction de l'immunocapteur pour la détection électrochimique sélective de E. Coli UTI89; (B) des micrographies d'électrodes par microscope électronique à balayage (SEM) avant et après le revêtement électrophorétique avec nanofeuillets de rGO/PEI lors de l'application de 15 V _{DC} pendant 4 min; (C) Voltammogrammes d'impulsions différentielles d'or (noir) et d'or recouvertes de rGO/PEI (bleu) enregistrées dans [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (10 mM) / KCl (0,1 M).	81
Figure 24 : voltammogrammes d'impulsions différentielles Au (gris) et Au-rGO/PEI dans [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} (5 mM)/PBS (0,1 M) (noir), dans [Ru(NH ₃) ₆] ^{3+/2+} (5 mM) / PBS (0,1 M) (bleu)	81
Figure 25 : voltampérogrammes d'impulsions différentielles enregistrées en [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (10 mM) / KCl (0,1 M) sur des électrodes d'or revêtues de rGO / PEI avant (en noir) et après 30 min d'incubation avec E. Coli UTI89 (A) et E. Coli UTI89 Δfimbrial (B) solutions de différentes concentrations; (C) Image au MEB d'une électrode d'or revêtue de rGO/PEI incubée avec E. Coli UTI89 (10 ⁸ ufc mL ⁻¹) pendant 30 minutes	82
Figure 26 : différentes étapes de fonctionnalisation de l'électrode d'or par rGO/PEI/AB/pyrène -PEG	83
Figure 27 : sensogrammes SPR après interaction d'anticorps polyclonaux IgG purifiés à partir de sérum de rat, pour des concentrations allant de 6 μM (ligne rouge) à 3 nM (ligne rose), dissous dans du tampon courant (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM et 0,005 % P20, mesurée à 30 μL.min ⁻¹ , enregistrée sur une puce de capteur CM5 modifiée par covalence avec des fibres de type 1 de la souche E. Coli (AIEC) LF82 adhérente-adhérente en utilisant la procédure standard EDC / NHS.	84
Figure 28 : (A) DPVs d'électrodes Au modifié PEG / rGO / PEI avant et après incubation pendant 2 h dans une solution de E. Coli UTI89 (10 ⁸ ufc mL ⁻¹) contenant [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (10 mM) / KCl (0,1 M); (B) DPV de PEG / rGO / PEI anti-fimbrial modifié Au électrodes avant et après incubation pendant 2 h dans une solution de E. Coli UTI89 (10 ⁸ ufc mL ⁻¹) contenant [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (10 mM) / KCl (0,1 M); Images SEM de PEG / rGO / PEI ; (C) et PEG / rGO / PEI-anti-fimbrial (D) a modifié les électrodes d'or après 2 h d'incubation avec E. Coli UTI89 wt 10 ⁸ ufc mL ⁻¹	85
Figure 29: changement du courant oxydatif des DPV dans [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (10 mM) / KCl (0,1 M) après une incubation de 30 min dans des solutions aqueuses de E. Coli UTI89 de différentes concentrations (10 ¹ -10 ⁸ ufc / mL ⁻¹) en utilisant les électrodes Au modifiées PEG/rGO-PEI-anti-fimbrial; (B) Courbe d'étalonnage respective pour les solutions E. Coli UTI89.	86
Figure 30 :(A) influence de la concentration d'anticorps anti-fimbriae sur la réponse du courant d'électrodes modifiées au PEG/rGO/PEI-anti-fimbrial dans [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (10 mM) / KCl (0,1 M); Le courant a été enregistré lors de l'incubation avec 100 ufc mL ⁻¹ . (B) DPV des électrodes modifiées au PEG/rGO/PEI-anti-fimbrial mesurées en [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (10 mM) / KCl (0,1 M) avant et après l'incubation pendant 30 min dans des solutions aqueuses de E. Coli UTI89 Δfim (10 ¹ -10 ⁸ ufc mL ⁻¹).	88
Figure 31 : DPV des électrodes d'or modifiées anti-fimbrial PEG / rGO / PEI enregistrées dans [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (10 mM) avant et après incubation pendant 30 min dans du sérum humain et des échantillons d'urine enrichis avec différentes concentrations de E. Coli UTI89 (10 ¹ -10 ⁸ ufc mL ⁻¹); (B) Comparaison entre la signature électrochimique de E. Coli UTI89 dans PBS (gris), dans le sérum humain (bleu) et dans l'urine (vert); (C) enregistrement du courant oxydatif dans [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ (10 mM) dans du sérum humain additionné de différentes	

concentrations de <i>S. aureus</i> (10^1 - 10^8 ufc mL ⁻¹); (D) Comparaison entre la signature électrochimique du sérum humain enrichi de 10^3 ufc mL ⁻¹ <i>E. Coli</i> UTI89 et en présence de <i>S. aureus</i> à 10^3 et 10^6 ufc mL ⁻¹	89
Figure 32: modification des surfaces par la réduction électrochimique des sels de diazonium sur carbone, métal ou semi-conducteur.....	92
Figure 33: Mécanisme de l'électrogreffage du sel de diazonium sur des surfaces d'or [58]....	94
Figure 34: modification de l'électrode d'or par carboxyphényle.....	95
Figure 35: modification 4-carboxyphényle plausible à l'électrode Au	95
Figure 36. voltamogrammes cycliques de l'électrode d'or nu dans une solution de mélange contenant 0,01 M d'acide 4-aminobenzoïque dissous dans 20 mL de solution aqueuse de chlorhydrate chaude (0,22 M). Après refroidissement à 0 ° C, 0,011 M de NaNO ₂ aqueux à la vitesse de balayage 100 mV / s.	96
Figure 37 : Modification électrochimique de l'électrode avec le sel de 4-carboxyphényl diazonium.	97
Figure 38: spectre IR du sel de 4-carboxyphényl diazonium déposé sur une électrode en or en réduction cathodique.	98
Figure 39: mesures de l'angle de contact des surfaces Au (a) et COOH-Au (b).....	99
Figure 40: photo MEB de l'électrode d'or (a) avant et (b) après le dépôt électrochimique du sel diazonium après plusieurs mois.....	99
Figure 41: la réduction cathodique (CVs) du sel de diazonium sur de l'électrode l'or nu et l'électrode modifiée (COOH-Au) dans K ₃ [Fe(CN) ₆] (5 mM) et K ₄ [Fe(CN) ₆] (5 mM) (1:1) contenant du PBS 0,1 M à une vitesse de balayage de 100 mV/s.....	101
Figure 42 : voltampérogramme cyclique dans Fe(CN) ₆ ⁴⁻ (10 mM) dans du PBS (0,1 M), vitesse de balayage 100 mV / s pour 10 ufc mL ⁻¹ activation AB avec DTSP (a), 10 ⁸ ufc.mL ⁻¹ activation AC avec Couple EDC/NHS (b).	102
Figure 43: (a) voltampérogrammes d'impulsions différentielles mesurées dans [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} (5 mM) / PBS (0,1 M) après <i>E. Coli</i> incubation pendant 30 min avec AC- <i>E. Coli</i> (200µg / mL) pour différentes concentrations: 10 ⁸ ufc mL ⁻¹ (noir), 10 ⁶ ufc mL ⁻¹ (rouge), 10 ⁵ ufc mL ⁻¹ (bleu), (b) et (c) voltammogramme cyclique en Fe(CN) ₆ ⁴⁻ (10 mM) dans du PBS (0,1 mM), de différentes concentrations: 10 cfu.mL ⁻¹ (b), (c) 10 ⁸ ufc mL ⁻¹ (noir), 10 ⁶ ufc mL ⁻¹ (rouge), vitesse de balayage 100 mV/s.	103
Figure 44. Processus des étapes de fabrication des microsystèmes, lift-off pour le dépôt des métaux des électrodes et des connecteurs (étapes 1 à 12). Enfin, une fenêtre sur les électrodes est réalisée par étape SiO ₂ (lift-off) ou SU8 (photolithographie) (13).	114
Figure 45 : étapes du processus de lift off, I. Préparation du substrat; II. Dépôt de la couche de pochoir sacrificiel ; III. Modélisation de la couche sacrificielle (ex: gravure), création d'un motif inverse ; IV. Dépôt du matériau cible ; V. Laver la couche sacrificielle avec le matériau cible sur sa surface ; VI. Couches de motif final ; 1) Substrat ; 2) Couche sacrificielle 3) le motif désiré (6).....	115
Figure 46: (A) image optique zoomée sur la configuration du microsystème à trois électrodes; (B) CV du microsystème dans Fe(CN) ₆ ⁴⁻ (10 mM) / PBS (10 mM); vitesse de balayage: 50 mVs ⁻¹	117
Figure 47 : CV d'une microélectrode d'un microsystème dans une solution d'hexacyanoferrate (II) de potassium Fe (CN) ₆ ⁴⁻ (10 mM) / PBS (10 mM), vitesse de scan 50mVs ⁻¹ . (A) trois scan (S1, S2, S3) (B) à des différents vitesses de scan V1= 0.02 v.s ⁻¹ , V2= 0.05 v.s ⁻¹ , V3= 0.1 v.s ⁻¹	118
Figure 48 : prototype de (A) la première et (B) la deuxième version produit fini après le découpage, (C) la connexion du microsystème au potentiostat.....	119
Figure 49 : les trois étapes de préparation de l'oxyde de graphène GO à partir de graphite [7] [adapté de Garg et al. (2014)]......	120

Figure 50 : La mesure du potentiel zêta des solutions utilisées dans la déposition électrophorétique (A) GO/PEI (1 :1) : 54.7 mV, (B) GO : -47mV	121
Figure 51 : dépôt du Graphène oxyde par électrophorèse par un générateur (Réf MS major science Mini-300).....	122
Figure 52: étude de la voltamétrie cyclique (CV) du rGO (1mg/mL) sur une électrode d'Or (50nm Au+10nm Ti) à une vitesse de scan $V = 0.05\text{v.s}^{-1}$ dans une solution de 0,1M de HClO_4	123
Figure 53 : optimisation des paramètres de EDP par la voltamétrie cyclique (CV) du rGO (0.5mg/mL) sur une électrode d'or (50nm Au+10nm Ti) à une vitesse de scan $v = 0.05\text{v.s}^{-1}$ dans une solution de 5mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1mM KCl	124
Figure 54 : revêtement électrophorétique sélectif de l'électrode microbande Au avec rGO/PEI	125
Figure 55 : CV d'une macroélectrode fonctionnalisé avec le rGO et une autre avec le rGO/PEI dans (A) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM) / PBS (10 mM), (B) $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (10 mM)/PBS (0.1 M); vitesse de scan 50mVs^{-1}	125
Figure 56 : optimisation du temps de dépôt du GO / PEI (1 mg / mL) en appliquant une tension continue (15 V) par la voltamétrie cyclique (CV) sur une microélectrode d'Or (50nm Au+10nm Ti) à une vitesse de scan $v = 0.05\text{v.s}^{-1}$ dans une solution de 5mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0.1mM KCl	126
Figure 57 : CV de l'électrode microbande d'or dans (A) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM) / PBS (10 mM), (B) $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (10 mM)/PBS (0.1 M); vitesse de scan 50mVs^{-1}	127
Figure 58 : revêtement électrophorétique sélectif de l'électrode microbande Au avec rGO / PEI	127
Figure 59 : (A) spectre de transmission FTIR de GO (bleu), rGO (noir), PEI (vert) et rGO/PEI (rouge); (B gauche) image photographique et (B droite) des spectres Raman correspondants aux trois zones différentes du microsystème (point 1, sur le substrat en verre, spots 2 et 3 sur la microbande d'or modifié par rGO / PEI).	129
Figure 60 : CV de 10 μM Dopamine dans 0.1mM PBS à une vitesse scan 0.050 V.s^{-1} d'un microsystème d'une microélectrode d'Or (50nm Au+10nm Ti)	133
Figure 61: (A) voltammogrammes d'impulsions différentielles de microsystème modifié par rGO / PEI lors de l'addition de différentes concentrations de dopamine dans du PBS (10 mM); (B) le changement de courant en fonction de la concentration en dopamine.....	134
Figure 62: DVP de l'acide urique (50 μM , vert), de l'acide ascorbique (50 μM , bleu) et dopamine (5 μM , noir) en présence d'acide urique (50 μM) et d'acide ascorbique (50 μM). 135	
Figure 63: (A) DPV voltamétrie impulsionnelle différentielle de la viande de boeuf (bleu) et poulet (rouge) transformés (100 fois dilué) avec de la dopamine (1 μM); (B) Les mesures HPLC des échantillons de viande de dopamine (1 μM) et de boeuf (bleu) et de poulet (rouge) dilués 100 fois.	137

Introduction Générale

Dans les dernières décennies, de gros efforts ont été consacrés à la conception et à la réalisation de systèmes de détection toujours plus précis et moins chers avec des possibilités élevées de détecter des traces chimiques dans le domaine de l'environnement, du génie chimique, des applications médicales, de la sûreté (bioterrorisme) et du contrôle qualité. Un capteur avec des performances accrues doit fonctionner avec des matériaux hautement sensibles, les transducteurs, et des interfaces électroniques appropriées. En outre, la simplicité, la rapidité, la robustesse, aussi bien que la taille et la fiabilité sont des qualités essentielles qui sont devenues d'importance fondamentale pour surveiller les polluants dans l'atmosphère ou les agents pathogènes. Selon une enquête de prévalence effectuée en 2012 sur les infections nosocomiales (IN), les trois micro-organismes les plus fréquents étaient *Escherichia coli* (17,6 %), *Staphylococcus aureus* (38,1 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (12%). Dans ce contexte local, qui peut être étendu au milieu hospitalier mondial, il paraît nécessaire d'apporter une réponse relative à la détection de ces agents.

Dans le domaine des nanotechnologies, les applications liées au nombre de publications ont continué à augmenter, ce qui témoigne du développement rapide et l'utilisation des biocapteurs de 2000 à 2015 (Figure 1).

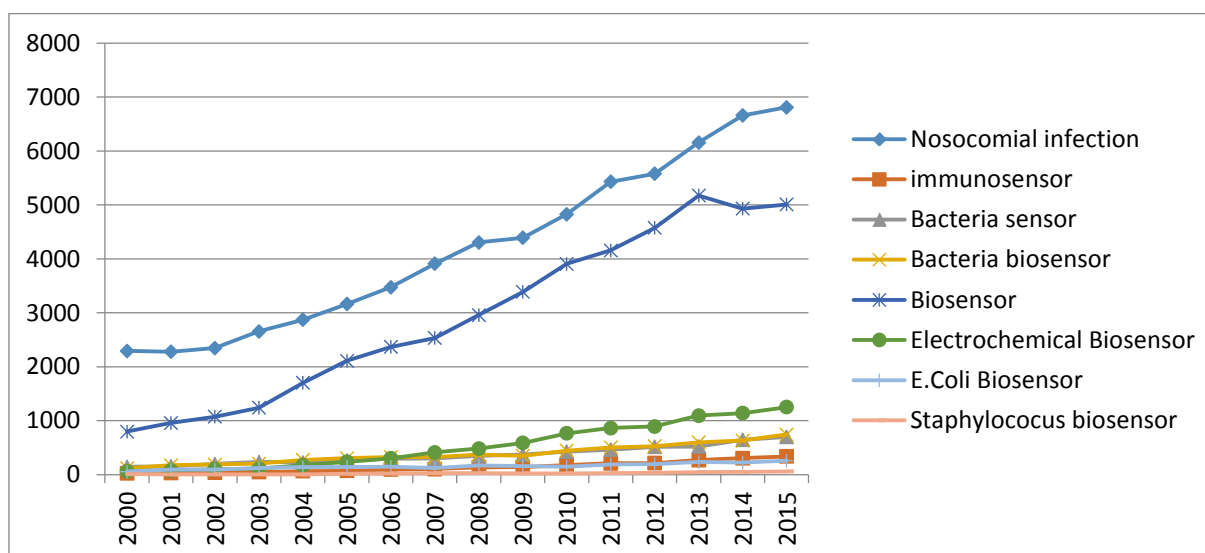


Figure 1: évolution du nombre de publications médicales traitant des biocapteurs et de la plupart des maladies pathogènes et comparaison avec l'ensemble des publications médicales sur les maladies nosocomiales. Source: Pubmed.

Le développement d'applications dans le domaine des biocapteurs est un travail pluridisciplinaire qui fait appel à l'électrochimie, la biologie et les microtechnologies. Les travaux publiés dans ce domaine sont nombreux. Malgré tout, il est possible d'apporter des améliorations sur leur miniaturisation, les matériaux de transduction, les limites de détection tout en réduisant les étapes de réalisation et de fonctionnalisation et donc les coûts de fabrication.

L'objectif du présent travail de thèse en collaboration avec le CDTA et l'Université de Laghouat consiste à développer une biopuce permettant de détecter la présence des agents pathogènes responsables des maladies nosocomiales les plus fréquentes (dont la source provient d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*). Des molécules réceptrices spécifiques (anticorps) des bactéries à détecter seront immobilisées à la surface d'une microélectrode au sein d'un microsystème. Selon l'architecture retenue et la possibilité de développer un réseau d'électrodes, il sera donc possible de détecter ces bactéries en une seule analyse de quelques minutes. Une configuration en réseau de capteurs sera envisagée afin d'avoir accès à la concentration de l'analyte mais également à son gradient de concentration au sein d'une architecture hospitalière.

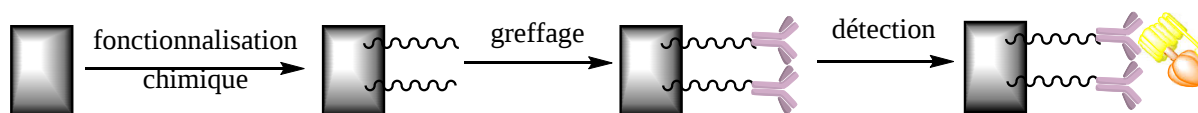


Figure 2 : Schéma de principe d'un biocapteur

Une tendance actuelle pour augmenter les propriétés de détection des capteurs chimiques consiste à mettre en œuvre des méthodes de fonctionnalisation, comme le greffage covalent et faisant appel à des matériaux nano structurés par différentes techniques possibles. Cela concerne des matériaux comme les nanoparticules, les nano fils, les monocouches auto-assemblées ou les nanotubes comme l'illustrent de nombreux travaux dans ce domaine chaque année [1,2]. Ces matériaux ont des structures uniques qui sont dominées par leurs petites dimensions avec des propriétés électroniques qui peuvent être exaltées pour une plus grande sensibilité de détection. En particulier, les nanostructures à base de carbone et/ou les nanoparticules d'or présentent des propriétés uniques et une flexibilité morphologique qui les rend en soi multifonctionnelles et compatibles avec les systèmes organiques et inorganiques.

Les (bio)capteurs électrochimiques ont une longue histoire de recherche et leur utilisation fait l'objet de nombreux travaux régulièrement en R&D. Les maladies nosocomiales peuvent être véhiculées par les êtres vivants, le matériel et par l'air. Le principe de détection électrochimique des agents pathogènes est schématisé sur la Figure 2 qui présente une microélectrode au sein d'un microsystème. La présence des agents pathogènes se manifeste par un changement de signal.

Nous souhaitons mettre en œuvre, à travers cette collaboration Franco-Algérienne, ***des capteurs embarqués au sein d'un microsystème pour la nanomédecine, réaliser des fonctionnalisations avec des matériaux ultra performants en termes de détection, de sensibilité, etc. pour proposer un réseau de capteurs dans le domaine des sciences de l'environnement.*** L'impact des maladies nosocomiales sur la santé publique et l'économie dans les pays industrialisés comme dans les pays émergents est manifeste. Nous proposons une solution innovante et pertinente à ce problème pour l'appliquer à des zones géographiques en France comme en Algérie.

Ainsi, l'objectif de cette thèse est le développement d'un biocapteur électrochimique pour la détection spécifique à faible coût. Nous avons donc élaboré un plan de travail qui s'articule sur les trois chapitres suivants :

- Le premier chapitre est consacré à l'état de l'art sur les bactéries responsables des maladies nosocomiales et leurs recensements et cité les différents types de biocapteurs et les méthodes de biodétection.
- Le deuxième chapitre traite l'élaboration d'un protocole de la biodétection de la bactérie E. Coli sur deux plateformes différentes. Une est modifiée par électrochimie avec le sel de diazonium, l'autre avec modification électrophorétique avec le d'oxyde de graphène réduit / polyéthylènimine. Le but du capteur immunologique est d'arriver à faire une détection spécifique et sélective et faire la distinction entre la souche sauvage E. Coli UTI89 et l'UTI89 Δ fim (sans opéron).
- Le dernier chapitre concerne la réalisation du microsystème en salle blanche et transposition du protocole de fonctionnalisation sur le microsystème. Après la validation du protocole de détection de la dopamine sur les électrodes modifié, l'étape finale consiste à valider notre biocapteur pour la détection de la dopamine

1 ÉTAT DE L'ART

1.1 Introduction

L'hôpital et la clinique abritent de nombreuses sources de germes (virus, bactéries) : le patient et le personnel, le matériel et les surfaces, et l'environnement. Le patient et le personnel constituant la plus importante source de germes. Ce n'est pas étonnant car tout être humain est porteur d'un grand nombre de germes dont certains sont bénéfiques pour la santé (par exemple, les bactéries présentes dans l'intestin aident à la digestion). Le matériel de soins et les surfaces sont recouverts naturellement de nombreux microbes. Ils peuvent être contaminés par les germes apportés par les personnes et sont présents sur les mains, dans la bouche, etc. L'environnement représente aussi une source de germes mais ceux-ci sont moins fréquemment en cause. L'air, l'eau, l'alimentation contiennent des germes qui ne sont pas dangereux dans les conditions normales. Ils peuvent provoquer des infections chez les patients fragiles ou bien lorsque ces germes sont introduits directement à l'intérieur du corps (par exemple lors d'une opération chirurgicale).

En 2006, une enquête a été réalisée à l'échelon national dans 2337 établissements de santé (environ 95 % des lits d'hospitalisation en France). Les résultats de cette étude montraient que 4,97 % des patients présentaient une ou plusieurs infections nosocomiales actives, soit un malade sur vingt. Mais ce taux varie en fonction de la situation médicale du patient, de la charge en soins et par conséquent du service d'hospitalisation. Le nombre de décès attribuables aux infections nosocomiales a été récemment évalué à partir d'une étude rétrospective de dossiers dans 16 établissements de santé du CCLIN (Centres de Coordination de Lutte contre les Infections Nosocomiales) Paris-Nord. L'extrapolation à la France entière

permet d'estimer que l'infection nosocomiale aurait contribué de façon directe au décès de 4188 patients dont le pronostic vital n'était pas engagé à court terme [3].

L'augmentation de 20 % des infections postopératoires, révélées par l'Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé (France, mai-juin 2017) a été rendue publique par Sante publique France le 4 juin 2018.

1.2 L'infection nosocomiale

Une infection nosocomiale désigne une infection contractée au cours d'une hospitalisation, infection qui n'existait pas auparavant ni, d'ailleurs, durant les 48 premières heures à l'hôpital. Plus généralement le terme nosocomial est employé pour une maladie contractée lors d'une hospitalisation dont le synonyme est infections hospitalières. L'agent infectieux appartient à la flore hospitalière provenant du mélange des flores du malade, du personnel hospitalier et de l'environnement. Généralement les principales infections nosocomiales sont les infections :

- urinaires : 40%.
- des plaies : 25%.
- respiratoires : 15%.
- sur cathéters intraveineux : 5%.
- bactériennes et septicémies (état infectieux généralisé, dû à la dissémination d'un germe pathogène, c'est-à-dire pouvant provoquer une maladie, dans tout l'organisme par l'intermédiaire du sang) : 5%.
- autres : 10%.

Toutes les infections n'ont pas la même gravité qui dépend, d'une part de l'état du patient et d'autre part, de la virulence de l'agent infectieux. Plus le patient est fragilisé, plus l'infection sera grave. Les infections urinaires, qui représentent les infections nosocomiales les plus fréquentes, ne sont en général pas graves. En revanche, certaines infections pulmonaires ou certaines septicémies (infections provoquées par des agents pathogènes présents dans le sang) peuvent être très graves et parfois entraîner la mort.

En Afrique et dans certains pays en voie de développement, le taux le plus élevé de prévalence de ces infections est estimé à 25,0 %. En République Démocratique du Congo en 2011, la prévalence des infections nosocomiales dans certains hôpitaux de Kinshasa était estimée à 15,0 %. Parmi les infections nosocomiales, les infections du site opératoire étaient

les plus fréquentes (27,1%), suivies des infections pulmonaires (22,0%) et des infections urinaires (17,0%). L'examen microbiologique a permis de mettre en évidence cinq germes responsables d'une infection nosocomiale chez les patients infectés : *Escherichia coli* (11,9%), *Staphylococcus aureus* (6,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,1%), *Shigella* spp (5,1%) et *Salmonella typhi* (1,7%). La voie parentérale était la plus utilisée pour administrer un anti-infectieux [4].

1.2.1 Modes de contamination

Quel que soit son mode de transmission, l'apparition d'une infection nosocomiale est favorisée par la situation médicale du patient, comme les services de réanimation. A ce stade, les patients, déjà fragilisés par leur maladie, sont ventilés, sondés, perfusés, plutôt qu'en médecine interne où les actes invasifs sont moins fréquents, A cet effet les infections nosocomiales sont classées comme suit [5] :

- Les infections nosocomiales d'origine endogène. Le malade s'infecte avec ses propres germes, soit *in situ*, soit à partir de l'environnement immédiat. Cette auto-infection apparaît à la faveur d'un acte invasif (porte d'entrée) et/ou en raison d'une fragilité particulière. Les germes en cause peuvent être ceux de la peau, des muqueuses, du tractus digestif, etc.
- Les infections d'origine exogène. Le germe responsable de l'infection nosocomiale provient d'un autre malade. La transmission est le plus souvent manuportée par le personnel soignant intervenant auprès de plusieurs patients, disséminant ainsi les germes d'une personne à l'autre (infection «croisée»). Les hétéro-infections : l'agent responsable d'une infection chez un malade peut être transporté chez un autre malade et provoquer une infection dite croisée ou hétéro-infection.
- Les xéno-infections : infections sévissant sous forme d'endémie ou d'épidémie dans la population extrahospitalière. Les agents pathogènes sont importés à l'hôpital par des malades, par du personnel, par des visiteurs qui en sont atteints ou sont en incubation.

1.2.2 Origines des bactéries responsables d'infections nosocomiales

L'hôpital est le réservoir environnemental de ces agents (le matériel, l'eau utilisée, l'alimentation...). Il est indispensable de les identifier et de connaître leurs modes de transmission nosocomiale. Cela concerne leurs portes d'entrée dans l'organisme et les

principales pathologies dont ils sont à l'origine afin d'organiser plus efficacement la prévention et la prise en charge de ces dernières [6].

Dans le corps humain il y a à peu près 10^{14} bactéries. Il faut distinguer, d'une part, la flore transitoire (passage chez l'hôte) de la flore résidente (qui vit avec l'hôte). D'autre part, il y a la colonisation qui est la présence de flore transitoire sans maladie où l'infection se manifeste par des signes cliniques et biologiques [7].

Les infections bactériennes des voies urinaires (UTI) sont parmi les plus communes. Jusqu'à présent *Escherichia Coli* est considéré comme l'espèce la plus commune infectant ce site. Les individus à haut risque d'infection urinaire symptomatique (UTI : urinary tract infection) incluent les nouveau-nés, les filles d'âge préscolaire, les femmes sexuellement actives et les femmes et les hommes âgés. Les infections urinaires demeurent une source importante de morbidité. En 2000, il y a eu 8,2 millions de consultations médicales, plus de 1,7 million de visites à l'urgence et 366 000 hospitalisations d'hommes et de femmes aux États-Unis pour un coût annuel de 3,4 milliards de dollars. Ces fréquences placent d'abord les infections urinaires parmi les maladies rénales et urologiques en termes de coût total, au-delà de l'insuffisance rénale chronique avec les frais de dialyse et de transplantation [8].

1.2.3 Généralités sur les bactéries pathogènes

Les bactéries, les virus et autres microorganismes sont présents un peu partout dans l'air, les sols, l'eau, la peau, etc. Une personne normale vit en symbiose avec plus de 150 espèces de bactéries à l'intérieur et à l'extérieur de son corps. Certaines bactéries sont associées à l'homme et l'animal par des relations bénéfiques et utiles, mais d'autres provoquent des maladies potentiellement dangereuses qui peuvent être fatales. Lorsque la bactérie pathogène trouve les conditions favorables de nutrition, d'humidité et de température, alors elle se multiplie et envahit l'hôte. Selon les statistiques, les maladies infectieuses sont responsables de 40% des 50 millions de morts chaque année dans le monde. En outre, les infections bactériennes constituent la principale cause de mortalité dans divers pays en développement.

Tableau 1 : les différentes bactéries pathogènes responsable des maladies, les toxines qu'elles sécrètent, les sources d'infection et le taux de mortalité chez les humains infectés par les micro-organismes utilisés en tant qu'agent de guerre biologique (BWA, biological warfare agent).

Bactérie	Maladie	Toxine	Sources d'infection	Mortalité lorsqu'il est utilisé comme BWA
<i>Bacillus anthracose</i>	Anthrax	œdème	Lait ou viande, BWA	Fatal
<i>Brucella melitensis</i>	Brucellose	±	Lait ou viande, BWA	Faible
<i>Campylobacter jejuni</i>	dysenterie	±	Produits laitiers, viandes, champignons	±
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulisme	Neurotoxine	aliments	±
<i>Coxiella burnetti</i>	Pneumonie	±	BWA	Faible
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphthérie	toxine Diphthérie	BWA	Faible
<i>Escherichia Coli</i>	Gastroentérite	Enterotoxine	viandes, poissons, lait, riz, légumes	±
<i>Francisella (Pasteurella) tularensis</i>	Tularémie	±	BWA	Faible
<i>Mycobactérie tuberculos</i>	Tuberculose	±	BWA	Élevée
<i>Rickettsia rickettsi</i>	fièvre pourpre des Montagnes Rocheuses	±	BWA	Élevée
<i>Salmonella paratyphus</i>	Paratyphoïde	±	Contamination fécale, œufs, lait, viandes	±
<i>Salmonella typha</i>	Fièvre Typhoïde	±	BWA	Élevée
<i>Shigella dysenterie</i>	dysenterie	Neurotoxine	Contamination fécale	±
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pneumonie	Enterotoxine	Porteurs humains	±
<i>Streptococcus pneumonie</i>	pneumonie	toxine érythroge nique	Porteurs humains	±
<i>Tréponème pallidum</i>	Syphilis	±	Sang infecté	±
<i>Vibro cholera</i>	Cholera	Enterotoxine	Contamination fécale	Élevée
<i>Yersinia pestis</i>	peste	toxine yersinia	BWA	Fatal

1.2.4 Les agents pathogènes responsables des maladies nosocomiales

Les infections nosocomiales, acquises au sein d'un établissement de soins peuvent être liées à divers agents : bactéries, virus, champignons ou parasites [7], et sont la première cause de morbidité et de mortalité. Il a été estimé qu'environ 5% des patients hospitalisés aux États-

Unis développent une infection nosocomiale [9]. De plus 750 000 personnes, soit plus d'un patient hospitalisé sur vingt, contractent une infection nosocomiale chaque année en France [10].

L'infection peut être due à une contamination de l'environnement hospitalier : eau (légionellose), air (aspergillose), matériel, alimentation de santé. Reste que, malgré le renforcement de l'hygiène hospitalière, le risque de contracter une infection à l'hôpital est important. Il faut dire que le contexte est particulièrement propice. L'hôpital est un milieu bien particulier. L'hôpital met en effet en présence des individus sains (soignants, visiteurs) et de nombreux patients présentant des maladies variées, infectieuses ou non. Chacun, en circulant dans l'établissement, disperse des microbes qui se retrouvent en grand nombre sur diverses surfaces (chaussures, poignées de porte, interrupteurs et dans l'air par exemple) faisant de l'environnement un «pot-pourri» de germes. Quant aux patients hospitalisés, ils sont par définition affaiblis. Leurs défenses immunitaires sont parfois altérées (diabète, insuffisance respiratoire, maladies immunitaires, grands brûlés) et leur état général est dégradé. Ils sont donc plus réceptifs aux infections. Par ailleurs, la médecine est de plus en plus invasive et, rançon du progrès, les dispositifs médicaux utilisés (sondes urinaires, sondes d'intubation, cathéters, drains) constituent un terrain propice au développement de pathologies nosocomiales. La plupart de ces infections sont dues à des bactéries ou à des champignons microscopiques. Les plus courantes sont les infections urinaires (30,3 %) puis les pneumopathies infectieuses (14,7 %) et les infections du site opératoire (14,2 %).

Les désinfectants et antiseptiques utilisés pour le nettoyage et les soins ainsi que les antibiotiques prescrits dans l'établissement, efficaces pour combattre les infections, opèrent parallèlement une forte pression de sélection sur les microbes. Seuls les plus résistants survivent. Le taux de résistance aux antibiotiques des bactéries responsables d'infections nosocomiales est, de façon globale, élevé. C'est le cas du staphylocoque doré rendu célèbre par l'acteur Guillaume Depardieu qui parla beaucoup des souffrances endurées suite à son infection. Deuxième cause de maladies nosocomiales, le staphylocoque doré est résistant à la méticilline dans plus d'un cas sur deux. Toutes les facettes de la biologie du staphylocoque doré comme la synthèse de sa paroi, ses interactions avec les cellules hôtes, la façon dont il perçoit son environnement, sont à l'étude. Le groupe de Tarek Msadek (Unité de Biologie des Bactéries pathogènes à Gram-positif) collabore par ailleurs avec une équipe japonaise pour étudier des inhibiteurs de la coque de la bactérie, candidats à des médicaments potentiels. Il

s'intéresse aussi à la façon dont les staphylocoques forment des « biofilms » (La Lettre de L'INSTITUT PASTEUR, N° 72 Février 2011) [10].

Les biofilms peuvent se former sur une surface muqueuse, l'estomac (flore intestinale), des surfaces industrielles, un caillou,.... etc. Vers la fin des années 90, il est devenu clair que ces biofilms posaient des problèmes en médecine et dans le milieu industriel, affectant notamment les cathéters, les sondes urinaires, les lentilles de contact. 60 % des infections nosocomiales seraient de près ou de loin liées à la formation de biofilms : les infections urinaires, par exemple, sont dues à des biofilms dans la vessie. De plus, dans un biofilm, les bactéries acquièrent des propriétés particulières : leur résistance aux antibiotiques est très élevée comparée aux mêmes bactéries isolées. L'importance de ce domaine d'étude relativement récent est donc vitale. La recherche sur les molécules qui permettent l'adhésion des bactéries aux surfaces, bien logiquement nommées « adhésines », est très active. L'unité de recherche de Génétique des Biofilms dirigée par Jean-Marc Ghigo consacre ses recherches à ce seul phénomène. Elle collabore aussi avec l'Institut Curie pour étudier les biofilms sur des chambres implantables à savoir des réservoirs implantés sous la peau pour l'injection de médicaments [10].

1.2.5 Les outils pour tracer des épidémies

D'autres travaux sont utiles face au problème des infections nosocomiales. Par exemple, la mise au point d'outils permettant de tracer l'origine des souches en cause en cas d'épidémies. Un tel outil a été mis au point pour *Klebsiella pneumoniae*, une bactérie responsable d'infections urinaires, respiratoires et du sang, au 7^e rang des infections nosocomiales en fréquence. Le groupe de Sylvain Brisse (Plate-forme de Génomique des Pathogènes et santé publique) de l'Institut Pasteur à Paris, a mis au point à partir des empreintes génétiques de souches isolées de maladies nosocomiales un véritable « annuaire des klebsielles ». Comportant 550 souches, il est utilisé à l'international. Il permet aux épidémiologistes de retrouver, à l'échelle mondiale, l'origine des souches épidémiques, et à un hôpital de savoir par exemple si la souche qui le touche a été ou non importée [10].

Si les staphylocoques ou les klebsielles que nous avons citées peuvent affecter n'importe quel service hospitalier, certains germes se cantonnent très spécifiquement à certains malades. C'est le cas d'un champignon filamenteux nommé *Aspergillus fumigatus*, première cause d'infection nosocomiale chez les patients atteints de leucémies. Ceux-ci, pour

bénéficier d'une allogreffe de moëlle osseuse, passent par un état d'immunosuppression profonde et risquent alors d'être infectés par voie aérienne par ce champignon qui se développe dans les poumons puis dans d'autres organes. Les traitements antifongiques sont très coûteux (75 000 € par patient), peu efficaces, et le taux de mortalité est très élevé. « Il y a 50 000 cas annuels d'aspergillose invasive en Europe », souligne Jean-Paul Latgé, responsable de l'Unité des Aspergillus de l'Institut Pasteur à Paris. « Un de nos objectifs est d'améliorer le diagnostic sérologique, actuellement basé sur une méthodologie développée en grande partie cette unité [10].

Tableau 2 : les agents pathogènes (majoritairement les bactéries) les plus fréquents dans les Infections Nosocomiales.

	HABITAT PRÉFÉRENTIEL	MODE(S) DE TRANSMISSION	PORTE(S) DENTURE A L'HOPITAL	PRINCIPALES PATHOLOGIES NOSOCOMIALES	MENTION PARTICULIERE
PARASITES					
<i>Pédicules capitis</i> (pou de tête) <i>Pédicules corporis</i> (pou de corps) <i>Pédicules pubis</i> (pou de pubis ou morpion) <i>Sarcoptes scape hominis</i>	Humain (zones pileuses) Environnemental (vêtements, literie, matériel de toilette ...) Humain	Contact direct Contact indirect Contact direct Contact indirect	Poils, cheveux Cutanéomuqueux	Pédiculose Gale	
LEVURES					
<i>Aspergillus sp</i> (<i>A. flavus</i> , <i>niger</i> , ...)	Environnemental (végétaux, sol, poussières)	Aéroporté (exclusivement à partir de l'environnement)	Respiratoire	Aspergilliose invasive chez l'immunodéprimé (SIDA, transplantés)	
<i>Candida sp</i> (<i>C. albicans</i> , <i>glabrata</i> , <i>krusei</i> ...) <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Pneumocystose carinii hominis</i>	Humain Animal Environnemental Animal (pigeons) Environnemental Humain	Contact direct Contact indirect (manuportage) Aéroporté Gouttelettes	Cutané- muqueuse Digestive Endogène Respiratoire Respiratoire Endogène	Candidose cutanéomuqueuse chez l'immunocompétent et l'immunodéprimé Méningo-encéphalite Pneumopathie Septicémie chez l'immunodéprimé Pneumocystose invasive chez l'immunodéprimé	
BACILLES A GRAM POSITIF					
<i>Clostridium difficile</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Humain (TD) Animal (TD) Environnemental (spores) Environnemental (végétaux, sol, poussières, aliments)	Contact indirect (manuportage) Contact direct (rare) Contact indirect	Digestive Endogène Digestive Respiratoire	Diarrhée post-antibiothérapie Colite pseudomembraneuse Listériose chez l'immunodéprimé (méningite, méningo-encéphalite, septicémie ...)	Diffusion d'un clone épidémique dénommé O27, responsable de formes sévères, surtout dans les institutions de personnes âgées.

	HABITAT PREFERENTIEL	MODE(S) DE TRANSMISSION	PORTE(S) D'ENTREE A L'HOPITAL	PRINCIPALES PATHOLOGIES NOSOCOMIALES	MENTION PARTICULIERE
*					
COCCI A GRAM POSITIF					
Enterococcus sp (E. faecalis, faecium) (entérocoques)	Humain (TD) Animal (TD) Environnemental (eaux, aliments)	Contact indirect (manuportage)	Digestive Endogène	Infection urinaire Bactériémie Suppuration	Emergence de souches résistantes à la vancomycine (ERV) devront faire l'objet de mesures de prévention très renforcées pour éviter leur dissémination.
Staphylococcus aureus (staphylocoque doré)	Humain (peau, rhinopharynx, vagin) Environnemental (poussières, aliments)	Contact direct Contact indirect (manuportage)	Cutanéo-muqueuse Percutanée Digestive Respiratoire Endogène	Staphylococcie : Infection de la peau et des parties molles (plaie, brûlure) Pneumopathie Bactériémie, septicémie Infection urinaire Infection ostéo-articulaire Infection sur cathéter et sur prothèse Toxi-infection alimentaire	Bactéries souvent multirésistantes aux antibiotiques : SARM ou S. aureus résistant à la méthicilline ; VISA (ou GISA) ou S. aureus de sensibilité diminuée à la vancomycine (ou aux glycopeptides). Ces bactéries doivent faire l'objet de mesures de prévention très renforcées pour éviter leur dissémination.
Staphylocoques à coagulase Négative (S. hominis, S. épidermoïdes, S. capitis ...)	Humain (peau, muqueuses) Animal (peau, muqueuses) Environnemental	Contact direct Contact indirect (manuportage)	Cutanéo-muqueuse Percutanée Endogène	Staphylococcie Bactériémie Infections sur cathéter et sur prothèse	
Streptococcus agalactiae (streptocoque B)	Humain (TD, vagin)	Contact direct Contact indirect (manuportage)	Cutanéo-muqueuse Digestive Respiratoire Endogène Materno-foetale	Méningite Bactériémie, endocardite Péritonite Pneumonie Infection cutanéomuqueuse Infection urinaire Infection du nouveau-né à l'accouchement	
Streptococcus pneumoniae (pneumocoque)	Humain et animal (voies aériennes supérieures)	Gouttelettes	Respiratoire Endogène	Pneumonie Bronchite Infections ORL Bactériémie Méningite Arthrite	Bactéries pouvant présenter une sensibilité diminuée à l'amoxicilline.

	HABITAT PREFERENTIEL	MODE(S) DE TRANSMISSION	PORTE(S) D'ENTREE A L'HOPITAL	PRINCIPALES PATHOLOGIES NOSOCOMIALES	MENTION PARTICULIERE
COCCI A GRAM POSITIF					
<i>Streptococcus pyogènes</i> (streptocoque A)	Humain (voies aériennes supérieures)	Gouttelettes Contact direct Contact indirect (manuportage)	Cutanéo-muqueuse Respiratoire Endogène	Scarlatine Angine Infections de la peau et des parties molles (fasciste nécrosante) Erysipèle Bactériémie – choc toxique Rhumatisme articulaire aiguë Erythème noueux Glomérulonéphrite Infections génitales gravissimes post accouchement ou chirurgie gynécologique	
BACILLES A GRAM NEGATIF					
ENTEROBACTERIES <i>Enterobacter sp</i> (<i>E. aerogenes, cloacae</i> ...)	Humain (TD) Animal (TD) Environnemental (sol, eau, végétaux)	Contact indirect (manuportage)	Cutanéo-muqueuse Digestive Respiratoire Endogène	Pneumopathie Suppuration Bactériémie Infection urinaire	Une surveillance particulièrement vigilante doit être mise en œuvre pour dépister les entérobactéries porteuses de gènes de multirésistance aux antibiotiques (β lactamases à spectre élargi ou BLSE, imipénèmes) et pour éviter leur propagation nosocomiale.
<i>Escherichia Coli</i>	Humain (TD) Animal (TD) Environnemental (eau, aliments)	Contact indirect (manuportage)	Digestive Endogène	Diarrhée Suppuration Infections urinaire et génitale Bactériémie Méningite Toxi-infection alimentaire	
<i>Klebsiella sp</i> (<i>K. pneumoniae, oxytoca</i>)	Humain (TD) Animal (TD) Environnemental (sol, eau, végétaux)	Contact indirect (manuportage)	Cutanéo-muqueuse Digestive Respiratoire Endogène	Suppuration Bactériémie Pneumopathie Infection urinaire	

*	HABITAT PREFERENTIEL	MODE(S) DE TRANSMISSION	PORTE(S) D'ENTREE A L'HOPITAL	PRINCIPALES PATHOLOGIES NOSOCOMIALES	MENTION PARTICULIERE
AUTRES BACILLES A GRAM NEGATIF					
<i>Burkholderia cepacia</i>	Environnemental (eau, sol)	Contact indirect (manuportage)	Digestive Respiratoire	Pneumopathie	Bactérie souvent multirésistante aux antibiotiques.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Humain (muqueuses) Animal (muqueuses)	Gouttelettes	Respiratoire	Pneumopathie, Bronchite, Infections, ORL, Méningite, Epiglottite	
<i>Legionella sp</i> (<i>L. pneumophila</i> , ...)	Environnemental (eaux tièdes, climatiseurs)	Gouttelettes	Respiratoire	Légionellose : Pneumopathie Fièvre de Pontiac	Contamination à partir des réservoirs d'eau chaude ou tiède (douches, hydrothérapie, balnéothérapie...) justifiant une surveillance environnementale.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (bacille pyocyanique)	Humain (TD) Environnemental (eau, sol, végétaux)	Contact indirect (manuportage)	Respiratoire Endogène Cutanéomuqueuse Digestive	(plaie, brûlure), Bactériémie, Suppuration, Pneumopathie Infection urinaire Infection de la peau et des parties molles	Bactérie souvent multirésistante aux antibiotiques et notamment à la ticarcilline.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Environnemental (sol, végétaux)	Contact indirect (manuportage)	Digestive Respiratoire	Pneumopathie Bactériémie	Bactérie souvent multirésistante aux antibiotiques.
AUTRES BACTERIES					
<i>Mycobactéries</i> - Tuberculeuses (<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>bovis</i> , <i>africanum</i>) - atypiques (<i>M. avium-intracellulare</i> , <i>xenopi</i> ...)	Humain (également bovin pour <i>M. bovis</i>) Animal Environnemental	Aéroporté Gouttelettes Gouttelettes Contact indirect (eau)	Respiratoire Endogène Cutanéomuqueuse Respiratoire Per-opératoire	Tuberculose pulmonaire Tuberculose extra-pulmonaire Méningite tuberculeuse Infection respiratoire basse Infection ganglionnaire Infection disséminée chez l'immunodéprimé	Emergence de souches de mycobactéries tuberculeuses multirésistantes aux antituberculeux.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Humain (voies aériennes supérieures)	Gouttelettes	Respiratoire	Pneumopathie atypique Infections ORL et respiratoire haute Formes neurologiques	

(*TD tube digestif)

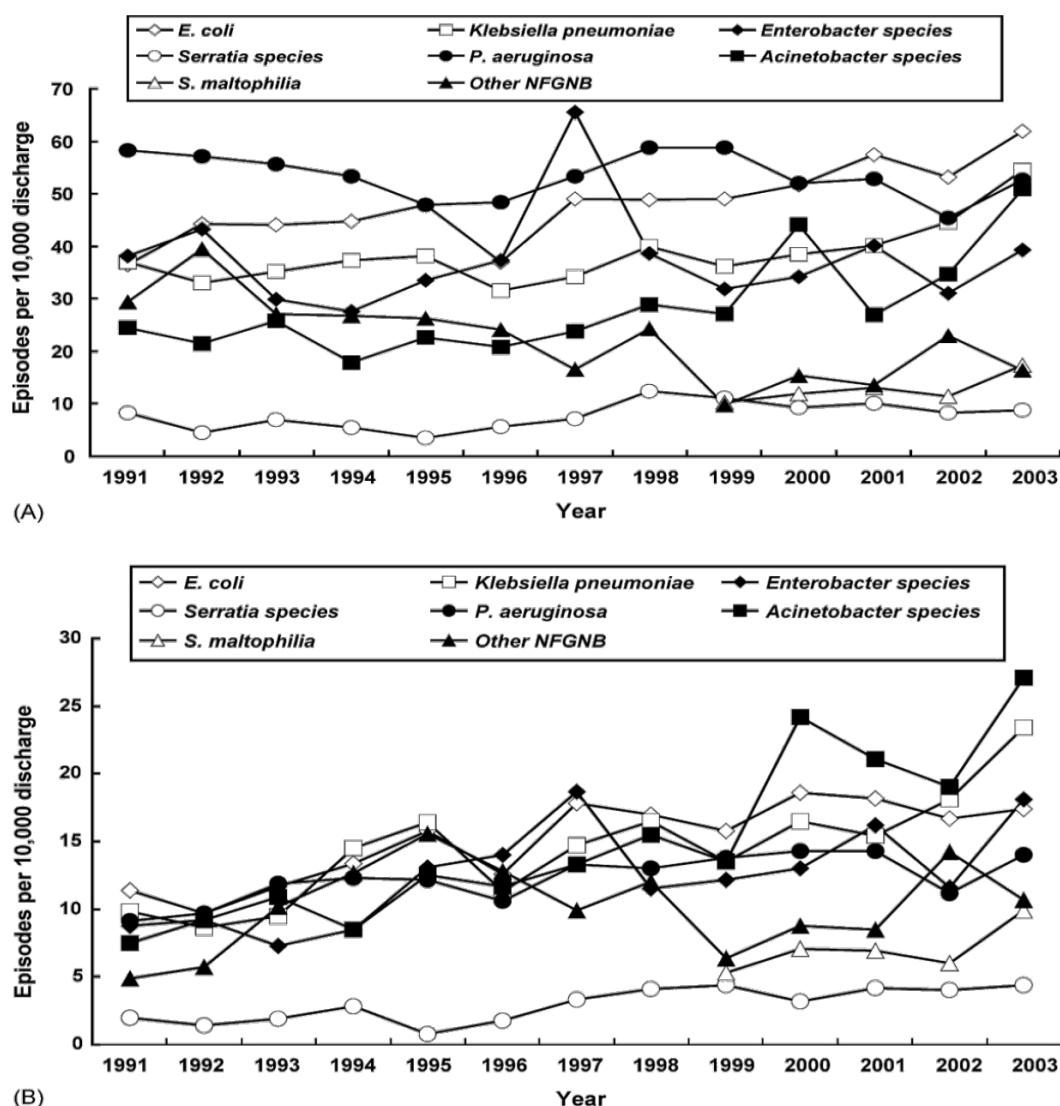


Figure 3 : graphes suivants représentent : (A) l'incidence des infections nosocomiales, (B) l'infection nosocomiale dans le sang pour plusieurs bactéries pathogène chez des patients traités à l'hôpital universitaire à Taiwan [11].

Par projection, il est possible de connaître en moyenne le nombre de patients atteints d'une infection nosocomiale sur 10 000 patients chaque année (Figure 3). Selon le graphe (A), l'espèce majoritairement impliquée dans ces infections est *P. aeruginosa*, à partir de 2001, *E. Coli* l'a remplacée. L'espèce la moins fréquente est *Serratia*.

Le graphe (B) montre une augmentation de nombre de patients qui ont eu une infection nosocomiale dans le sang chaque année avec une augmentation importante à partir de l'année 2000 et due à l'espèce *Acinetobacter*.

Le Tableau 3 démontre qu'*E. Coli* représente le taux le plus élevé concernant les bactéries responsable des UTIs, le Tableau 4 présente les différentes souches de *E. Coli* (*) ainsi que leurs sources.

Tableau 3 : les bactéries responsables des infections des voies urinaires (UTIs)
[8,12,13]

	Acquise de l'environnement	Acquise de l'hôpital	Pyélonéphrite
<i>Escherichia Coli</i>	77%	56%	69%
<i>Proteus mirabilis</i>	4%	6%	3%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4%	7%	9%
<i>Entérocoques fécales</i>	4%	9%	6%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2%	4%	—
<i>Staphylococcus saprophytique</i>	4%	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	3%	—
Autres	5%	15%	13%

Tableau 4 : les souches prototypiques d'E Coli impliqués dans la recherche des UTIs
[8,12,13].

Souche	Stéréotype	Source
536	O6:K15:H31	Patient souffrant de pyélonéphrite aiguë
83972	O nt:K5	Urine du patient avec BA ¹ (porté symptomatiquement pendant ≥ 3 ans)
CFT073	O6:K2:H1	Sang et urine d'un patient hospitalisé atteint de pyélonéphrite aiguë
F11	O139:H38	Patient avec une cystite aiguë non compliquée et une bactériurie
J96	O4:K6:H5	Patient souffrant de pyélonéphrite aiguë
NU14	O18:K1:H7	Urine d'un patient atteint de cystite aiguë (similaire à une souche de méningite néonatale)
RS218	O18:K1:H7	Le liquide céphalo-rachidien du nouveau-né avec la méningite
UTI89	O18:K1:H7	Urine du patient avec une cystite aiguë

¹ BA : la présence de bactéries dans l'urine vésicale (ponction sus-pubienne) d'un patient homme ou femme, sans signes cliniques d'infection urinaire.

1.3 Les bactéries pathogènes et la biodétection

Le développement de biocapteurs pour des microorganismes entiers est difficile. En effet, ils nécessitent la détection d'analytes beaucoup plus grands (échelle micrométrique) que les analytes moléculaires typiques tels que les protéines (échelle nanométrique) et les bactéries. Ces dernières présentent de nombreux épitopes de surface pouvant entraîner des interactions non spécifiques avec la surface du capteur.

Les bactéries ont typiquement une taille comprise entre 0,5 et 5 μm , présentant différentes morphologies, y compris des cocci sphériques, des bacilles en forme de bâtonnets et des spirilles ou des spirochètes en spirale, entre autres. Contrairement aux cellules eucaryotes, la plupart des bactéries sont encapsulées par une paroi cellulaire qui est présente à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (Figure 4). La paroi cellulaire comprend principalement du peptidoglycane, une matrice polymère chargée négativement comprenant des chaînes réticulées de sucres aminés, à savoir la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique. Les bactéries peuvent être classées comme Gram positif ou Gram négatif selon l'architecture et l'épaisseur de la paroi cellulaire. Les bactéries Gram-positives conservent la coloration Gram violette en raison de leur épaisse couche de peptidoglycane à l'extérieur de la membrane cellulaire. En revanche, les bactéries Gram-négatives ne prennent pas la tâche, car leur couche de peptidoglycane plus mince est prise en sandwich entre deux membranes cellulaires. La membrane lipidique externe des bactéries à Gram négatif contient également des lipopolysaccharides (LPS), qui agissent comme des endotoxines et provoquent une forte réponse immunitaire chez les humains, ainsi que diverses protéines, y compris les porines. La paroi épaisse de peptidoglycane entourant les bactéries Gram-positives contient des composants supplémentaires tels que des lipides, des protéines de surface et des glycoprotéines. Les bactéries pathogènes à Gram négatif comprennent *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Légionnelle*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*. Des exemples de bactéries Gram-positives pathogènes comprennent *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Clostridium* [14].

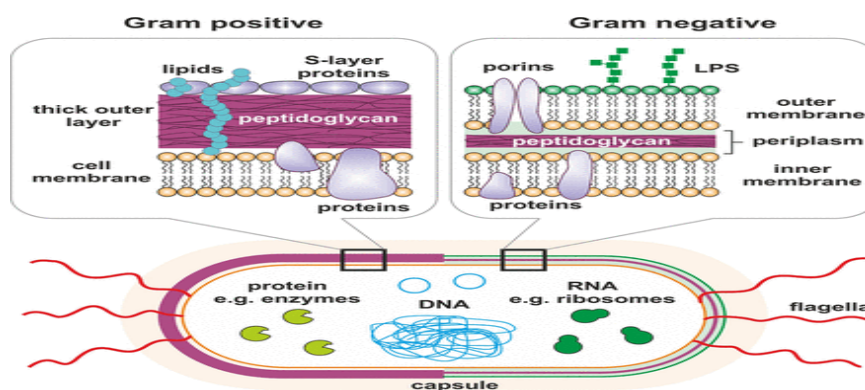


Figure 4 : architecture bactérienne et cibles pour la biodétection. Les deux types de bactéries peuvent avoir des flagelles. Les cibles intracellulaires pour la biodétection comprennent les protéines, l'ADN et l'ARN [14].

Une variété d'antigènes de surface présentés sur les enveloppes cellulaires de bactéries entières, y compris les protéines, les glycoprotéines, les lipopolysaccharides et le peptidoglycane, peuvent agir comme cibles pour la biorecognition. Certains biorécepteurs ont été développés pour cibler un de ces fragments ; par exemple, des lectines. Il s'agit d'un type de protéine liant les hydrates de carbone et pouvant être utilisé comme biorécepteurs pour des sucres d'enveloppe cellulaire spécifiques [15,16]. Des bactériophages, virus qui se lient à des protéines réceptrices bactériennes spécifiques afin d'infecter les cellules hôtes, ont également été utilisés pour la détection bactérienne [17,18]. Les anticorps polyclonaux dirigés contre des souches bactériennes spécifiques sont les biorécepteurs les plus couramment utilisés pour la détection de cellules bactériennes entières où les cibles de liaison sur l'enveloppe cellulaire sont généralement inconnues. Pour augmenter la spécificité et la sensibilité du capteur, des épitopes de surface isolés peuvent être utilisés pour produire des anticorps monoclonaux [19,20].

Dans les dernières décennies, de gros efforts ont été consacrés à la conception et à la réalisation de systèmes de détection toujours plus précis et moins chers avec des possibilités élevées de détecter des traces chimiques dans le domaine de l'environnement, du génie chimique, des applications médicales, de la sûreté et du contrôle qualité. Un capteur présentant des performances accrues doit fonctionner avec des matériaux hautement sensibles : les transducteurs, et des interfaces électroniques appropriées. En outre, la simplicité, la rapidité, la robustesse, aussi bien que la taille et la fiabilité sont des qualités essentielles qui sont devenues d'importance fondamentale pour surveiller les polluants dans l'atmosphère ou des agents pathogènes. Selon une enquête nationale de prévalence (ENP) assez récente (2012) des infections nosocomiales (IN), les trois micro-organismes les plus

fréquents étaient *Escherichia Coli* (17,6 %), *Staphylococcus aureus* (38,1 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (12%). Dans ce contexte national, qui peut être étendu au milieu hospitalier mondial, il paraît nécessaire d'apporter une réponse relative à la détection de ces agents.

Les bactéries pathogènes sont omniprésentes et représentent un risque important pour la santé humaine et animale, en plus de compromettre gravement la qualité des produits agricoles (Tableau 5). Par conséquent, la surveillance de ces micro-organismes est d'une importance primordiale pour la prévention des infections nosocomiales, le maintien de la santé publique générale et pour le respect des normes législatives et de qualité. La détection rapide et l'identification d'un agent pathogène sont essentielles lorsque l'administration d'urgence d'un agent antimicrobien approprié est nécessaire pour traiter un potentiel infectieux mortel. Par conséquent, le développement de méthodes de détection appropriées permettant une analyse précise, rapide et sensible est essentiel pour surveiller la distribution des pathogènes et, surtout, assurer la sécurité des clients / patients [21].

Tableau 3 : sélection de quelques bactéries pathogènes et leur trait pathogène [21].

Bactéries Pathogènes	Trait pathogènes
Bacillus anthracis	Agent pathogène humain ; agent causatif de l'anthrax; producteur de toxine
Bacillus subtilis	Agent pathogène humain putatif : agent causal d'intoxication alimentaire
Brucella abortus	Agent pathogène humain et animal ; agent causal de la brucellose
Campylobacter sp. et C. jejuni	Agent pathogène humain ; agent causatif de la campylobactériose
Clostridium botulinum	Agent pathogène humain ; producteur de neurotoxines et agent causal du botulisme
Escherichia Coli O157:H7	Agent pathogène humain ; agent causal des maladies d'origine alimentaire et producteur de toxines, telles que la vérocytoxine ou la toxine «semblable à la shiga»
Francisella tularensis	Agent pathogène d'origine animale ; biohazard putatif
Legionella pneumophila	Agent pathogène humain ; agent causal de la maladie du légionnaire (légionellose)
Listeria monocytogenes	Agent pathogène humain ; agent causal de listériose
Mycobacterium tuberculosis	Agent pathogène humain ; agent causal de la tuberculose
Neisseria meningitidis	Agent pathogène humain ; agent causal de la méningite bactérienne
Salmonella typhimurium	Agent pathogène humain ; agent causal de salmonellose
Staphylococcus aureus	Agent pathogène humain ; agent causal d'infection acquise à l'hôpital, producteur de toxines
Yersinia enterocolitica	Agent pathogène humain ; agent causal de la yersiniose
Yersinia pestis	Agent pathogène humain ; agent causal potentiel de la peste noire

Escherichia Coli est une bactérie provoquant principalement de la diarrhée chez l'Homme. L'Escherichia Coli O157:H7 est la souche d'Escherichia Coli hémorragique (ECEH) la plus fréquemment étudiée en laboratoire. Cette bactérie semble surtout présente chez les mammifères ruminants comme les bovins et les cervidés. La contamination peut avoir lieu en mangeant de la viande contaminée insuffisamment cuite ou du lait cru. Elle peut aussi provenir d'aliments (ex. : légumes) et de l'eau souillés par des selles contaminées. Les symptômes sont des crampes abdominales et une diarrhée importante, parfois sanglante. Dans la majorité des cas, cette infection guérit sans laisser de séquelles : il suffit de beaucoup s'hydrater en attendant (les antibiotiques sont inefficaces). Toutefois, chez les sujets à risque (jeunes enfants, personnes âgées), l'infection peut évoluer en Syndrome Hémolytique et Urémique (SHU). Ce dernier peut entraîner une insuffisance rénale, des atteintes cérébrales, le coma voire même la mort. Le traitement du SHU implique parfois une dialyse ou une plasmaphérèse (filtrage du sang via un appareil).

Des tests de culture microbiologique standard sont effectués pour détecter les bactéries. Mais ces techniques prennent du temps et nécessitent du personnel qualifié et les résultats sont obtenus dans les 24 à 48 h. L'objectif de ce travail vise à développer un immunocapteur pour la détection de ces pathogènes avec une détection rapide en quelques minutes. En effet, de nombreuses études récentes sont axées sur la détection de la bactérie Escherichia Coli (E. Coli) et de la salmonelle avec différentes techniques de transduction. Celles-ci comprennent les techniques électrochimiques QCM [22], SPR [22], capacitives [23] et ampérométriques [24]

1.1.1. La bactérie d'intérêt : Escherichia Coli uropathogène

Les souches d'E. Coli responsables des infections urinaires sont appelées E. Coli uropathogènes (UPEC). En général, les souches UPEC diffèrent des souches commensales (flore non pathogène) en ce sens que les premières possèdent un matériel extragénétique, souvent sur des îlots associés à la pathogénicité (PAIs). Ils codent pour des produits géniques pouvant contribuer à la pathogénèse bactérienne. Certains de ces gènes permettent à l'UPEC d'exprimer des déterminants qui sont proposés pour jouer un rôle dans la maladie. Ces facteurs comprennent les hémolysines, des protéines sécrétées, la toxine de Shiga, les lipopolysaccharides spécifiques et des capsules, les systèmes d'acquisition du fer et les adhérences fimbriales [8,25].

Un large éventail d'espèces E. Coli ne sont pas seulement inoffensives mais aussi utiles pour l'homme et l'animal car elles participent à la flore commensale. Elles entrent en

compétition contre d'autres bactéries nuisibles et qui synthétisent des vitamines aidant à la coagulation du sang (Aril JL et al., 1988) [26].

La Figure 5 représente une image réelle d'une souche E. Coli pathogène indiquant l'organelle responsable de la pathogénicité. Les appendices entourant la bactérie sont des fimbriae. Ces derniers permettent par exemple l'attachement des bactéries sur les cellules eucaryotes. Elles sont en partie responsables du pouvoir pathogène bactérien par leur fixation sur les surfaces comme la muqueuse de l'intestin grêle provoquant une diarrhée aqueuse sévère [27].

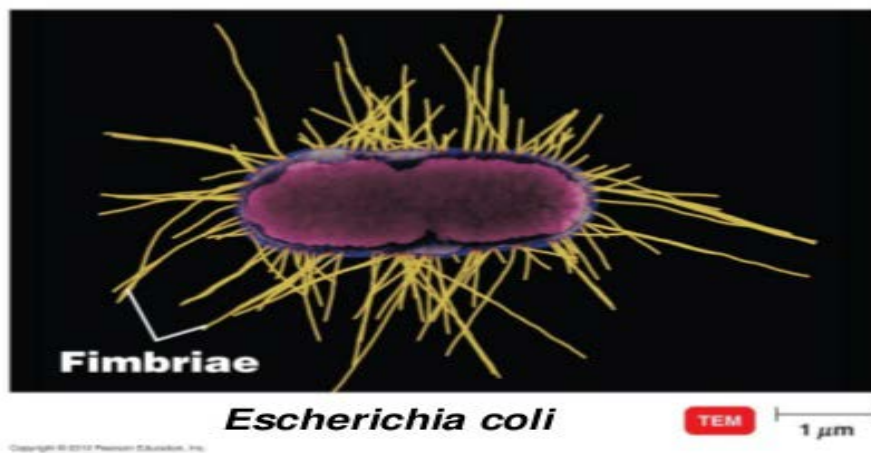


Figure 5 : image réelle d'une souche E Coli pathogène indiquant l'organelle responsable de la pathogénicité [28]

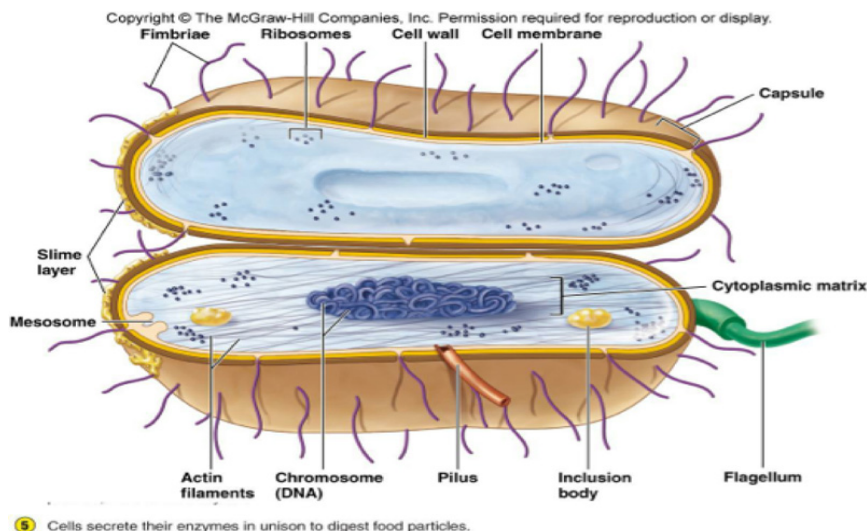


Figure 6 : illustration schématique d'un modèle d'E Coli [28]

1.3.1 Adhésions fimbriales d'Escherichia Coli

Les bactéries uropathogènes expriment des adhérences fimbriales avec lesquelles elles se lient aux glycoprotéines et aux glycolipides de la surface épithéliale. Les fimbriae sont des structures filamenteuses qui partent de la surface des bactéries avec une protéine adhésine à leur extrémité. Elles sont responsables de la liaison à l'épithélium hôte. La présence de fimbriae est significativement liée avec la pathogénicité [13].

Une variété surprenante d'adhérences fimbriales a été trouvée chez E. Coli; plusieurs groupes non apparentés de telles protéines ont été largement caractérisés. Les fimbriae d'E. Coli sont fortement immunogènes. Leur interaction continue avec les défenses de l'hôte leur a imposé une forte pression sélective. Ces facteurs de virulence importants peuvent être exploités de diverses manières dans la production d'agents de vaccination [29] et la production des anticorps polyclonaux pour la détection de ces UPECs.

Par exemple, cela peut être détecté par un immunocapteur à base d'anticorps anti-fimbrial [25].

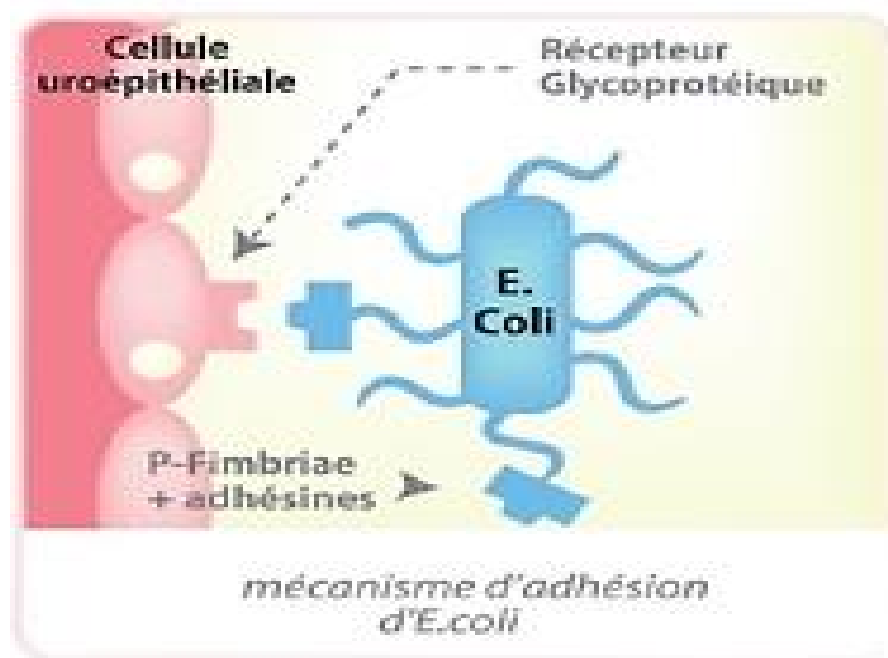


Figure 7 : illustration schématique de l'adhésion d'E. Coli à l'aide des fimbriae [30]

1.3.2 La reconnaissance du pathogène par le système immunitaire

La détection est effectuée principalement par les cellules dendritiques : les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. De plus, les cellules épithéliales les détectent aux portes d'entrées (respiratoire, urogénital, digestive...). Cette reconnaissance signale premièrement l'arrivée du pathogène. Ensuite, elle signale le type de pathogène selon les récepteurs de type Toll (en anglais Toll-like receptors, TLR) impliqués [31,32]. Ces derniers appartiennent à la famille des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires qui représentent une famille de protéines impliquées dans la détection innée de composants microbiens conservés. Ils sont composés de répétitions riches en leucine contenant un domaine extracellulaire et un domaine cytoplasmique Toll / Interleukin-1 récepteur / résistance (TIR). Celui-ci est responsable du déclenchement des cascades de signalisation en aval et de la réponse inflammatoire subséquente, conduisant finalement à l'élimination des agents infectieux [33,34].

La diversité des anticorps pose un problème génétique particulier : comment un animal peut produire plus d'anticorps que de gènes dans son génome ? (Le génome humain, par exemple, contient moins de 50 000 gènes). Ce problème n'est pas aussi redoutable qu'il n'y paraît. Rappelons que les régions variables des chaînes légères et lourdes d'anticorps forment habituellement le site de liaison à l'antigène. Ainsi, un animal avec 1000 gènes codant pour des chaînes légères et 1000 gènes codant pour des chaînes lourdes pourrait, en principe, combiner ses produits de 1000×1000 façons différentes aux sites de liaison des différents antigènes (en réalité, chaque chaîne lourde crée un site de liaison à l'antigène). Néanmoins, le système immunitaire des mammifères a développé des mécanismes génétiques uniques. Cela lui permet de générer un nombre presque illimité de chaînes légères et lourdes de différentes d'une manière remarquablement économique. Ça suit un ordre strict en réunissant des segments de gènes séparés avant qu'ils ne soient transcrits [35,36].

1.3.3 L'obtention des anticorps anti-fimbriaux l'UPEC

Selon une recherche récente, les anticorps anti-fimbriaux d'E. Coli uropathogène (O157:H7) ont été obtenus en immunisant des rats avec des fimbriae purifiées. Ces anticorps ont été par la suite délipidés (débarassés des lipides) et purifiés sur une colonne de chromatographie d'affinité HiFliQ Protéine A (CliniSciences) et dilués à 1 mg/mL de concentration dans du tampon citrate de sodium à pH 5,6, puis évalué par la technique ELISA [37,38].

1.4 Le biocapteur

L'utilisation d'un composé biologique au sein d'un biocapteur permet de lui apporter une grande spécificité. Les ligands les plus souvent employés sont les enzymes et les anticorps. Mais les cellules entières, les organites cellulaires, les acides nucléiques, les antigènes ou encore les récepteurs peuvent aussi être utilisés. Il est en fait possible d'utiliser toute molécule biologique permettant l'analyse spécifique de l'analyte recherché. Les composés biologiques fixés peuvent être séparés en deux catégories : ceux ayant une activité catalytique, comme les enzymes et les microorganismes, et ceux fixant simplement l'analyte sans modification, comme les anticorps et les récepteurs. L'étape de reconnaissance peut donc révéler un événement soit dynamique soit statique. La reconnaissance dynamique est principalement employée pour les biocapteurs à enzymes, alors que la reconnaissance statique est surtout utilisée pour les biocapteurs étudiant la formation d'un complexe anticorps-antigène. Chaque type d'événement peut produire un changement transformé en un signal quantifiable par le transducteur.

Le biorécepteur immobilisé constituant la couche sensible du biocapteur est de nature diverse selon le type de molécules à détecter. En théorie, toute structure biochimique ou biologique capable de reconnaissance spécifique est potentiellement utilisable pour l'élaboration de la couche sensible. Les biorécepteurs peuvent être classés en deux types, selon qu'ils sont naturels ou artificiels.

De nombreux biocapteurs permettant le diagnostic de diverses maladies infectieuses ont été décrits dans la littérature. Ces dispositifs sont soit des immunocapteurs soit des biocapteurs à ADN.

Le nombre de maladies infectieuses et de biocapteurs dédiés à leur diagnostic étant considérable, il est impossible, de décrire la totalité des dispositifs permettant le diagnostic de ces nombreuses maladies infectieuses. D'autant plus que les pratiques en vigueur pour la prévention des maladies microbiennes reposent sur un contrôle minutieux de divers types de bactéries pathogènes en médecine clinique, la sécurité alimentaire et la surveillance environnementale. Environ 5 millions de tests analytiques (pour *Salmonella* uniquement) sont effectuées chaque année aux États-Unis [39–42].

Le concept des biocapteurs a été initié en 1962 par Clark & Lyons, ils ont réalisé un biocapteur pour mesurer le taux de sucre dans le sang et, depuis, ce domaine a largement évolué. Cependant, un grand manque est constaté par rapport à leurs applications pratiques.

Plusieurs biocapteurs n'ont pas été validés *in situ* sur des échantillons réels et l'écart existe toujours entre la théorie et l'expérience.

D'après Gronow [43,44], un biocapteur est un dispositif analytique qui converti une réponse d'un composé biologique immobilisé, appelé « ligand » relié au transducteur, à un signal physique quantifiable (Figure 8). Selon l'Union internationale de la chimie pure et appliquée (IUPAC), un biocapteur doit être miniaturisé et compact, avoir un signal réversible et précis (réactions « *on-off* ») et établir une connexion réelle entre le matériel biologique et le transducteur. Le terme « biocapteur » est souvent utilisé pour couvrir les dispositifs de détection utilisés pour déterminer la concentration de substances et d'autres paramètres d'intérêt biologique même lorsqu'ils n'utilisent pas directement un système biologique. Cette définition très large est utilisée par certaines revues scientifiques (par exemple : Biosensors, Elsevier Applied Science).

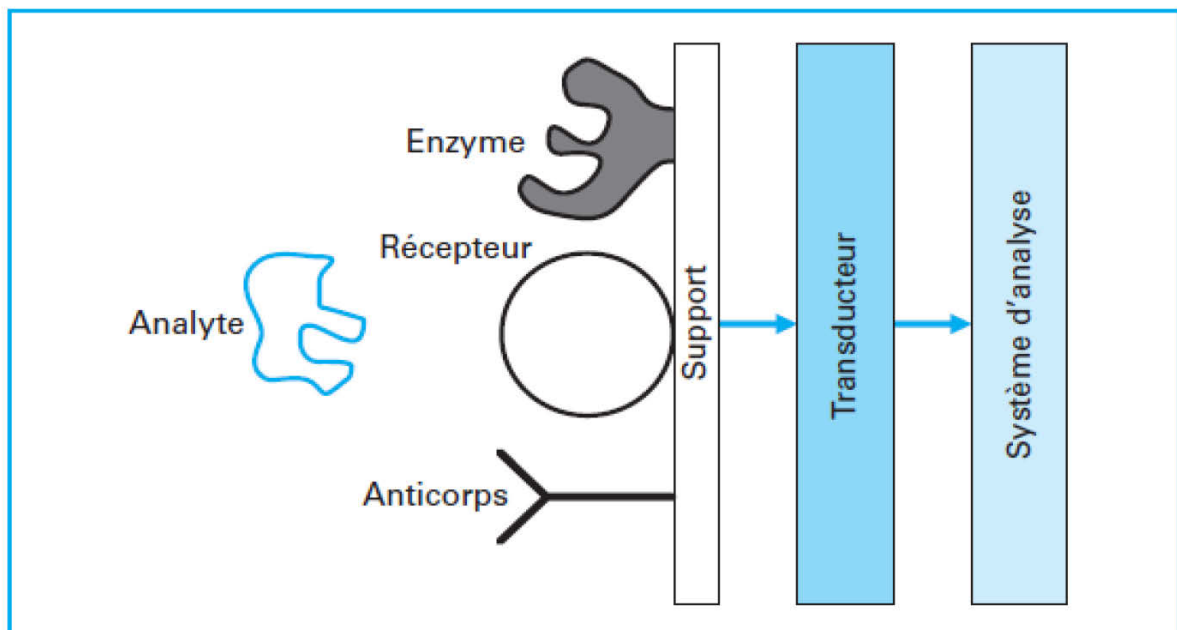


Figure 8 : schéma simplifié d'un biocapteur avec l'analyte, le ligand immobilisé sur le support, le transducteur et l'appareil de mesure du signal [43].

Les biocapteurs sont des systèmes analytiques permettant la détection et le dosage de substances d'intérêt biologique. Le fonctionnement d'un biocapteur est basé sur l'association d'un composant biologique appelé bio récepteur, et d'un transducteur physico-chimique.

L'élément le plus important lors du développement d'un biocapteur est la préservation de l'activité et de la stabilité du ligand greffé sur la partie fonctionnalisée du transducteur et garantir la diffusion de l'analyte vers la surface du capteur. Le fait d'utiliser des molécules

biologiques immobilisées permet la régénération du capteur permettant la simplification et l'éventuelle automatisation de l'appareil, surtout sur le point économique [43].

En conclusion, la qualité d'un biocapteur pour la détection de microorganismes pathogènes va grandement dépendre :

- de la qualité de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène et, en particulier, de son affinité ;
- de la sensibilité du système de détection ;
- de l'influence de la matrice dans lequel le pathogène se trouve.

Les conditions à remplir dans la technologie des biocapteurs sont énumérées dans le Tableau 6.

Tableau 4 : résumé des exigences des biocapteurs de bactéries [39]

Faible limite de détection	<i>Capacité à détecter une seule bactérie dans un petit volume d'échantillon (de 1 à 100 mL).</i>
Sélectivité d'espèce	<i>Capacité à distinguer les espèces bactériennes individuelles en présence d'autres micro-organismes ou cellules</i>
Sélectivité de souche	<i>Capacité de distinguer une souche bactérienne individuelle des autres souches de la même espèce</i>
Time de test	<i>5±10 min pour un seul test</i>
Précision	<i>5±7 %</i>
Protocol	<i>Pas besoin d'ajouter un réactif</i>
Mesure	<i>Directe sans pré-enrichissement</i>
Format	<i>Format très automatisé (dispositif à bouton unique)</i>
Opérateur	<i>Aucune compétence nécessaire pour faire le test</i>
Nombre de cellules vivantes	<i>La distinction entre les cellules vivantes et mortes</i>
Taille	<i>Compact, portable, portatif, conçu pour une utilisation sur le terrain</i>

1.4.1 Le métabolisme microbiologique du Biocapteur

Les Méthodes classiques d'identification des bactéries comprennent généralement une évaluation morphologique du micro-organisme ainsi que des tests de la capacité de l'organisme à se développer dans divers milieux sous des conditions variables. Même si les techniques microbiologiques standards permettent la détection d'une seule bactérie, l'amplification du signal est nécessaire par la croissance d'une seule cellule dans une colonie. Les méthodes microbiologiques sont généralement réparties en 4 phases distinctes [39,42]:

- 1) Pré-enrichissement, pour permettre la croissance de tous les organismes ;
- 2) Enrichissement sélectif, pour permettre la croissance de l'organisme à étudier et à augmenter la population bactérienne à un niveau détectable ;
- 3) Isolement, en utilisant des plaques de gélose sélectives ;
- 4) Mise en conformité. Les tests sérologiques et biochimiques viennent confirmer l'identification d'un organisme pathogène particulier.

Les principaux inconvénients des procédés classiques sont les étapes multiples d'analyses et le temps du procédé. L'achèvement de toutes les phases nécessite au moins 16 à

48 heures. La limite de détection est généralement de 10^5 à 10^6 cellules / mL sans pré-enrichissement. Ainsi, les techniques classiques ne sont pas adaptées pour une analyse rapide et directe de bactéries sans pré-enrichissement.

Les biocapteurs pour la détection bactérienne impliquent généralement un composant de reconnaissance biologique tel que les récepteurs, des acides nucléiques ou des anticorps fixés à un transducteur approprié. Selon la méthode de transduction du signal, les biocapteurs peuvent être divisés en quatre groupes, optiques, masses, électrochimiques et thermiques [45–49].

Les micro-organismes sont capables de transformer les réactions d'oxydo-réduction du métabolisme en signaux électriques mesurables par des réactions d'oxydoréductase à l'aide d'un catalyseur approprié. La teneur microbienne d'un échantillon peut être déterminée en contrôlant le métabolisme microbien.

Diverses combinaisons de biocapteurs basés sur la surveillance du métabolisme microbien ont été rapportées [50–57]. Ces techniques sont basées sur des mesures directes des phénomènes physiques qui se produisent lors des réactions biochimiques sur une surface de transducteur.

Le pH, la consommation d'oxygène, les concentrations d'ions, la différence de potentiel, le courant ou la résistance peuvent être mesurés par des capteurs électrochimiques. Par exemple, le transducteur peut soit détecter la consommation de l'oxygène soit l'apparition ou la disparition d'un métabolite électrochimiquement actif. Les biocapteurs électrochimiques de type CO_2 et O_2 ont été introduits pour la détermination de bactéries [55]. Ce système simple a souffert, cependant, d'une faible sensibilité à cause du bruit de fond élevé. Le temps de dosage pour la détection de 10^6 cellules / mL varie de 2 à 4 h. Les biocapteurs électrochimiques à d'électrode à oxygène ont été introduits pour la détermination de *E. Coli*, *S. aureus* et *Entérocoques serolicida* [58].

La suspension cellulaire a été filtrée à travers une membrane de nitrate de cellulose (taille des pores : 0,45 μm). La membrane ainsi que les cellules capturées ont été déposées sur la cathode de travail en platine d'une électrode à oxygène (Clark) et recouverte d'une membrane de dialyse. L'électrode ainsi modifiée a été immergée dans une solution tampon phosphatée à 0,05 M jusqu'à ce que le courant de sortie devienne stable. L'électrode a ensuite été retirée et placée dans une solution d'azoture de sodium, pour supprimer la croissance de la plupart des microorganismes sauf *Entérocoques serolicida*. Le signal de sortie du capteur est linéaire dans la plage de $1,46 \times 10^7$ à $7,26 \times 10^7$ cellules/mL avec un temps d'essai de 2 heures. La plage linéaire de l'électrode à l'oxygène est limitée en raison de faibles concentrations

d'oxygène. En outre, la réponse a varié suite à des variations en concentrations d'oxygène circulant.

Takayama et al. ont démontré que le comportement du système bioélectrocatalytique *industrius*-BQ (Benzoquinone) -électrode *Gluconobacter* est très similaire à celui observée avec un système glucose-oxydase-BQ-électrode. La glucose déshydrogénase (GDH) est une enzyme présente dans la membrane cellulaire bactérienne. Elle a été utilisée comme catalyseur pour produire le courant «BQ-mediated electrocatalytic ». Une amplitude de courant plus élevée que 200 mA/cm² a été obtenue avec 2,46x10⁶ cellules en présence de 10 mM de glucose et BQ. Un courant constant a été atteint en 30 s. Les médiateurs tels que K₃Fe(CN)₆ et le dichlorophénol indophénol sont capables d'accepter des électrons à partir de GDH ou d'une autre partie de la chaîne respiratoire dans la membrane cellulaire. Une approche intéressante a été développée pour la détermination rapide d'E. Coli en utilisant un système d'injection de flux. La mesure électrochimique de K₃Fe(CN)₆, réduit par le métabolisme microbien a permis la détermination quantitative de bactéries en 20 min. E. Coli a été détectée dans l'intervalle de 4,76x10⁶ à 2,46x10⁹ UFC/mL lorsque les micro-organismes sont séparés du milieu de culture [54].

Hitchens et al. ont décrit un procédé pour l'énumération des micro-organismes qui combine la détection électrochimique et l'analyse par injection en écoulement. Cette méthode repose sur la mesure des courants électriques générés par des microbes actifs en présence de médiateurs redox (par exemple, des accepteurs d'électrons de bas poids moléculaire) qui peut diffuser à travers la membrane cellulaire bactérienne. L'analyse des échantillons peut être effectuée en 10 min. avec une limite de détection inférieure de 10⁵ cellules/mL. Les résultats ont également fourni de nouvelles informations sur les facteurs qui limitent les limites inférieures de la sensibilité du système de détection ampérométrique [57].

1.4.2 Principaux types de biocapteurs

L'activité biologique d'un composé avec son substrat peut être suivie de différentes manières. Par exemple, cela peut être une consommation d'oxygène ou de peroxyde d'hydrogène une mesure de fluorescence, un changement de pH, de température ou de masse... De nombreux transducteurs ont été utilisés pour développer des biocapteurs. La nature du transducteur sert souvent de base pour la classification des différents biocapteurs. Les avantages et inconvénients des différents types de biocapteurs sont listés dans le Tableau 7 :

Tableau 5 : avantages et inconvénients des différents types de biocapteurs (d'après Luong et al. 1997) [43,59]

Transducteur	Avantages	Inconvénients	Applications
Electrodes sensibles aux ions	• Simple • Fiable	• Réponse lente • Nécessite une électrode de référence stable	Glutamates, urée, nitrite, acides aminés, pénicillines, cholestérol...
Electrode à oxygène	• Simple • Très spécifique	• Faible sensibilité	Glucose, sulfites, glutamate, éthanol, sucrose, lactates, cholestérol...
Electrode à peroxyde d'hydrogène	• Simple • Très sensible	• Peu spécifique	Glucose, sulfites, glutamate, cholestérol, amine biogène, acides aminés, alcools
Systèmes optiques	• Utilisables à distance • Faibles coûts • Miniaturisables • Pas d'interférence électrique	• Nécessite des sources de haute énergie • Gamme de concentrations étroite • Interférence de la lumière incidente	Acétaldéhyde, acétate, nitrate, glucose, glycérol, éthanol, galactose....
Piézoélectriques	• Réponse rapide • Simple • Faible coût • Peu de manipulation de liquides	• Faibles sensibilité dans des applications sur liquides • Fixations non spécifiques	Glucose, atrazine, Salmonella, Escherichia, toxines microbiennes....
Calorimétriques	• Universalité • Pas d'interférences optiques comme la couleur ou la turbidité	• Coûteux • Encombrant • Nécessite d'importante quantité d'enzymes	Glucose, lactate, acide ascorbique, triglycérides, cholestérol, galactose éthanol, lipides...

Les biocapteurs sont classés comme suit :

- Biocapteurs électrochimiques : ampérométriques, potentiométriques, impédancemétriques ou conductimétriques, les ISFETs (pour Ion Selective Field Effect Transistor),
- biocapteurs manométriques,
- biocapteurs piézoélectriques,
- biocapteurs thermiques,
- biocapteurs optiques : mesurant l'absorbance ou la fluorescence, utilisant le principe de l'onde évanescente, à résonance plasmonique de surface (SPR).

Dans notre étude nous allons nous focaliser sur les biocapteurs électrochimiques et plus précisément ampérométriques.

1.4.3 Biocapteurs électrochimiques

Après le premier biocapteur développé 1962 par Clark et Lyon et Updik et Hicks en 1967, sous forme des électrodes enzymatique qui permet le dosage par électrochimie du glucose dans une solution biologique [60]. Les biocapteurs ont connu un développement considérable par rapport à leurs diverses applications potentielles que ce soit dans le domaine médical, agro-alimentaire ou contrôle de l'environnement. Le principe de fonctionnement repose sur une réaction d'oxydo-réduction, ou une modification de conductivité électrique au niveau de l'électrode (interface), qui modifie un signal électrique mesurable suite à l'immobilisation du ligand ou de l'analyte sur une électrode.

Les biocapteurs électrochimiques sont classés suivant leurs modes de transductions comme les capteurs ampérométriques, potentiométriques ou les ISFETs. Les capteurs potentiométriques et ampérométriques sont les plus répandus mais peu de travaux portent sur les capteurs conductimétrique. Néanmoins, depuis les années 1980, beaucoup de travaux sont apparus sur les capteurs conductimétriques compte tenu de leur facilité d'élaboration. L'une des principales raisons de l'orientation vers les biocapteurs électrochimiques est leur coût de revient relativement faible et leur rapidité de réponse. En revanche, ils posent le problème de sélectivité par rapport à l'analyte ciblé. En effet, quand le potentiel appliqué est élevé, si l'échantillon à analyser contient des substances électroactives contaminantes ou des protéines, celles-ci vont avoir tendance à s'agglomérer sur l'électrode [43,61]. L'utilisation de ces biocapteurs pour des matrices aussi complexes que le lait demande donc de prendre en considération le problème des interférences [62].

L'avantage des biocapteurs électrochimiques par rapport aux autres systèmes d'analyse réside dans le fait qu'ils peuvent fonctionner dans des milieux turbides, offrant une sensibilité instrumentale comparable et plus favorable à la miniaturisation. Les techniques électroanalytiques modernes ont des limites de détection très basses (environs 10^{-9} M) qui peuvent être atteintes dans de petits volumes (1 à 20 μ L) d'échantillons [39,63]. En outre, la réaction en continu du système d'électrode permet un contrôle en ligne. L'équipement requis pour l'analyse électrochimique est simple et moins coûteux par rapport à la plupart des autres techniques d'analyse [39].

La quantification des processus biologiques ou biochimiques est de la plus haute importance pour les applications médicales, biologiques et biotechnologiques. Cependant, la

conversion de l'information biologique en signal électronique facilement traité est difficile en raison de la complexité de la connexion d'un dispositif électronique directement à un environnement biologique. Les biocapteurs électrochimiques fournissent un moyen attrayant pour analyser le contenu d'un échantillon biologique en raison de la conversion directe d'un événement biologique en un signal électronique. Au cours des dernières décennies, plusieurs concepts de détection et dispositifs associés ont été développés. Le premier concerne la fonctionnalisation de la surface du transducteur afin de formuler une interface biomatrice / électrode modifiée. De nombreux travaux récents se sont concentrés sur les monocouches auto-assemblées (SAM) d'alcanethiols, de sulfures qui sont chimisorbés sur diverses surfaces métalliques telles que l'or. Cela est dû à l'affinité significative des atomes de soufre vis-à-vis de l'or utilisé comme surface d'électrode. Le principe est le couplage d'un anticorps spécifique avec un transducteur d'électrode qui fonctionne pour convertir un événement de liaison en un signal électrique. Les biocapteurs électrochimiques peuvent être classés selon quatre types de transducteurs ; à savoir ampérométriques, potentiométriques, impédimétriques et conductimétriques [64,65].

De nombreux biocapteurs ampérométriques utilisent un système à base d'enzyme qui génère un produit électroactif qui peut être oxydé ou réduit au niveau d'une électrode de travail (carbone, or, etc.). Récemment, une variété de techniques ont été développées pour l'identification de E. Coli O157: H7, y compris la séparation sérologique, la morphologie des bactéries et la cytométrie de flux. Bien que ces techniques aient été utilisées avec succès pour détecter E. Coli O157: H7 dans des échantillons d'aliments, certaines de ces méthodes nécessitent des instruments sophistiqués et coûteux, ou des produits chimiques radioactifs et coûteux, ou impliquent une procédure fastidieuse. En outre, il est difficile d'utiliser certaines méthodes pour la détection rapide et la quantification d'E. Coli O157: H7 à de faibles concentrations en raison de la préparation compliquée. Par exemple, la méthode de culture microbiologique doit prendre un ou plusieurs cycles d'enrichissement et travailler durant 36 h pour obtenir les résultats de mesure. Par conséquent, il est très intéressant d'explorer une approche à faible coût pour l'identification de E. Coli O157: H7 [66].

E. Huey et al. ont développé et optimisé une méthodologie en une seule étape pour l'intégration de nanofils de silice dans un réseau de microélectrodes interdigitées. La croissance des nanofils de silice a été réalisée directement via un procédé vapeur-liquide-solide (VLS) dans un espace de microélectrodes interdigitées. L'optimisation de la croissance a été effectuée pour déterminer une température et un temps de recuit appropriés. Cela permet la croissance de nanofils denses entre des structures interdigitées et ne compromettraient pas

la structure physique / électrique des dispositifs de microélectrodes. La spectroscopie d'impédance électrochimique a été utilisée pour déterminer la viabilité de l'utilisation de ces dispositifs hybrides nano-micro pour la biodétection. Les résultats de spectroscopie d'impédance électrochimique indiquent un changement notable dans le transfert de charge pour les puces avec des nanofils par rapport aux puces sans nanofils [66].

L'un des verrous technologiques à lever par les biopuces à cellules entières est d'améliorer le rapport signal sur bruit. Il affecte directement l'efficacité de la bio-détection et la performance des biocapteurs. Quand le bruit est déterminé par l'interface frontale, l'augmentation du signal est un problème critique. Notez que c'est le cas dans la plupart des systèmes de biocapteurs électrochimiques pratiques. En conséquence, l'augmentation du rapport / signal sur bruit et la valeur absolue du signal réduisent les taux d'erreur, à la fois faux négatifs et faux positifs, et permettent un temps de réponse plus rapide. La modification de la géométrie et de la forme de l'électrode ainsi que de sa chimie de surface peuvent augmenter le signal, c'est-à-dire le courant faradique. En augmentant le courant, les biocapteurs électrochimiques peuvent également utiliser un système électronique plus simple qui peut être un composant standard; réduisant ainsi le besoin de composants analogiques spéciaux à faible signal et permettant une conception de système pouvant offrir une meilleure plage dynamique [67].

1.4.4 Biocapteurs ampérométriques

L'Ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé [63,68,69]. Elle varie en fonction de la concentration des corps électroactifs qui seront oxydés ou réduits à une électrode indicatrice. Il est donc possible, après étalonnage, de déterminer la concentration de certains corps présents, par la mesure de l'intensité. Les réactions se produisent dans une mince couche à la surface du transducteur; des concentrations stables des réactifs et des produits existent dans cette couche lorsqu'un signal constant est obtenu. L'ampérométrie est le mode le plus utilisé pour les biocapteurs enzymatiques. La majorité des dispositifs commercialisés sont des électrodes ampérométriques. De nombreux brevets ont été déposés sur ce type de biocapteurs et les applications sont très variées.

Lorsqu'une électrode ampérométrique est utilisée comme transducteur de base d'un biocapteur il y a consommation d'un des produits de la réaction : c'est la différence par rapport au mode potentiométrique. Les équations de diffusion-réaction sont applicables, si la

concentration du produit au niveau de l'interface transducteur-couche active est nulle $[P] = 0$. Cette hypothèse correspond à la sensibilité maximale du biocapteur.

La Figure 9 présente le premier biocapteur développé par Clark et Lyons en 1962 pour la détection du glucose, la glucose oxydase (GO) piégée à la surface d'une électrode de Pt par une membrane à dialyse permettant la diffusion des substrats et produits de ou vers la couche enzymatique.

La conversion du D-glucose (S) en acide gluconique (P) et eau oxygénée (H_2O_2) est détectée par électrochimie :

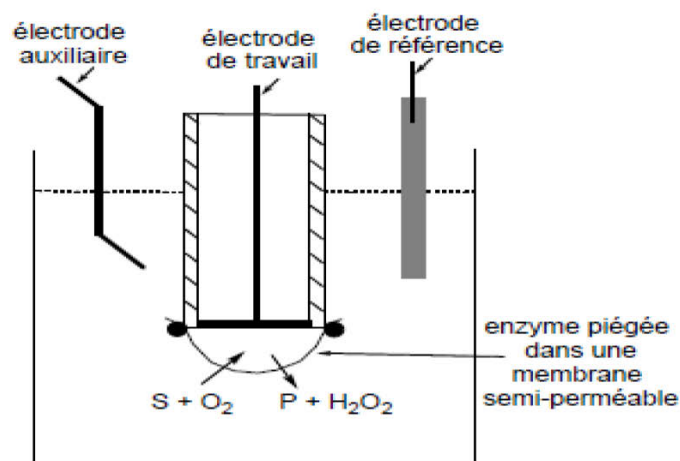


Figure 9 : capteur ampérométrique, d'après Clark et Lyons [70]

1.4.4.1 Principe de détection

Les biocapteurs ampérométriques mesurent le courant généré à un potentiel constant par une réaction de type oxydoréduction. La concentration en analyte est proportionnelle au courant généré et est déterminée grâce à des courbes d'étalonnage. Certains biocapteurs ampérométriques font partie de la famille des capteurs immunologiques. Un anticorps est fixé sur l'électrode. Cet anticorps peut être couplé directement à une enzyme de type phosphatase alcaline. Dans le cas d'un essai compétitif, c'est l'analyte qui est couplé à l'enzyme [43,71,72].

Les biocapteurs ampérométriques sont rapides, plus sensibles, plus précis et plus justes que les biocapteurs potentiométriques. Ainsi, il n'est pas nécessaire d'attendre que l'équilibre thermodynamique soit atteint et la réponse est linéaire en fonction de la concentration de

l'analyte. Cependant, la sélectivité des biocapteurs ampérométriques est seulement gouvernée par le potentiel rédox des espèces électroactives présentes. En conséquence, le courant mesuré par l'instrument peut inclure la contribution de plusieurs espèces chimiques différentes.

1.4.4.2 Les microélectrodes

Les systèmes de mesure à trois électrodes ampérométriques sont une technologie de pointe pour la détermination des toxines dans l'air, dans lequel le gaz diffuse dans une cellule électrochimique (électrodes au contact de l'électrolyte). Cela a permis la fabrication de lots à un coût relativement faible et donc d'être utilisés comme des mesures personnalisées pour les applications en santé et en surveillance. Le principal avantage de la microfabrication est la possibilité de déposer différents types de matériaux d'électrode agissant en tant que catalyseurs avec différents design tout en réduisant la distance entre les électrodes pour augmenter la sensibilité du capteur [73]. Le principe de fonctionnement du capteur repose sur la réaction de la substance active électrochimique sur l'électrode de travail, tandis que de nouvelles molécules diffusent vers l'électrode et compensent ainsi le passage du courant. Le potentiel électrique entre l'électrode de travail et l'électrode de référence est pilotée par un potentiostat et la réponse en courant est obtenue entre l'électrode de travail et la contre électrode en fonction de la concentration en analyte.

Le choix de la tension appliqué à l'électrode de travail dépend de la grandeur de mesure si elle est bien choisie. Le courant mesuré est proportionnel à la quantité de composé réduit. Pour contrôler le transfert de masse à l'interface électrolyte-électrode, une barrière de diffusion est utilisée par dépôt d'un matériau perméable sur l'électrode afin de permettre une réponse rapide et une détection de courant suffisamment élevée. Les membranes de plusieurs dizaines de micromètres peuvent être plus faciles à déposer que des membranes fines, mais la sensibilité des capteurs sera moindre. Par conséquent, l'élaboration d'un nouveau processus de microfabrication est donc toujours un compromis entre la facilité et la robustesse de fabrication et les performances du capteur [74].[75] La figure 10 illustre les différentes microélectrodes réalisées par microfabrication et étudiées par Cai et al [76].

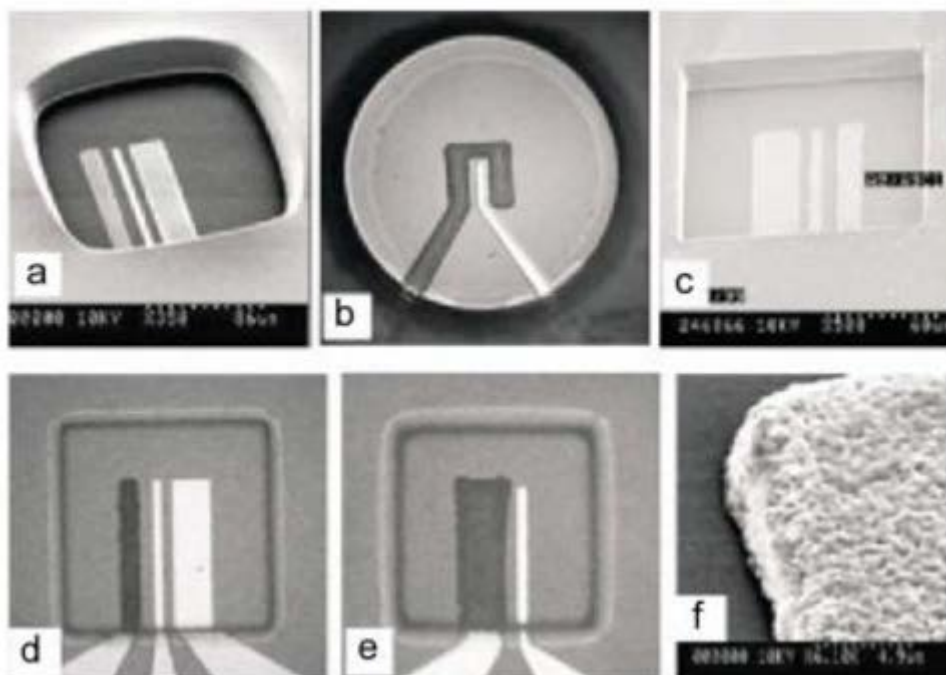


Figure 10 : (a-e) Différent designs la microfabrication des électrodes (f) électrode électrodéposé. (copyright 2000 John Wiley & Sons, Inc) [76]

1.4.4.3 Les applications des biocapteurs ampérométriques

Les transducteurs ampérométriques sont très sollicités dans l'industrie agroalimentaire spécialement pour la quantification du glucose dans les aliments. Mello & Kubota [43,77], dénombrent une quinzaine de biocapteurs dédiés à cette application. L'enzyme immobilisée à la surface du biocapteur est, dans tous les cas la glucose oxydase. Les matrices analysées sont essentiellement liquides (soda, jus de fruits, vin, lait) avec également quelques applications dédiées au miel, aux biscuits et aux yaourts. La gamme de détection, très variable suivant le type de biocapteur et la matrice analysée, s'étend généralement entre 0,01 et 50 mM.

1.4.4.4 Biocapteurs potentiométrique

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence [68,69,78]. La détermination des potentiels d'électrode permet de connaître directement la concentration du corps à doser : le signal obtenu est proportionnel au logarithme de la concentration (loi de Nernst).

Les différents transducteurs potentiométriques usuels sont l'électrode de verre pour la mesure du pH ou des ions monovalents, les électrodes spécifiques sensibles aux anions et aux cations et les électrodes à gaz telles que l'électrode à $p\text{CO}_2$ ou $p\text{NH}_3$. Ces électrodes se prêtent facilement à la réalisation de biocapteurs. Il suffit pour cela de fixer, au niveau de leur élément sensible, le biorécepteur correspondant au dosage que l'on veut effectuer. Dans le cas des capteurs enzymatiques, ce sont donc une ou plusieurs enzymes qui sont immobilisées sur le transducteur.

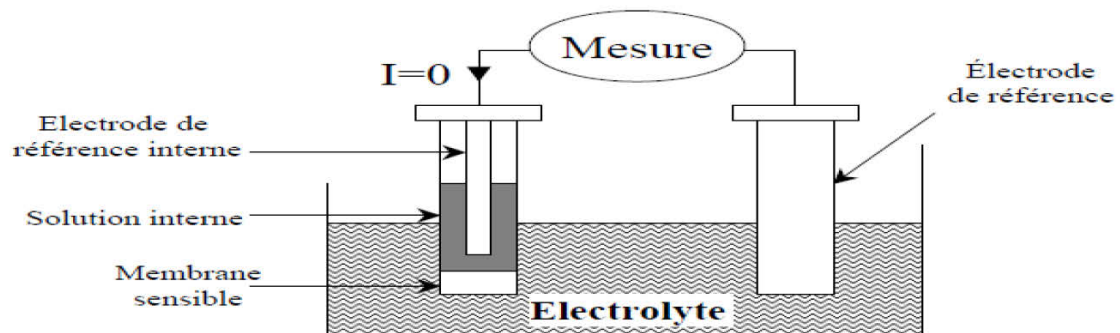


Figure 11 : capteur potentiométrique, d'après Schmitt, 1995

a. Principe de détection

La mesure du potentiel se fait par l'intermédiaire d'une électrode de référence dont le potentiel est constant et pris comme origine. En général, c'est l'électrode au calomel qui est utilisée. Elle est plongée dans la solution et disposée à côté du capteur enzymatique. Lorsque l'électrode à gaz est utilisée, l'élément de référence tel qu' Ag/AgCl est disposé dans l'électrolyte intermédiaire, à l'intérieur de l'électrode enzymatique. Le capteur enzymatique et l'électrode de référence sont branchés à un millivoltmètre à haute impédance d'entrée ($Z > 10^{12} \Omega$), associé à des circuits électriques permettant l'amplification du signal.

Il existe des travaux de recherche utilisant cette technologie pour des applications de détection de bactéries de manière indirecte, comme par exemple ceux de Yang et al [78]. Dans cet exemple, le seuil de détection est relativement faible (quelques dizaines de bactéries/mL) avec cependant un temps d'analyse d'environ 15 h. Les performances de ces capteurs se révèlent donc plutôt faibles ce qui n'apporte que peu d'intérêt en comparaison des méthodes immunologiques classiques telles que l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) qui ont également pour inconvénient de prendre beaucoup de temps. La détection de plus fortes concentrations de bactéries permet de réduire le temps d'analyse. Mais celui-ci reste cependant très élevé (6 h pour 6.5×10^5 bactéries/mL) par rapport aux autres biocapteurs

qui sont détaillés. Dans un autre article, Yang et al. immobilisent des anticorps anti-E. Coli sur des microélectrodes d'oxyde d'étain-indium (ITO). L'accrochage des bactéries E. Coli sur cette surface augmente la résistance de transfert des électrons qui est mesuré à l'aide de biocapteurs potentiométriques en présence de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ comme sonde redox. Un seuil de détection de 10^6 cfu/mL est obtenu.

1.4.4.5 Biocapteurs Impédancemétrique ou conductimétrique

Les capteurs impédancemétriques ou conductimétriques reposent sur la **mErreur ! Signet non défini.** mesure de la conductivité d'une solution électrolytique. Mais contrairement aux capteurs ampérométriques et potentiométriques, la mesure ne peut s'effectuer qu'en courant alternatif pour éviter une électrolyse qui viendrait perturber la mesure du signal. Les capteurs impédancemétriques sont généralement composés de deux plaques métalliques parallèles de surface S séparés d'une longueur l . Dans ce cas la conductance G est donnée d'après l'équation (1.2):

$$G = \sigma \frac{S}{l} \quad (1.2)$$

Avec G la conductance en S, S la surface des plaques métalliques en m^2 , l la longueur séparant les deux plaques en m, et σ la conductivité électrique en S.m^{-1} .

Cependant, certains capteurs impédancemétriques sont réalisés avec des électrodes interdigitées, ce qui permet notamment de réduire leur encombrement.

1.5 La biodétection et les anticorps

1.5.1 Introduction

Actuellement les travaux de recherche sont focalisés sur les biocapteurs pour la détection de cellules bactériennes entières (Figure 12). Dans ce contexte, les méthodes impédancemétriques et optiques sont le plus souvent utilisées. Le développement de biocapteurs pour la détection des micro-organismes entiers est un défi. Cela nécessite la détection d'analytes qui sont beaucoup plus grands (échelle micromètre) que les analytes de type moléculaire tels que les protéines (échelle nanométrique). En outre, les bactéries présentent plusieurs épitopes de surface qui peuvent conduire à des interactions non spécifiques, avec la surface du capteur.

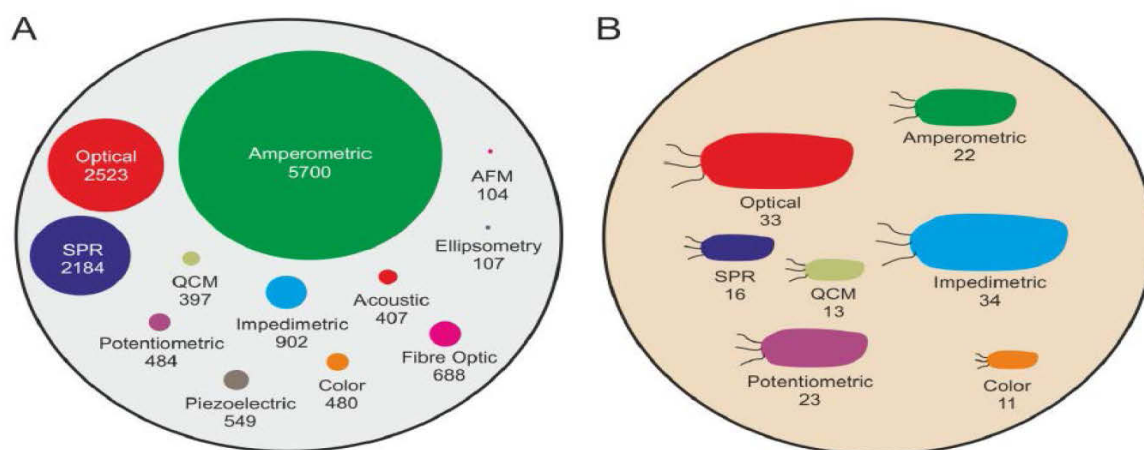


Figure 12: publications sur biocapteurs par rapport à la détection spécifique de bactéries entières. (A) des méthodes de détection différents utilisés dans les plates-formes de biocapteurs, y compris la littérature publiée trouvés dans ISI Web of Science en utilisant les termes de recherche "biocapteur" et "technique utilisée" de 1983 à 2013. (B) Différentes techniques utilisées pour la détection de bactéries entières. La taille du cercle ou d'une bactérie est proportionnelle au nombre de publications associées à cette technique [79].

Dans notre étude nous allons nous focaliser sur les biocapteurs électrochimiques pour lesquels nous avons recensé les différents travaux publiés dans ce contexte (Tableau 8).

Tableau 6: exemples de biocapteurs électrochimiques potentiométriques et ampérométriques pour la détection de cellules bactériennes entières [79]²

Type de biocapteur	La bactérie	Transducteur	Technique	Biorécepteur	LOD	Commentaire
Potentiométrique	Bactérie sulfato-réductrices	carbone vitreux	Analyse par stripping	Aucun	2.3x10 ⁻² -2.3x10 ⁻⁷ CFU/ml	Besoin de traitement bactérien
	Staphylococcus aureus	nanotube de carbone monofeuillet	EMF	Aptamère	8x10 ² CFU/ml	Peau de porc hérissée de bactéries
Ampérométrique	E.coli	Photholithographie d'Or	Immuno-magnétique/ampérométrie dans une cellule en écoulement	Anticorps	55 cells/ml dans PBS, 100 cells/ml dans le lait	Pas de contact des biocomposants avec le capteur
	E.coli K-12	Électrodes de carbone sérigraphiées		Bactériophage	1 CFU/100ml	cellules non intactes après analyse
	E.coli détruites par la chaleur	ECS	Détection par ampérométrie d'anticorps secondaire avec GOD	Anticorps Biotinylé	3x10 ¹ -3.2x10 ⁶ CFU/ml, jusqu'à 15CFU/ml	Nécessite un marquage mais testé dans les selles synthétiques
	Staphylococcus aureus	DropSens électrodes d'or sérigraphiées.	HRP H ₂ O ₂ -médiateur immunocapteur	Anticorps	1 CFU/ml dans le lait cru	Indirecte, nécessite un marquage

² GOD : enzyme glucose oxydase ; EMF : force électromotrice ECS : Électrode au calomel saturée, HRP : peroxydase de raifort (horseradish peroxidase)

Dans les systèmes microfluidiques, la détection limite d'un capteur ampérométrique couplé à une capture immunomagnétique a atteint 55 cellules / mL de E. Coli dans le tampon phosphate salin (PBS) et 100 cellules /mL dans le lait [80]. En bref, les particules magnétiques conjuguées à un anticorps spécifiques ont été suspendues au-dessus d'une surface d'électrode en or à l'intérieur d'une cellule en écoulement par force magnétique. L'utilisation de biorécepteurs suspendus laisse la surface de l'électrode en or propre, limitant ainsi l'encrassement des électrodes. Cependant, l'utilisation de réactifs de marquage et d'un système microfluidique limite son utilisation au cas par cas dans des endroits critiques [79]. Le capteur impédimétrique non-faradique plus sensible pour la détection de E. Coli a été réalisée en utilisant un anticorps entier biotinylé comme biorécepteur. Les anticorps polyclonaux biotinylés ont été attachés à une monocouche mixte (mSAM) sur une surface d'or à travers une forte interaction biotine-neutravidine [81]. Le système de capteur a donné une faible limite de détection de 10 UFC / mL pour les cellules entières et a également été étudié par SPR. Cependant, le système n'a pas été validé dans des échantillons biologiquement pertinents [82].

L'utilisation d'un nouveau matériau d'électrode, comme la réduction du papier d'oxyde de graphène, dans la construction d'un immunocapteur à base de nanoparticules pour la détection d'E. Coli a été rapportée. Les anticorps étaient immobilisés sur des nanoparticules d'or électrodéposées via la liaison biotine/streptavidine. Le capteur a donné une limite de détection de 10^2 cellules/mL avec une sélectivité élevée et des limites de détection plus faibles de 10^4 cellules/mL et 10^3 cellules/mL dans des échantillons de bœuf haché contaminé et concombre, respectivement. Ce système se révèle prometteur pour le fonctionnement dans des matrices d'échantillons pertinents

1.5.2 La biodétection avec les anticorps

Les anticorps polyclonaux dirigés contre des souches bactériennes spécifiques sont les biorécepteurs les plus couramment utilisés pour la détection de cellules bactériennes entières, où les objectifs contraignants sur l'enveloppe cellulaire sont généralement inconnus. Pour augmenter la spécificité et la sensibilité du capteur, des épitopes de surface isolées peuvent être utilisées pour produire des anticorps monoclonaux.

De même, le développement de biorécepteurs, contenant les bactériophages, les protéines, les demi-anticorps et les anticorps à chaîne unique (camélidés), offre une plus grande spécificité. Ils jouent un rôle essentiel pour la détection de bactéries dans des matrices

complexes qui contiennent de nombreux interférents potentiels, y compris les cellules humaines et les bactéries commensales ainsi que de nombreuses protéines et des métabolites.

Bien que les anticorps soient les biorécepteurs les plus largement utilisés dans la recherche d'affinité du biocapteur, leurs coûts et la stabilité de production et de purification pendant et après l'immobilisation sur la surface du capteur restent un frein. La durée de conservation de ces anticorps sur la surface du capteur n'est pas significativement longue, et l'efficacité de liaison a tendance à diminuer au fil du temps. Pour remédier à certaines de ces lacunes, de récentes recherches ont été menées dans l'engineering des anticorps mimétiques modifiés (des peptoides nanofeuilles).

Tableau 7: exemples de biocapteurs électrochimiques impedancemétrique pour la détection d'une cellule bactérienne entière³ [79]

Bacterium(a)	Transducer	Chemistry	Bioreceptor	LOD
<i>E. coli</i> O157:H7	Gold	EDC/NHS	Antibody	2 CFU/ml
<i>E. coli</i> O157:H7	Nanoporous aluminum oxide membrane	Trimethoxysilane-HA-EDC/NHS	Antibody	10 CFU/ml
<i>E. coli</i> O157:H7	Nanoporous aluminum oxide membrane	Silane-PEG	Antibody	10 CFU/ml
<i>E. coli</i> K-12	Gold microelectrode, interdigitated	Physisorption	T4 bacteriophage	10 ⁴ –10 ⁷ CFU/ml
<i>E. coli</i> K-12	Boron-doped UNCD microelectrode array	Physisorption	Antibody	NA
<i>E. coli</i> O157:H7	Gold microelectrode, interdigitated	Physisorption	Antibody	2.5 × 10 ⁴ CFU/ml and 2.5 × 10 ⁷ CFU/ml
<i>E. coli</i>	Gold	SAM-EDC/NHS	Antibody	1.0 × 10 ³ CFU/ml
<i>E. coli</i>	Gold electrode	SAM-biotin-NeutrAvidin	Biotinyl antibody	10 CFU/ml
<i>E. coli</i>	7% gold-tungsten plate wire	Polyethyleneamine-streptavidin	Biotinyl antibody	10 ³ –10 ⁸ CFU/ml
<i>E. coli</i>	Gold disk	mSAM	Synthetic glycan	10 ² –10 ³ CFU/ml
<i>E. coli</i>	Polysilicon interdigitated electrodes	Glutaraldehyde	Antibody	3 × 10 ² CFU/ml
<i>E. coli</i> O157:H7	Gold	SAM-HA-EDC/NHS	Antibody	7 CFU/ml
<i>E. coli</i>	Gold	SAM-PDICT cross-linker	Bacteriophage	8 × 10 ² CFU/ml
<i>E. coli</i>	Graphene paper	Biotin-streptavidin	Antibody	1.5 × 10 ² CFU/ml
<i>E. coli</i>	Screen-printed carbon microarrays	EDC/NHS	Bacteriophage	10 ⁴ CFU/ml for 50-μl samples

1.5.3 Introduction aux anticorps

Le système immunitaire fonctionne pour protéger le corps contre les organismes infectieux, qui sont potentiellement dangereux pour l'hôte. Une fois qu'un antigène est reconnu, le système immunitaire acquis crée une armée de cellules immunitaires spécifiquement conçues pour attaquer cet antigène. L'immunité acquise est contrôlée par les lymphocytes, qui sont responsables de la sécrétion d'immunoglobulines (Ig) (anticorps, AC).

³ Abbreviations: EDC, ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide; PEG, polyethylene glycol; UNCD, ultrananocrystalline diamond; NA, not available; PDICT, 1,4-dithiocyanate; ITO, indium tin oxide; mSAM, mixed self-assembled monolayer; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; SAM, self-assembled monolayer; MHDA, mecaptohexadecanoic acid; GPMS, (3-glycidioxypropyl)trimethoxysilane.

1.5.3.1 Structure d'anticorps

Les ACs ou Igs sont des glycoprotéines sériques hautement solubles impliquées dans les mécanismes de défense du système immunitaire. Ils peuvent être divisés en cinq classes en fonction de leurs séquences de chaînes constantes de chaînes lourdes, à savoir IgM, IgD, IgG, IgE et IgA [83]. La structure de base d'un AC est décrite dans la figure 13 et peut être subdivisée en deux blocs de construction distincts : le fragment de liaison à l'antigène (Fab) et le fragment constant (Fc) [83]. La chaîne légère a une région variable (lumière variable ou VL) et une région constante (CL). Le composant Fab de l'AC contient la région variable du fragment Fv, où les régions déterminant la complémentarité (CDR) peuvent être localisées [83]. Les CDR forment les sites de liaison à l'antigène de l'AC et confèrent une spécificité à l'antigène. La région Fc est essentielle pour la médiation des fonctions effectrices. La région Fc est essentielle pour la médiation des fonctions effectrices telles que la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'AC (ADCC), la phagocytose cellulaire dépendante de l'AC, la présentation de l'antigène au système immunitaire, la dégranulation, la lyse médiée par le complément et la régulation de l'activation et de la prolifération cellulaire.

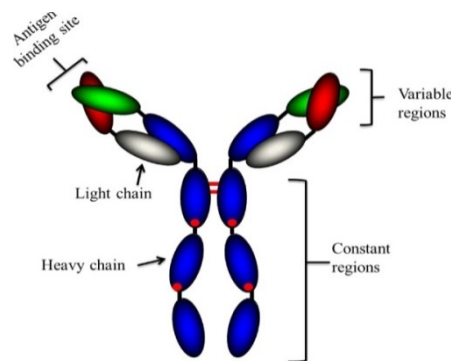


Figure 13 : structure d'un anticorps [84]

1.5.3.2 Préparation d'anticorps

De nos jours les anticorps sont obtenus chez des fournisseurs commerciaux. Dans certains cas, il faut produire les anticorps soi-même, particulièrement pour des travaux portant sur des protéines rares ou récemment découvertes.

1.5.3.3 Purification des anticorps

La purification d'anticorps dépend de l'usage prévu, car certaines applications n'exigent qu'un antisérum, d'autres nécessiteront des anticorps purs, mais la plupart auront des exigences entre ces deux extrêmes.

La technique de purification la plus souvent employée est la chromatographie d'affinité. Mais, au préalable à toute utilisation, une séparation brute des Ig des autres protéines sériques (albumine, transferrine, etc.) par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium est recommandée. Une chromatographie d'échange ionique est aussi possible, quoique moins employée.

Il ne reste qu'à désorber l'anticorps qui est à ce moment pratiquement pur. Les colonnes de chromatographie classiques sont aussi en voie d'être remplacées par des billes magnétiques de résine sur lesquelles est lié le ligand choisi. Le gros avantage de cette approche est la rapidité de séparation. Plutôt que de laisser percoler divers tampons à travers une colonne, il est possible de récupérer facilement les billes magnétisées (et ce qui est lié dessus) avec un aimant.

1.5.4 Procédures d'immobilisation

L'immobilisation de l'élément biologique est une étape clé dans le développement d'un biocapteur. Ce procédé retient l'élément biologique sur une surface choisie tout en permettant son accessibilité au ligand. Pour la mise au point de biocapteurs, la méthode d'immobilisation ne doit pas réduire l'activité et la spécificité de la molécule [85]. L'immobilisation de l'élément biologique (enzyme, ADN ou anticorps) peut être réalisée selon différents procédés (Figure 4).

Le ligand peut être immobilisé sur le support solide du biocapteur par différentes méthodes telles que l'adsorption, le couplage covalent, l'encapsulation... L'objectif de toute méthode d'immobilisation est de retenir l'activité maximale du ligand biologique sur la surface du transducteur. La sélection d'une méthode d'immobilisation appropriée dépend de la nature du ligand biologique, du type de transducteur utilisé, des propriétés physico-chimiques de l'analyte et des conditions opératoires du biocapteur. Les deux méthodes les plus couramment utilisées sont l'adsorption et le couplage covalent [43,59].

L'adsorption physique d'un ligand reposant sur les forces attractives de Van der Waals est la plus ancienne et la plus simple méthode d'immobilisation. Tandis que le couplage covalent met à profit la réaction entre un groupement fonctionnel du ligand et des

groupements réactifs de la surface solide. Parallèlement à ces deux techniques d'immobilisation très répandues, d'autres systèmes font appel à la polymérisation électrochimique de molécules organiques pour former un réseau englobant le ligand.

Les méthodes les plus courantes mettent en jeu des groupements hydroxyles (—OH), aminés (—NH_2), carboxyles (—COOH) ou sulfhydriles (—SH) du support et des biomolécules. Toutefois, ces groupements sont peu réactifs. Il est donc nécessaire de les activer afin qu'ils réagissent avec les groupements fonctionnels du biorécepteur.

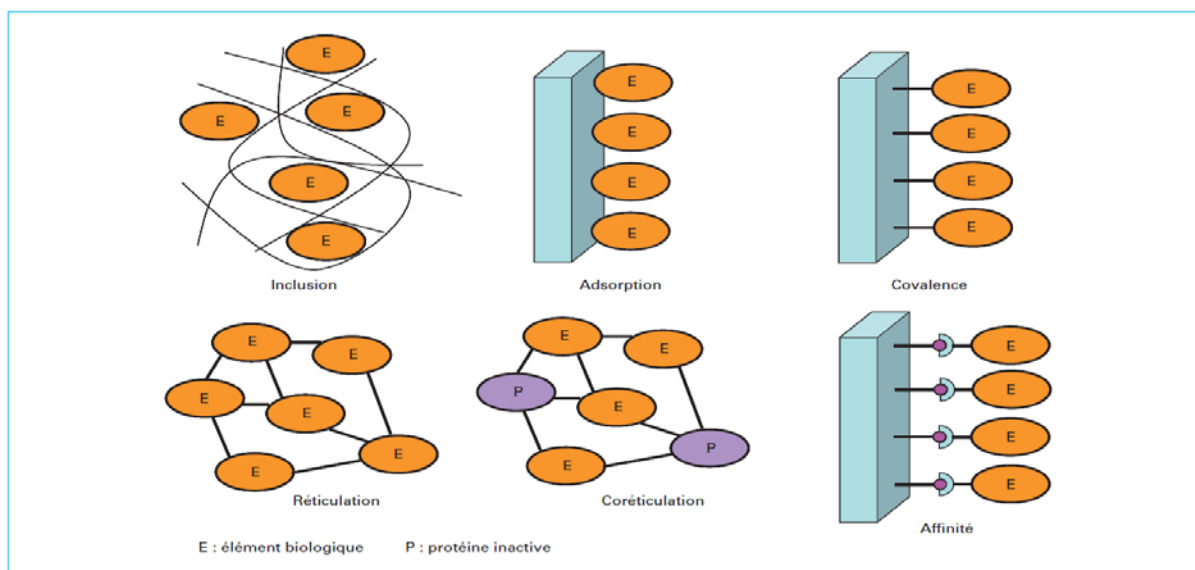


Figure 14 : les différentes méthodes d'immobilisation des biorécepteurs [86]

1.5.4.1 Approches d'immobilisation d'anticorps

La performance d'un bio / immuno-capteur dépend de trois facteurs critiques: (i) sa capacité à immobiliser des éléments de reconnaissance (molécules biologiques) tout en conservant leur activité naturelle; (ii) l'accessibilité de l'élément de reconnaissance à l'analyte pertinent en solution; et (iii) une faible adsorption non spécifique sur le support solide. Les propriétés physico-chimiques de l'interface ou de la surface du capteur jouent un rôle important dans l'obtention d'une immobilisation optimale des ACs et dans la limitation de l'adsorption non spécifique [87]. Comme mentionné ci-dessus, l'immobilisation des AC sur une surface de capteur sans altérer leur spécificité et leur activité immunologique est l'une des étapes les plus cruciales dans la fabrication d'un immunocapteur. L'étape d'immobilisation affecte la limite de détection, la sensibilité et la performance globale de l'immunocapteur [88]. L'AC macromoléculaire asymétrique peut s'attacher à la surface solide dans de nombreuses orientations différentes. Si l'immobilisation se fait par la région Fc et que le site de liaison de

l'AC est entièrement disponible pour l'interaction avec l'antigène apparenté, alors il peut très bien fonctionner, maximisant ainsi les performances du capteur. L'immobilisation de l'AC sur la surface du capteur à travers les sites de liaison à l'antigène conduit à une activité de liaison diminuée ou totalement éliminée de l'AC [89]. De plus, il existe un certain nombre d'états intermédiaires d'immobilisation qui peuvent conduire à un accès réduit de l'antigène apparenté au site de liaison d'AC ou lier l'AC près de ce site avec une réduction associée de la liaison et donc une performance liée au capteur. L'étendue de la liaison entre l'AC et la surface peut également devoir être soigneusement contrôlée. Ceci peut être réalisé avec succès si l'AC est conçu pour avoir des points de fixation très bien définis. Par exemple, des fragments d'AC peuvent être utilisés tels que scFv, scAC ou Fab avec des étiquettes telles que la polyhistidine, avec de la biotine ou des points de thiol modifiés pour la liaison. Cependant, ceci est plus difficile à contrôler lorsque la réticulation chimique est utilisée, par ex. à $-COOH$ ou NH_2 , car des liaisons croisées multiples peuvent réduire la capacité globale de liaison d'AC, par exemple en empêchant l'accès au site de liaison aux anticorps.

La Figure 13 présente une vue d'ensemble des différents groupes fonctionnels utilisés pour l'immobilisation d'anticorps aléatoire et orientée sur des surfaces solides

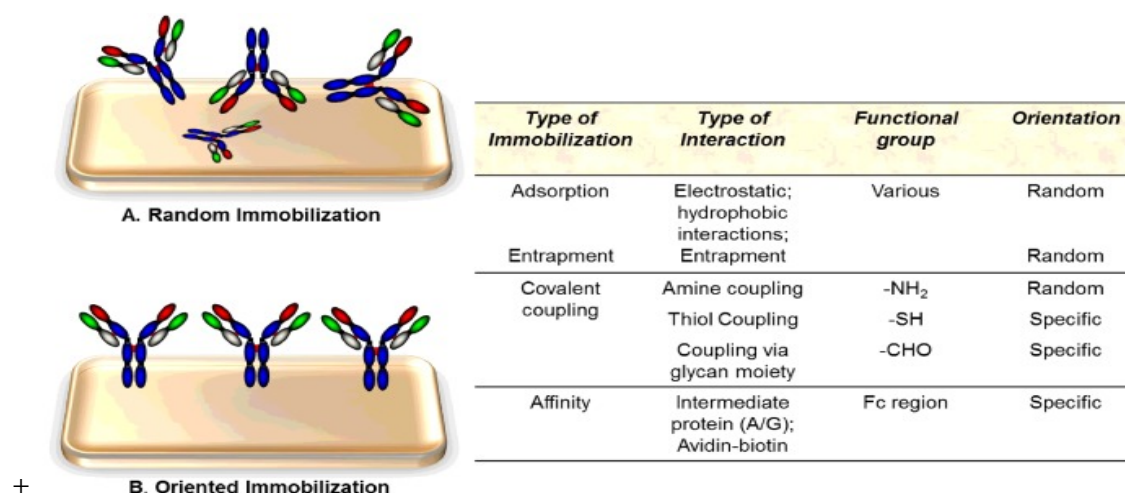


Figure 13: différents types de méthodes d'immobilisation et groupes fonctionnels utilisés pour l'immobilisation d'AC aléatoire et orientée sur des surfaces [90]

Une orientation favorable des ACs et une modification structurale minimale, tout en étant immobilisés sur la surface solide, peuvent contribuer directement à la performance optimale de l'immunocapteur, avec des facteurs de performance jusqu'à 200 fois supérieurs à l'immobilisation désorientée [88]. L'orientation des ACs sur les surfaces des capteurs peut être contrôlée par l'interaction entre des groupes réactifs spécifiques sur la surface et sur l'AC. Diverses approches, y compris la fonctionnalisation de la surface avec des groupes

spécifiques tels que le glutaraldéhyde, le carbodiimide, le succinimide, le maléimide ou le periodate, ou la décoration avec des nanostructures, ont été rapportées dans la littérature pour rendre la surface du capteur plus compatible [91]. Les deux approches principales qui peuvent être utilisées pour la fabrication d'immunocapteurs sont l'immobilisation non covalente et covalente. La Figure14 est une représentation schématique de divers procédés d'immobilisation utilisés pour immobiliser des anticorps sur une surface de capteur.

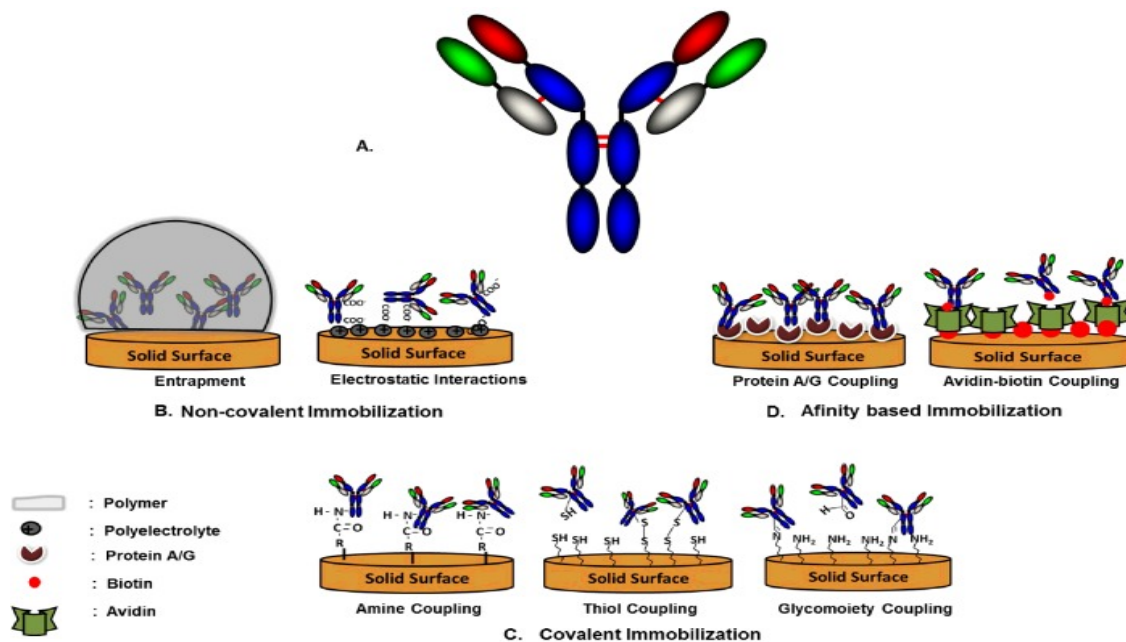


Figure14 : représentation schématique de diverses méthodes d'immobilisation. (A). Structure typique d'AC. (B) immobilisation non-covalente d'un Ab sur un capteur de surface solide représenté par le piégeage et les interactions électrostatiques. (C) Liaison covalente d'un AC à la surface solide fonctionnalisée via des groupes amine, thiol et aldéhyde. (D). Cohésion des interactions d'affinité avec la surface solide représentée par les systèmes à base de protéines A/G et d'affinité biotine-avidine [90]

a. Immobilisation non covalente

Les ACs peuvent être adsorbés sur la surface du capteur par des forces non-covalentes simples, y compris des liaisons électrostatiques ou ioniques, des interactions hydrophobes et des forces de van der Waals. La performance globale des immunocapteurs réutilisables à base d'AC adsorbés physiquement est généralement faible en raison de la lixiviation et du manque d'orientation fonctionnelle des ACs. Par conséquent, cette approche ne sera pas détaillée pour mieux se concentrer sur l'immobilisation covalente qui a été mise à profit dans ce travail.

b. Immobilisation covalente

L'immobilisation covalente des ACs sur diverses surfaces solides est l'approche d'immobilisation la plus intensément étudiée car elle facilite le stockage à long terme et la réutilisabilité des immunocapteurs. La liaison covalente implique une modification de surface afin d'obtenir des groupes réactifs tels que des groupes hydroxyle, thiol, carboxyle ou amino sur la surface pour l'immobilisation subséquente de l'AC. Diverses techniques de modification de surface, y compris la modification chimique, le greffage photochimique, la décharge de plasma gazeux et la copolymérisation par irradiation de rayonnement ionisant ont été développées. Le couplage des ACs à la surface du capteur en ciblant les groupes amine présents dans les chaînes latérales de l'acide aminé Lysine d'AC est une forme largement utilisée d'immobilisation covalente, en raison de la facilité relative d'accès à ces groupes. Cependant, de telles approches pourraient également réagir avec des groupes amino dans près du site de liaison, réduisant ainsi l'activité de l'AC. Le couplage des groupes amine d'ACs avec des surfaces d'or carboxylées terminales a également été largement utilisé. Les groupes amines primaires sur les acides se lient aux esters de succinimide réactifs (formés par la réaction entre l'acide carboxylique et le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS)) pour former une liaison covalente comme le montre la Figure 15. Feyssa et al [92] ont montré une amélioration du signal du test par immobilisation d'une protéine anti-C-réactive (CRP) d'AC dans une plateforme microfluidique via une liaison covalente amine, en comparaison avec la liaison passive. La reproductibilité d'une biopuce couplée à une amine s'est révélée comparable à celle d'un kit de détection ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) humain-CRP. Rahman et al [93], ont développé un immunocapteur impédimétrique utilisant une microbalance à cristal de quartz (QCM) pour la détection sans marqueur du bisphénol A (BPA) par immobilisation covalente d'un pAC sur une nanoparticule fonctionnalisée par un groupe acide carboxylique. Dans des conditions optimisées, la plage dynamique linéaire du immunocapteur développé BPA a été atteint entre 1 et 100 ng / mL avec une limite de détection de $0,3 \pm 0,07$ ng / mL [94].

La chimie du couplage aminé entraîne habituellement une orientation aléatoire et une liaison moins homogène en raison de la présence de groupes lysine excessifs dans l'AC. Les groupes thiol peuvent également être utilisés pour l'immobilisation d'AC ; habituellement, ils donnent une immobilisation plus homogène ou peuvent permettre une orientation définie des AC par rapport au couplage aminé, en particulier lorsque des groupes thiol spécifiques ont été ajoutés aux AC par des approches biologiques chimiques ou moléculaires. L'immobilisation

des AC sur une surface de capteur en utilisant un groupe thiol est typiquement basée sur l'échange de thiol-disulfure entre les groupes thiol sur l'AC et les disulfures actifs introduits sur la surface. Il a été montré que des fragments d'AC immobilisés dans une orientation définie atteignaient une capacité de liaison à l'antigène améliorée de 20 fois, comparés aux anticorps immobilisés de façon aléatoire, en utilisant des groupes amine [88]. L'approche de couplage thiol s'est révélée efficace avec les fragments AC. Un immunocapteur sensible et sélectif impédimétrique pour la détection de peptides dérivés de l'hémagglutinine H5 de la grippe aviaire en utilisant un fragment Fab AC immobilisé sur une surface d'électrode en or par couplage thiol a été rapporté par Jarocka et al [94].

Une autre approche covalente implique la génération de groupes aldéhydes actifs par oxydation de groupes hydroxyle (-OH) de carbohydrates présents dans la région Fc de l'AC en utilisant du periodate de sodium (NaIO_4) ou de potassium (KIO_4). Les groupes diol activés résultants peuvent être liés efficacement sur des surfaces fonctionnalisées par une amine, ce qui conduit à un couplage d'AC covalent partiellement orienté sur la surface du capteur. Lin et al [95] ont mis au point une stratégie simple et efficace, assistée par l'acide boronique, pour la conjugaison de covalence et de site spécifique d'AC sur des nanoparticules magnétiques (MNP) par formation de boronate sur la fraction glucidique du domaine Fc. La méthode d'immobilisation via un glyco-fragment a démontré une amélioration significative de l'extraction d'immunoaffinité comparée à l'AC immobilisée par la protéine G. Cependant, l'utilisation de produits chimiques hautement réactifs pour l'oxydation des hydrates de carbone peut occasionnellement entraîner l'oxydation involontaire d'acides aminés tels que la méthionine, tryptophane ou histidine à différentes positions sur l'AC avec le potentiel de réduire la capacité de liaison. D'autres limitations associées mentionnées par Shriver-Lake et al avec l'utilisation de la procédure d'immobilisation à base de glucides impliquent des retards dus à plus d'étapes dans la procédure, une perte accrue d'AC et aussi une perte d'activité de certains mACs après le traitement au periodate. Ils ont observé 50% de pertes dans l'AC avant l'immobilisation en raison du nombre d'étapes dans la procédure [96].

La stratégie classique la plus utilisée consiste à immobiliser les sondes aminées sur une surface présentant des fonctions acide carboxylique activée. L'activation est présentée dans l'exemple (b) de la Figure 15, qui utilise un carbodiimide (typiquement EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide) ou DCC (dicyclohexylcarbodiimide)) conjointement avec un équivalent de N-hydroxysuccinimide (NHS) afin de former un ester activé, stable en conditions standard (pH 7, milieu aqueux). La voie d'activation EDC/NHS fut par exemple mise en oeuvre par Andersson et al. pour l'immobilisation de biomolécules dans une matrice

d'hydrogel composée de PEG [97]. Les groupements hydroxyle du polymère sont dans un premier temps convertis en acide carboxylique par substitution nucléophile sur l'acide bromoacétique, puis l'acide est activé par un ester-NHS. Ces stratégies de couplage peuvent évidemment être utilisées à l'inverse pour l'immobilisation de biomolécules sur des surfaces présentant des fonctionnalités amine, par exemple en utilisant des oligonucléotides activés par un ester-NHS [98].

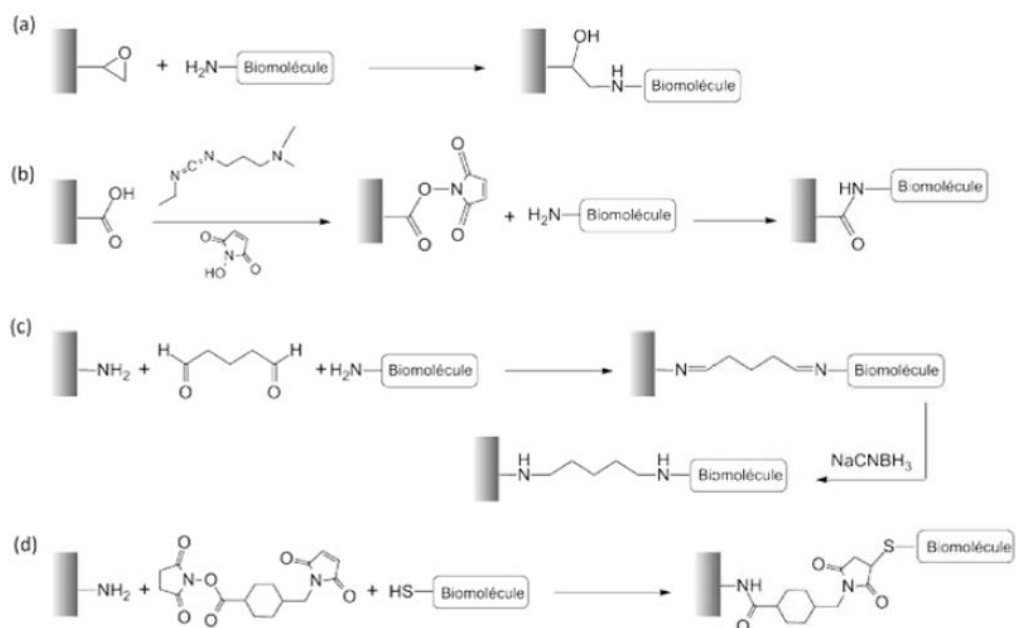


Figure 15 : (a) immobilisation d'une biomolécule présentant un groupement amine sur une surface fonctionnalisée par un groupement époxyde par formation d'un aminoalcool (b) activation par la voie EDC/NHS d'une surface acide carboxylique pour l'immobilisation de biomolécule aminées. (c) immobilisation covalente d'une biomolécule présentant un groupement amine sur une surface fonctionnalisée par des groupements amine grâce à un espaceur homofonctionnel, le glutaraldéhyde (pentane-1,5-dial). (d) immobilisation covalente d'une biomolécule présentant un groupement thiol sur une surface fonctionnalisée par des groupements amine grâce à un espaceur hétérofonctionnel, le SMCC (succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl) cyclohexanecarboxylate) [99]

c. Immobilisation par affinité

Malgré la robustesse de l'immobilisation covalente, elle n'est toujours pas idéale, en raison d'inconvénients tels que la dénaturation partielle et l'absence d'orientation définie associée à la méthode. Ainsi, d'autres stratégies d'immobilisation non physiques telles que l'utilisation de biotine-avidine ou de protéines de liaison intermédiaires immobilisantes, telles

que la protéine A ou G, d'abord sur la surface du capteur suivie par la capture subséquente d'ACs ont été introduites. Ces protéines ont une affinité et une spécificité de liaison élevées vis-à-vis de la région Fc d'une large gamme d'ACs, favorisant ainsi l'immobilisation de l'AC via la région Fc sur la surface du capteur. De Juan-Franco et al. [100] ont introduit une nouvelle approche d'immobilisation d'AC simple et rapide, utilisant une protéine de fusion, la Protéine A-gold-binding domaine (PAG), consiste en un peptide de liaison à l'or couplé aux domaines de liaison à la protéine A de la bactérie, liés à l'immunoglobuline. Cette protéine de fusion permet d'immobiliser facilement et rapidement les anticorps en préservant sa structure native, tout en laissant les sites de liaison à l'antigène (Fab) librement exposés [100] [101] [102].

1.5.4.2 Ingénierie d'Anticorps pour l'immobilisation

Les anticorps recombinants ont plusieurs caractéristiques souhaitables, notamment une masse moléculaire faible, une flexibilité accrue, une stabilité physico-chimique élevée et un accès facile à l'antigène, ce qui en fait un substitut potentiel pour les anticorps naturels. Les approches d'immobilisation dirigée développées pour les AC intacts basées sur le domaine Fc ou la fraction carbohydrate ne peuvent pas être utilisées avec des fragments AC ou AC tels que scACs ou scFv, en raison de l'absence du domaine Fc glycosylé. Différentes approches ont été développées pour concevoir scFv ou scAC au cours de leur génération afin de les immobiliser facilement sur la surface solide sans dénaturation. Des fragments AC peuvent être manipulés pour avoir des acides aminés chargés positivement (par exemple arginine ou Arg) le lieu (linker) peptidique. Cela peut également être réalisé avec une séquence d'acides aminés 6-histidine sur l'extrémité C-terminale pour l'immobilisation par des interactions électrostatiques et non-covalentes. La méthodologie de bioaffinité peut également être utilisée pour immobiliser scFv sur des surfaces revêtues de streptavidine en se conjuguant à la biotine via des amines libres sur le scFv. Les acides aminés de la cystéine (Cys) ou de l'histidine (His) se liant au métal dans le linker peptidique du scFv manipulé permettent un auto-assemblage correct sur les surfaces métalliques.

La Figure 16 est une représentation schématique de différents types d'approches d'immobilisation utilisées pour immobiliser les acides aminés sur les surfaces des capteurs.

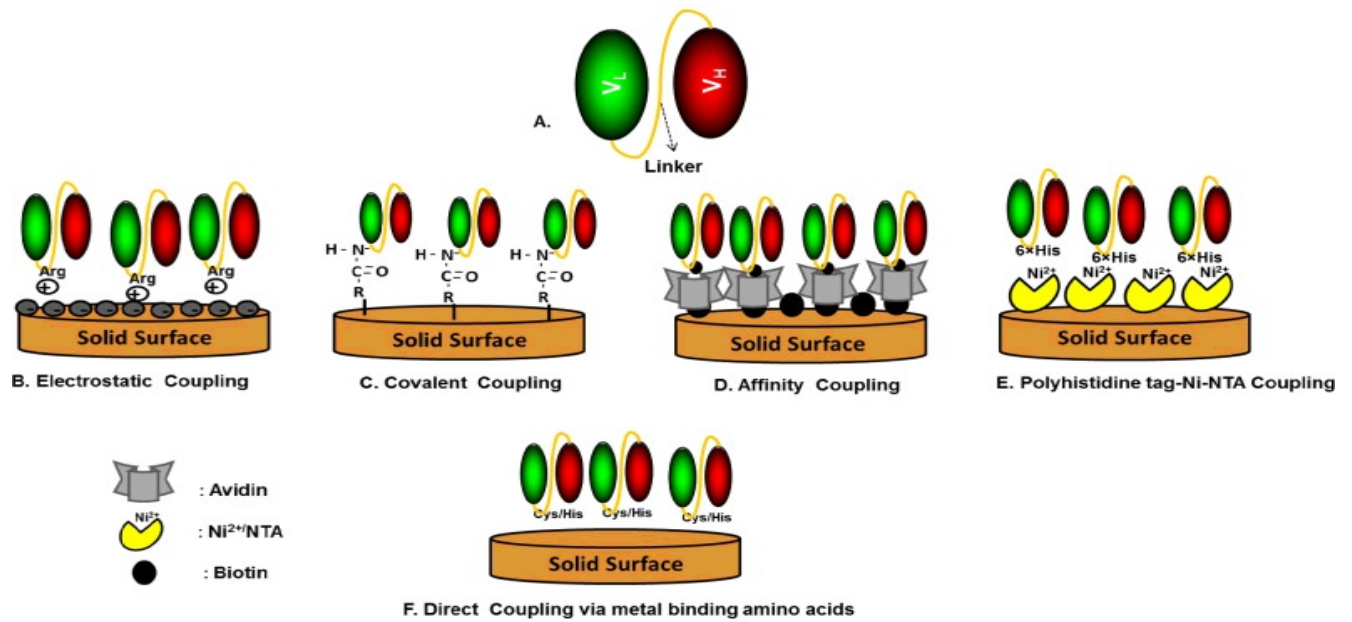


Figure 16 : représentation schématique de divers types d'approches d'immobilisation utilisées pour immobiliser des Ac recombinants sur des surfaces de capteurs [90]

Le Tableau 10 présente quelques exemples d'immunocapteurs basés sur rAC. La haute spécificité de rACs permet l'utilisation d'un seul rAC pour détecter un antigène, éliminant ainsi le besoin d'un second AC spécifique à l'antigène. De plus, la petite taille de rACs permet une immobilisation sur une surface d'immunocapteur à haute densité, ce qui entraîne une amélioration de l'avidité, de la sensibilité et de la stabilité du test.

Tableau 8: immunocapteurs recombinants à base d'anticorps [90]

Application	Analyte	type d'Anticorps	Transducteur	Réf
détection explosives Nitroaromatique	2,4,6-trinitrotoluène (TNT)	scAC	Chimiorésistif	[103]
Troubles de la thrombose veineuse profonde (TVP)	D-dimer	scAC	Électrochimique	[104]
Virus de l'immunodéficience humaine	facteur ineffectivité virion HIV-1	scFv	Piézoélectrique	[105]
Détection de métabolites toxiques	Aflatoxine B1	scFv	SPR	[106]
Diagnostic de la maladie	récepteurs Fc	scFv	Piézoélectrique	[107]
Diagnostic de listériose	Listeria monocytogènes	scFv	Électrochimique	[108]
détection de la concentration de Pesticide	Atrazine	scAC	Électrochimique	[109]
Diagnostic d'Encéphalomyélites	Venezuela équine encéphalites virus	scFv	Miroir de résonance	[110]
Diagnostic d'Entamoeba histolytica	Antigène Entamoeba histolytica	scFv	Ampérométrie	[111]
Détection de dopage avec hormone	Somatotropine	demi-taille Fragment d'AC	SPR	[112]
Détection d'inflammation	Protéine C-réactive (CRP)	ingénierie Fragment AC	SPR	[20]

1.6 Méthodes Electrochimiques et fonctionnalisation des surfaces intégrées dans un microsystème

1.6.1 Méthodes de mesure électrochimiques

Pour comprendre l'électrochimie, nous devons considérer cinq concepts importants et interdépendants :

1. Le potentiel de l'électrode. Il détermine le domaine d'électroactivité de l'analyte.
- 2- La concentration de l'analyte. Elle va déterminer la sensibilité de biocapteur.
- 3-En plus d'une réaction d'oxydo-réduction, l'analyte peut participer à d'autres réactions.
- 4- Le courant est une mesure du taux de l'analyte en oxydation anodique ou réduction cathodique.
- 5- Nous ne pouvons pas contrôler simultanément le courant et le potentiel.

La voltammétrie est une méthode d'électroanalyse basée sur la mesure du flux de courant résultant de réduction ou d'oxydation des espèces présentes en solution [113]. Les différentes techniques voltamétriques découlent des innovations portant sur la façon dont le

signal $E=f(t)$ est imposé et le signal $I = f(E)$ est mesuré qui ont été développées dans le but de maximiser le rapport I_f/I_c afin d'augmenter la sensibilité. I_f est le courant faradique associé aux processus d'oxydoréduction, I_c est le courant capacitif lié à l'existence de la double couche électrique. Soit $I = I_f + I_c$ (contribution faradique et capacitive à l'interface électrode/solution). La Figure 17 prend en compte ces considérations et représente les différentes techniques électrochimiques envisageables, les conditions expérimentales en bleu et les signaux analytiques en vert.

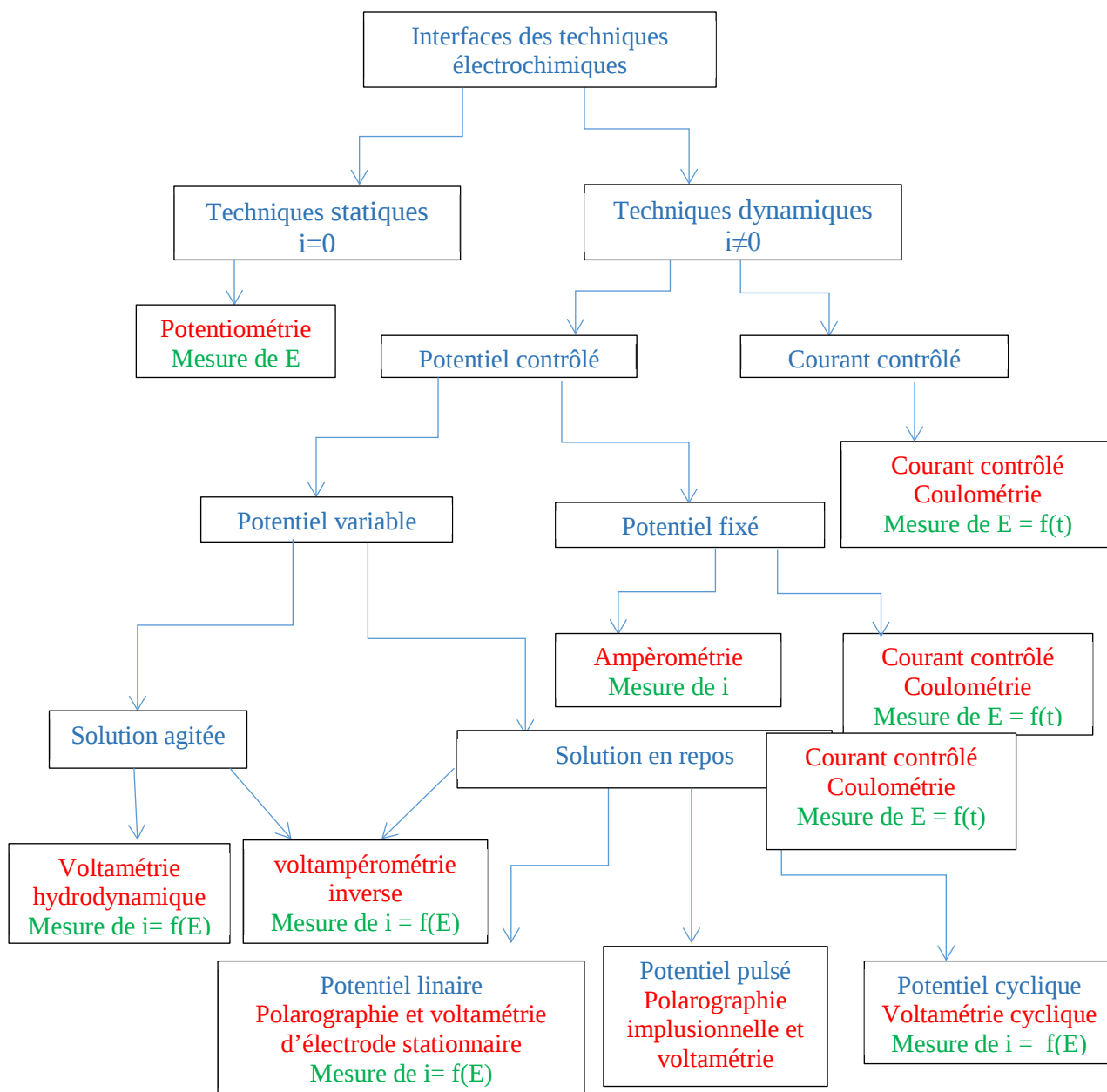


Figure 17: arbre généalogique mettant en évidence un certain nombre de techniques électrochimiques interfaciales

1.6.2 Fonctionnalisation des microsystèmes à base de carbone

L'évolution dans différents domaines multidisciplinaires, comme c'est le cas pour la microélectronique et la science des matériaux, ouvrent la voie au développement de solutions avancées dans de nombreux domaines, y compris les dispositifs basés sur la détection. Les capteurs électrochimiques représentent un concept éprouvé commercialement, capable de fournir une détection sensible, miniaturisée et rentable des analytes pertinents, même *in vivo* [114]. Au cours des dernières décennies, plusieurs concepts de détection basés sur l'électrochimie et des dispositifs associés ont été développés [114–116]. Cependant, en utilisant des matériaux d'électrodes classiques, les problèmes de sensibilité et de sélectivité ont montré qu'ils limitaient leur utilisation pour des applications réelles.

Les matériaux à base de carbone sont considérés comme des matériaux d'électrode idéaux en raison de leur large plage de potentiel anodique, de leur faible courant résiduel, de leur inertie chimique, de leur facilité de traitement, de leur disponibilité et de leur faible coût [117,118]. De plus, la disponibilité de diverses formes de carbone dans la nature fait que les électrodes à base de carbone présentent un temps de réponse rapide et peuvent facilement être fabriquées dans différentes configurations et tailles. Il existe plusieurs aspects critiques pour améliorer la capacité de détection des systèmes de détection à base de carbone. Pour les capteurs de taille comparable, le rapport surface / volume contrôle le nombre de sites actifs qui sont en contact avec les analytes et donc la sensibilité. D'autre part, l'efficacité des interactions électroniques affecte directement la mesure. Une grande surface couplée à une grande mobilité et conductivité sont des avantages potentiels du graphène pour les capteurs électrochimiques, largement explorés depuis quelques années [119–127]. En plus du graphène vierge, l'oxyde de graphène réduit (rGO) et ses dérivés ont notamment trouvé un large intérêt pour les applications de détection électrochimique. Alors que la méthode de drop-casting est couramment utilisée pour la formation d'interfaces électriques modifiées par rGO, cette approche n'est cependant pas adaptée à la modification de microsystèmes électrochimiques.

1.6.3 Le Graphène

Le graphène est un bon matériau 2D conducteur électronique. Les nano-composites à base de graphène (G) et d'oxyde de graphène (GO) ont émergé en tant que nouveaux matériaux après la découverte du graphène. En raison de leurs capacités physiques et chimiques, ces nanocomposites ont été étudiés de manière approfondie pour diverses applications comme l'électronique, les batteries, les supercondensateurs, les piles à combustible

et les électro-catalyseurs et protection de l'environnement [128]. Comme le graphène a une excellente conductivité électrique et thermique et des propriétés physiques, qu'il lui permet d'être largement appliqué dans différents domaines, il devient un sujet de recherche très populaire ces dernières années [129]. La ration élevé surface-volume et la bonne biocompatibilité du GO lui ont permis d'être un matériau prometteur pour les applications biomédicales telles que la délivrance de médicaments et la biodétection. En effet, plusieurs groupes de recherche ont rapporté plusieurs études sur la modification de l'oxyde de graphène avec des protéines. De plus, la surface Les groupes fonctionnels hydroxyle, époxy et carboxyle font de GO un excellent candidat pour la coordination avec d'autres matériaux ou molécules [130].

1.6.4 Électrodes modifiées

Différentes approches ont été développées pour former des films organiques minces (1 μm à 100 nm) ou ultraminces (10 nm à 1 nm) à la surface des électrodes de travail. Cela a permis de donner une nouvelle impulsion à l'électrochimie à la fin des années 70 du siècle précédent. Il est possible de distinguer les méthodes dites de physisorption qui mettent en jeu des énergies de liaison faibles entre la surface et le film organique (de l'ordre de quelques $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) et les méthodes de chimisorption pour lesquelles les valeurs énergétiques sont de l'ordre de la centaine de $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. L'établissement d'une liaison chimique forte entre la surface et la couche organique est forcément un atout car elle garantit une plus grande stabilité de l'interface formée et donc une plus grande robustesse des couches. La voie du greffage covalent est donc à privilégier dans l'optique d'une fonctionnalisation de surface robuste. Il existe deux grandes catégories de procédés de chimigreffage : les procédés chimiques et les procédés électrochimiques.

Les microsystèmes jouent un rôle important dans des différentes applications biologiques et environnementales. L'intégration d'une interface électrique dans un tel system miniaturisé fournit des nouvelles opportunités pour la détection électrochimique. Ou une forte sélectivité et sensibilité par rapport à l'analyte sont exigées.

1.6.4.1 Procédés chimiques

La surface est simplement mise en contact avec une solution contenant des molécules possédant une fonction terminale capable de réagir spontanément et très spécifiquement avec la surface (Figure 18) [131]. Citons, par exemple, les acides gras (*fonctions acides*

carboxyliques) sur des oxydes d'aluminium ou des métaux [131–134], les organothiols sur les métaux nobles [131,135], les organosilanes (chlorosilane, alkoxysilane...) sur les surfaces d'oxydes d'aluminium [131] ou de silice hydroxylées (portant des fonctions OH) [131] ou encore les phosphonates sur l'acier, le cuivre, le laiton, ou l'aluminium [131,136].

L'autre extrémité des molécules doit posséder une fonction chimique choisie pour induire un surgreffage. Il s'agit de permettre un effet de surface déterminé (propriétés de mouillage, par exemple) ou bien permettre d'introduire une entité fonctionnelle à partir d'un couplage chimique sur la surface (post-fonctionnalisation).

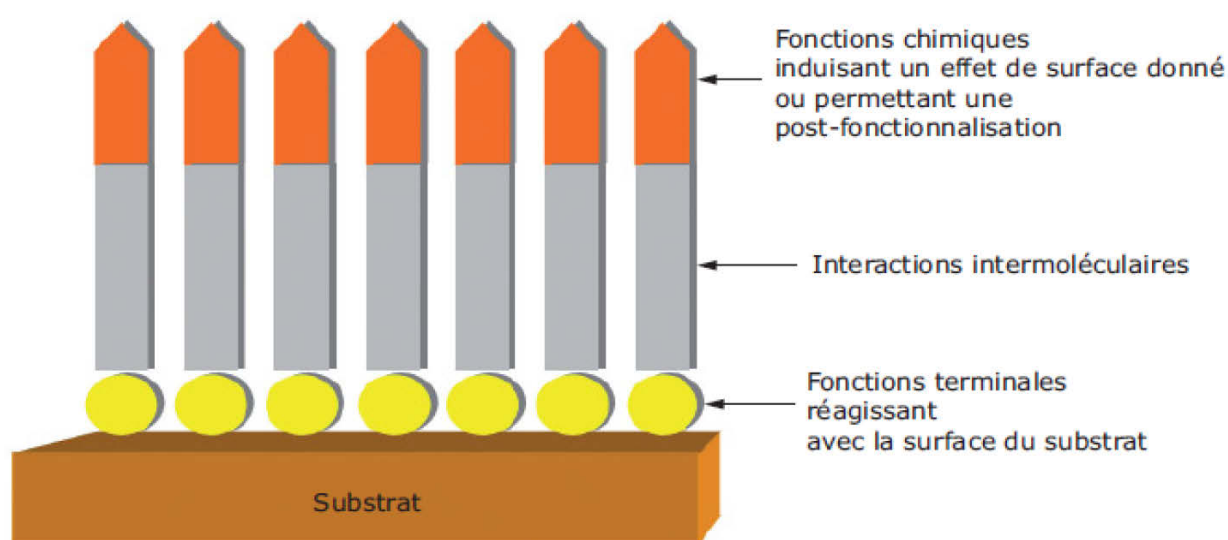


Figure 18 : schéma d'une monocouche auto-assemblée sur un substrat [137]

L'auto assemblage d'une monocouche est défini comme une couche d'une molécule de matériau qui se forme rapidement par adsorption sur une surface. Cela se produit de manière ordonnée et est gouverné par des forces physiques ou chimiques au cours d'un processus de dépôt en solution ou en phase vapeur. Par la suite, le processus devient plus lent car il dépend des interactions surface/molécules et interactions intermoléculaires. Ce dernier se produit avec la sélectivité de surface qui est déterminée par l'interaction entre le groupe d'ancrage fonctionnel et la surface.

L'épaisseur du film des couches résultantes est contrôlée à l'échelle de l'angström, de sorte que la terminaison du film formé automatiquement ne produit qu'une seule couche moléculaire. Ce processus nous permet d'obtenir facilement des monocouches (couches

ultrafines) à la surface du matériau, mais l'opération peut prendre plusieurs heures et même plusieurs jours.

De nombreux travaux traitent de l'autoassemblage de thiols sur métaux nobles, en particulier l'or. La préparation et les structures de ces couches formées, ainsi que l'interface associée sont bien étudiées et assez facilement maîtrisables à l'échelle moléculaire. En revanche, sur le plan technologique, ils se sont révélés beaucoup moins efficaces vu leurs instabilités électrochimiques à long terme et sous stress thermique. Elles désorbent dès 60 °C, voire même à température ambiante dans certains solvants. En outre, le comportement dynamique et stochastique de la liaison thiol-or est souvent responsables d'une évolution de la structure de la couche en fonction des conditions de son environnement [135,138,139].

1.6.4.2 Procédés électrochimiques

Les procédés électrochimiques concernent des réactions électrochimiques au sens large, c'est-à-dire qui mettent en jeu un transfert d'électrons, soit hétérogène, soit homogène. Le point commun de ces méthodes est la production d'espèces radicalaires à partir du transfert d'électrons, espèces qui vont ensuite réagir pour former une liaison avec la surface. Les processus peuvent s'effectuer, soit par voie oxydante, soit par voie réductrice (Figure 19) [140].

Parmi ces méthodes, il en est une qui suscite un intérêt croissant et qui est maintenant largement répandue : le greffage par réduction de sels d'aryldiazonium.

Les sels d'aryldiazonium sont des molécules connues des chimistes depuis longtemps (milieu du XIX^e siècle) car elles entrent dans la fabrication de pigments azoïques industriels (naphthols). En 1992, Jean Pinson et ses collaborateurs de l'Université Paris-Diderot ont identifié pour la première fois l'immobilisation d'un radical aryl à la surface d'une électrode de carbone grâce à la réduction électrochimique d'un sel d'aryldiazonium [141]. Cette méthode permet un bon contrôle du recouvrement de la surface dans des conditions douces. Les caractérisations électrochimiques (voltamétrie cyclique, spectroscopie d'impédance électrochimique), spectroscopiques (IR, PM-IRRAS, XPS, RBS, ToF-SIMS) ou encore microscopiques (AFM, STM) ont montré que des couches denses, pouvant atteindre quelques centaines de nanomètres d'épaisseur, sont obtenues sur différents substrats tels que le carbone, les métaux, les semi-conducteurs, mais aussi les polymères ou des diélectriques inorganiques (en présence d'un réducteur chimique). Les films organiques formés sont particulièrement robustes. Ils sont stables dans le temps mais également sous stress thermique

(jusqu'à 250°C). Ils résistent au rinçage dans différents solvants (acétonitrile, diméthylformamide, dichlorométhane...) même avec un traitement dans un bain à ultrasons.

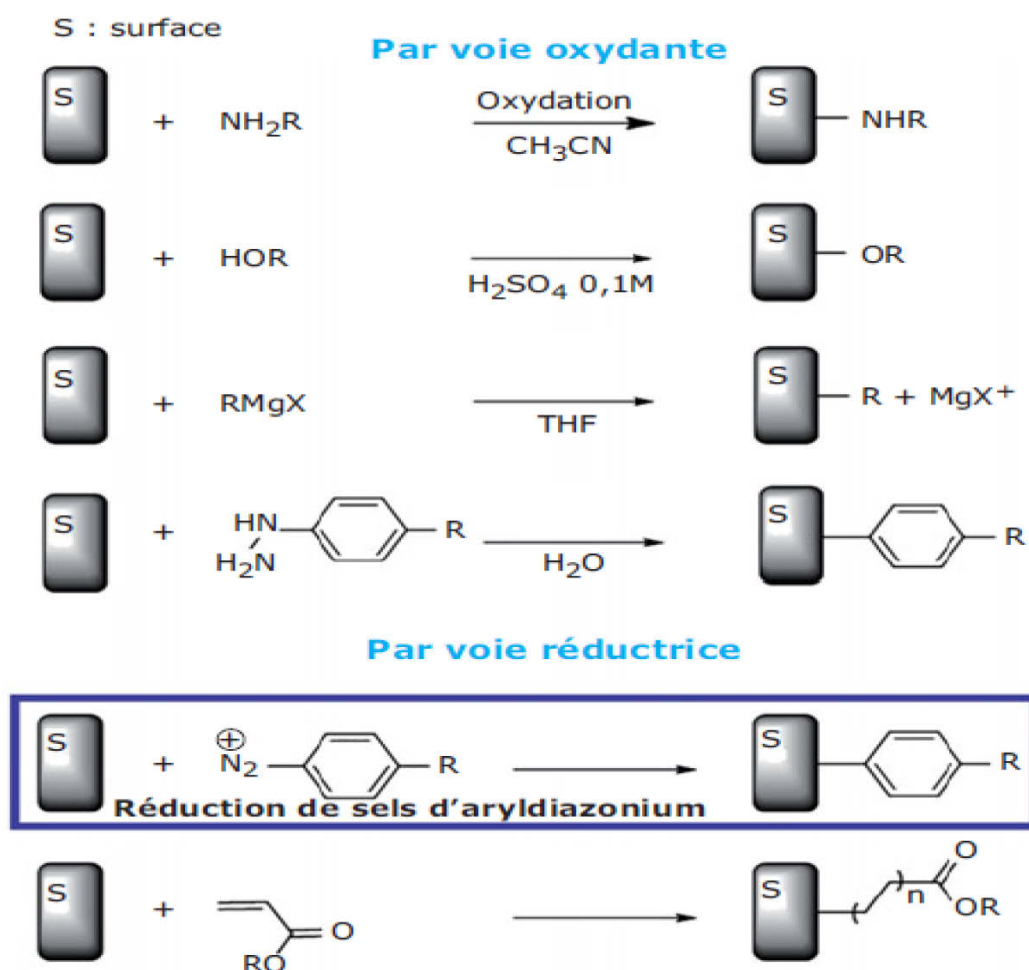


Figure 19 : différentes voies radicalaires de chimigreffage [137]

a. La technique de dépôt par électrophorèse

La technique électrophorétique exploite le phénomène de migration de particules chargées dans une suspension soumise à l'effet d'un champ électrique. L'apparente simplicité du procédé cache pourtant de nombreux développements scientifiques. En effet, les suspensions utilisées pour l'EPD ainsi que les mécanismes de dépôt se basent sur la science des colloïdes. Ce domaine fournit aux chercheurs de nombreuses voies à explorer et à maîtriser sous de nombreux aspects. Afin d'expliquer le comportement d'une suspension ou solution, une multitude d'expériences ont été réalisées et plusieurs théories ont été formulées.

De manière générale, les systèmes colloïdaux sont définis comme un mélange d'une phase dispersée uniformément et finement divisée (de 1 nm à 1 μm ou plus) dans un milieu dispersant. Au niveau technique, la grande flexibilité de la méthode électrophorétique permet de produire une multitude d'objets dans de nombreux matériaux (céramiques, métaux, polymères). Les dépôts de matériaux céramiques aux propriétés diverses ont ainsi été élaborés : piézoélectriques, ferroélectriques, matériaux magnétiques et semi-conducteurs. Les applications biomédicales du procédé sont aussi de plus en plus développées. En effet, le recouvrement de prothèses métalliques aux formes compliquées est aisé et la biocompatibilité peut être assurée avec le matériau adéquat. Les piles à combustible, les panneaux solaires, les appareils électrochromiques, la microélectronique, les batteries sont autant de domaines où la technique de dépôt par électrophorèse présente de nombreux avantages.

Aujourd'hui, les implications de ce domaine sont énormes pour de nombreuses applications industrielles : émulsions (produits pharmaceutiques et cosmétiques, produits laitiers,...), traitement des eaux, gels, produits de nettoyage, plastiques, céramiques, cristaux liquides... Mais ils jouent également un rôle majeur dans la compréhension des processus biologiques : le sang (dispersion de corpuscules dans du sérum), l'os (dispersion de phosphate de calcium dans du collagène), la structure des protéines...etc.

▪ *Principe*

Le principe de la technique de dépôt par électrophorèse repose sur la migration de particules chargées en suspension sous l'effet d'un champ électrique entre deux électrodes. Un dépôt se forme alors sur une électrode comme l'illustre le schéma de la Figure 20. Cette méthode permet de réaliser des microstructures uniques avec de multiples composés. Comme en témoignent les nombreux travaux publiés aux cours de ces dix dernières années, l'exploitation expérimentale de ce procédé ne cesse de se développer. Cependant, cette technique est peu répandue.

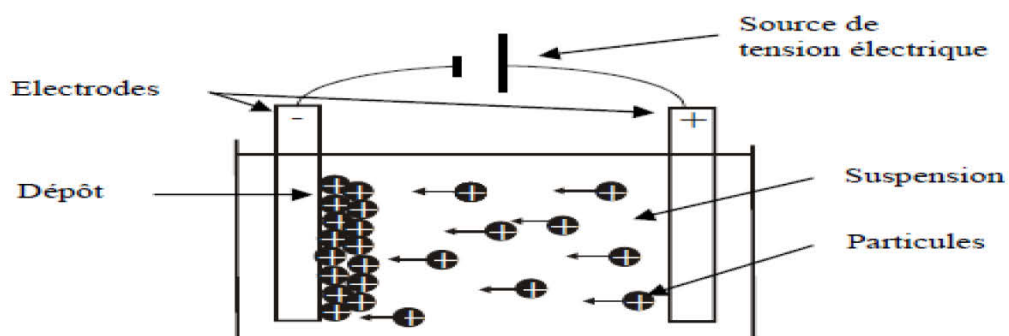


Figure 20: représentation schématique de la technique de dépôt par électrophorèse.

b. Fonctionnalisation par déposition électrophorétique (EPD) avec rGO/PEI

Les interfaces modifiées par l'oxyde de graphène réduit ont suscité un grand intérêt ces dernières années dans les capteurs électrochimiques et les biocapteurs [120,121,124,142–145]. La nature conductrice électronique du rGO, sa grande surface et la présence de groupes contenant de l'oxygène sont considérées comme responsables de l'hétérogénéité accrue taux de transfert d'électrons et excellentes propriétés électrochimiques des électrodes revêtues de rGO [121,145]. Les groupes abondants contenant de l'oxygène, en particulier les fonctions acides carboxyliques, fournissent en outre une plate-forme appropriée pour l'immobilisation de biomolécules. Pour tirer pleinement parti des propriétés de rGO pour la détection, le dépôt contrôlé et reproductible de rGO sur les interfaces électriques est nécessaire. La fabrication des électrodes revêtues rGO utilise principalement des méthodes de dépôt à base de solution telles que le revêtement par trempage, l'assemblage couche par couche, le revêtement par centrifugation, la coulée en goutte ou le revêtement par pulvérisation [146]. De nombreux fragments de graphène avec une couverture, un nombre de couches et une orientation mal définis. De telles interfaces sont également souvent de type graphite, car le nombre de feuilles de graphène dépasse souvent 100 feuilles.

L'un des matériaux ayant fait l'objet d'une attention accrue est le graphène modifié par la polyéthylèneimine (PEI) [147–150]. Sa haute densité en fonction amine et spécialement les amines primaires situées aux extrémités de la chaîne et leur accessibilité permettent au polymère d'être lié de manière covalente à GO et rGO par carbodiimide. La réaction de réticulation entre les groupes -COOH de GO et les groupes -NH₂ de PEI. Les polymères de PEI peuvent également interagir avec les groupes oxygénés de nanofeuillets de GO via des interactions électrostatiques, ce qui donne des nanofeuillets chargés positivement [151].

c. Biocapteurs et Déposition électrophorétique

Il a été démontré dans plusieurs travaux que le dépôt électrophorétique (EPD) offre plusieurs avantages par rapport à d'autres approches de revêtement surfaciques, telles que la simplicité du processus, l'uniformité et un bon contrôle de l'épaisseur des couches minces déposées [124,142][127,152–154]. Bien que la modification des électrodes en entier ait été déjà réalisée, mais à notre connaissance, l'application de l'EPD pour la fonctionnalisation sélective des électrodes dans les microsystèmes électrochimiques n'a pas encore été rapportée dans la littérature.

La réduction de l'épaisseur du revêtement rGO de manière contrôlée par dépôt électrophorétique (EPD) s'est révélée très bénéfique pour la construction de capteurs électrochimiques. La technique EPD de GO offre plusieurs avantages par rapport aux autres approches de revêtement surfacique, telles que la simplicité du procédé, l'uniformité des films déposés et un bon contrôle de l'épaisseur du film [142,154–161]. Wu et al., pionniers du process EDP pour les films minces du rGO, montrent que le GO chargé avec Mg^{2+} peut être déposé sur une cathode sous une tension appliquée de 100 à 160 V.

Ruoff et ses collègues ont démontré que des films de graphène ajustables en épaisseur peuvent être obtenus par EPD contrôlée d'hydrazine ou de GO modifié avec KOH [155]. En effet, les ions métalliques sont couramment utilisés comme additifs pour produire des suspensions GO chargées positivement permettant une EPD cathodique avec réduction simultanée de GO.

Wang et al. ont développé plus récemment une plate-forme non enzymatique sensible et stable pour la détection du D-glucose reposant sur une matrice d'oxyde de graphène réduit (rGO) déposée par électrophorèse modifiée avec des nanostructures de $Ni(OH)_2$ ou Cu [126,142,152]. En effet, les ions métalliques sont couramment utilisés comme additifs pour produire des suspensions de GO chargées positivement, permettant une EPD cathodique avec réduction simultanée de GO [142].

1.7 Conclusion

Ce chapitre a été consacré en premier aux quelques généralités sur les bactéries pathogènes. Quelques données statistiques et études sur des maladies causées par ces agents sont venues en renfort. Puis elles ont été étendues aux agents causant les infections nosocomiales. Ensuite, l'exemple des infections des voies urinaires a été développé en vue de sa forte relation avec le but de cette recherche bibliographique. Enfin, quelques notions indispensables à la compréhension de la reconnaissance biologique et les anticorps dirigés vers l'E. Coli uropathogène ont été rappelées.

En conclusion les biocapteurs électrochimiques, plus particulièrement, le capteur impédancemétrique peut prendre la position de leader dans ce domaine.

L'utilisation des anticorps sandwichs ou biotinylés ont prouvé leur efficacité lors de l'arrimage avec la bactérie spécifique. Ainsi l'orientation uniforme des anticorps de la partie constante (Fc) liée avec la partie externe de l'antigène (Fab) peut être réalisée par un couplage

biotine-avidine ou l'immobilisation de la protéine A/G, d'autant plus que Le lectine (WGA) joue un rôle important dans l'amplification du signal pour les immunocapteurs d'impédance. Dans le cas des ultramicroélectrodes (UME), la préparation de l'état de surface est primordiale que ce soit sur la propreté ou la rugosité.

Bibliographie

- [1] Huang X-J, Choi Y-K. Chemical sensors based on nanostructured materials. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2007;122:659–71. doi:10.1016/j.snb.2006.06.022.
- [2] Vaseashta A, Dimova-Malinovska D. Nanostructured and nanoscale devices, sensors and detectors. *Science and Technology of Advanced Materials* 2005;6:312–8. doi:10.1016/j.stam.2005.02.018.
- [3] Toulon CH. Infections nosocomiales. Site Internet du/de la CH Toulon n.d. <http://www.ch-toulon.fr/patients/sante-publique/infections-nosocomiales-776.html> (accessed July 5, 2018).
- [4] Kakupa DK, Muenze PK, Byl B, Wilmet MD. Etude de la prévalence des infections nosocomiales et des facteurs associés dans les deux hopitaux universitaires de Lubumbashi, République Démocratique du Congo: cas des Cliniques Universitaires de Lubumbashi et l'Hôpital Janson Sendwe. *Pan Afr Med J* 2016;24. doi:10.11604/pamj.2016.24.275.7626.
- [5] Infections nosocomiales : questions réponses - Ministère des Solidarités et de la Santé n.d. <http://solidarites-sante.gouv.fr/soins-et-maladies/prises-en-charge-specialisees/infections-osteo-articulaires/infections-nosocomiales-questions-reponses/> (accessed July 5, 2018).
- [6] MICROORGANISMES RESPONSABLES D'INFECTIONS NOSOCOMIALES. 2004.
- [7] Boye CS, Sow AI. [Nosocomial infections: main causative agents]. *Dakar Med* 2007;52:77–81.
- [8] Hagan EC, Donnenberg MS, Mobley HLT. Uropathogenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 2009;3. doi:10.1128/ecosalplus.8.6.1.3.
- [9] Haley RW, Culver DH, White JW, Morgan WM, Emori TG, Munn VP, et al. THE EFFICACY OF INFECTION SURVEILLANCE AND CONTROL PROGRAMS IN PREVENTING NOSOCOMIAL INFECTIONS IN US HOSPITALS. *American Journal of Epidemiology* 1985;121:182–205. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a113990.
- [10] L institut Pasteur. Les infections nosocomiales, - PDF n.d. <https://docplayer.fr/8603840-L-institut-pasteur-les-infections-nosocomiales.html> (accessed July 8, 2018).
- [11] Hsueh P-R, Chen W-H, Luh K-T. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991–2003 at a university hospital in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005;26:463–72. doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.08.016.
- [12] Jarvis WR, Martone WJ. Predominant pathogens in hospital infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1992;29:19–24. doi:10.1093/jac/29.suppl_A.19.
- [13] Sheerin NS. Urinary tract infection. *Medicine* 2011;39:384–9. doi:10.1016/j.mpmed.2011.04.003.
- [14] Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:631–46. doi:10.1128/CMR.00120-13.
- [15] Serra B, Gamella M, Reviejo AJ, Pingarrón JM. Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008;391:1853–60. doi:10.1007/s00216-008-2141-6.
- [16] Wang Y, Ye Z, Si C, Ying Y. Monitoring of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor. *Food Chemistry* 2013;136:1303–8. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.069.

- [17] Tolba M, Ahmed MU, Tlili C, Eichenseher F, Loessner MJ, Zourob M. A bacteriophage endolysin-based electrochemical impedance biosensor for the rapid detection of *Listeria* cells. *The Analyst* 2012;137:5749. doi:10.1039/c2an35988j.
- [18] Tawil N, Sacher E, Mandeville R, Meunier M. Surface plasmon resonance detection of *E. coli* and methicillin-resistant *S. aureus* using bacteriophages. *Biosensors and Bioelectronics* 2012;37:24–9. doi:10.1016/j.bios.2012.04.048.
- [19] Ricci F, Volpe G, Micheli L, Palleschi G. A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis. *Analytica Chimica Acta* 2007;605:111–29. doi:10.1016/j.aca.2007.10.046.
- [20] Wang Y, Ye Z, Ying Y. New Trends in Impedimetric Biosensors for the Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Sensors* 2012;12:3449–71. doi:10.3390/s120303449.
- [21] Byrne B, Stack E, Gilmartin N, O’Kennedy R. Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins. *Sensors* 2009;9:4407–45. doi:10.3390/s90604407.
- [22] Li D, Feng Y, Zhou L, Ye Z, Wang J, Ying Y, et al. Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Analytica Chimica Acta* 2011;687:89–96. doi:10.1016/j.aca.2010.12.018.
- [23] Laczka O, Baldrich E, Muñoz FX, del Campo FJ. Detection of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Using Interdigitated Microelectrode Capacitive Immunosensors: The Importance of Transducer Geometry. *Anal Chem* 2008;80:7239–47. doi:10.1021/ac800643k.
- [24] Salam F, Tothill IE. Detection of *Salmonella typhimurium* using an electrochemical immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 2009;24:2630–6. doi:10.1016/j.bios.2009.01.025.
- [25] Khider M, Buyukcangaz E. PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* DETECTED IN FOOD PRODUCING RUMINANTS IN TURKEY. *Fresenius Environmental Bulletin* n.d.;27:7.
- [26] HADJER M, KENZA A. Pathogénicité chez *Escherichia coli* n.d.:50.
- [27] Shabab Ali. 2 bio265 prokaryotes vs eukaryotes_dr di bonaventura 21:23:11 UTC.
- [28] KOVA paint & waterproofing - Anti-bacterial mechanism n.d. <http://cache.kovapaint.com/en/product/Anti-bacterial-mechanism.html> (accessed July 9, 2018).
- [29] Kahlouche K, Jijie R, Hosu I, Barras A, Gharbi T, Yahiaoui R, et al. Controlled modification of electrochemical microsystems with polyethylenimine/reduced graphene oxide using electrophoretic deposition: Sensing of dopamine levels in meat samples. *Talanta* 2018;178:432–40. doi:10.1016/j.talanta.2017.09.065.
- [30] Arranz DL. LAS INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO: NUEVO ABORDAJE CON PROANTOCIANIDINAS, D-MANOSA Y NOXAMICINA n.d.:29.
- [31] Portes d’entrée n.d. http://biologie.cmaisonneuve.qc.ca/epidemiologie/portes_entree.html (accessed July 10, 2018).
- [32] Ouadghiri S, Brick C, Benseffaj N, Atouf O, Essakalli M. Effets indésirables receveurs à l’hôpital Ibn Sina de Rabat : bilan 1999–2013. *Transfusion Clinique et Biologique* 2017;24:23–7. doi:10.1016/j.traccli.2016.10.002.
- [33] Moresco EMY, Vine DL, Beutler B. Prion-like behavior of MAVS in RIG-I signaling. *Cell Res* 2011;21:1643–5. doi:10.1038/cr.2011.155.
- [34] Hoebe K. Toll-Like Receptors. *Encyclopedia of Cancer*, Springer, Berlin, Heidelberg; 2011, p. 3723–5. doi:10.1007/978-3-642-16483-5_5855.

- [35] Backhaus O. Generation of Antibody Diversity. *Antibody Engineering* 2018. doi:10.5772/intechopen.72818.
- [36] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. Garland Science; 2002.
- [37] Halouane F, Jijie R, Meziane D, Li C, Singh SK, Bouckaert J, et al. Selective isolation and eradication of *E. coli* associated with urinary tract infections using anti-fimbrial modified magnetic reduced graphene oxide nanoheaters. *Journal of Materials Chemistry B* 2017;5:8133–42. doi:10.1039/C7TB01890H.
- [38] PAQUE RE, MILLER R, THOMAS V. Polyclonal Anti-Idiotypic Antibodies Exhibit Antigenic Mimicry of Limited Type 1 Fimbrial Proteins of *Escherichia coli*. *INFECT IMMUN* 1990;58:7.
- [39] Ivnitski D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E, Stricker S. Application of electrochemical biosensors for detection of food pathogenic bacteria. *Electroanalysis* 2000;12:317–325.
- [40] Meng J, Doyle MP. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bulletin de l'Institut Pasteur* 1998;96:151–63. doi:10.1016/S0020-2452(98)80010-9.
- [41] Feng P. Commercial Assay Systems for Detecting Foodborne *Salmonella*: A Review. *Journal of Food Protection* 1992;55:927–34. doi:10.4315/0362-028X-55.11.927.
- [42] Association of Official Analytical Chemists, Helrich K. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Arlington, VA: The Association; 1990.
- [43] Dupont D. Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire. *Biochimie Alimentaire, analyses et alimentation humaine* 2005;2:22.
- [44] Gronow M. Biosensors. *Trends in Biochemical Sciences* 1984;9:336–40. doi:10.1016/0968-0004(84)90055-0.
- [45] Kress-Rogers E. *Handbook of Biosensors and Electronic Noses: Medicine, Food, and the Environment*. CRC Press; 1996.
- [46] Hobson NS, Tothill I, Turner APF. Microbial detection. *Biosensors and Bioelectronics* 1996;11:455–77. doi:10.1016/0956-5663(96)86783-2.
- [47] Basile F, Beverly MB, Voorhees KJ, Hadfield TL. Pathogenic bacteria: their detection and differentiation by rapid lipid profiling with pyrolysis mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 1998;17:95–109. doi:10.1016/S0165-9936(97)00103-9.
- [48] Ghindilis AL, Atanasov P, Wilkins M, Wilkins E. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. *Biosensors and Bioelectronics* 1998;13:113–31. doi:10.1016/S0956-5663(97)00031-6.
- [49] Ivnitski D, Rishpon J. A one-step, separation-free amperometric enzyme immunosensor n.d.:10.
- [50] Kaláb T, Skládal P. Evaluation of mediators for development of amperometric microbial bioelectrodes. *Electroanalysis* 1994;6:1004–8. doi:10.1002/elan.1140061114.
- [51] Wilkins JR. Use of platinum electrodes for the electrochemical detection of bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1978;36:683–7.
- [52] Matsunaga T, Karube I, Suzuki S. Electrode System for the Determination of Microbial Populations. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:117–21.
- [53] Holland RL, Cooper BH, Helgeson NG, McCracken AW. Automated detection of microbial growth in blood cultures by using stainless-steel electrodes. *Journal of Clinical Microbiology* 1980;12:180–4.
- [54] Takayama K, Kurosaki T, Ikeda T. Mediated electrocatalysis at a biocatalyst electrode based on a bacterium, *Gluconobacter industrius*. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1993;356:295–301. doi:10.1016/0022-0728(93)80529-Q.

- [55] Suzuki H, Tamiya E, Karube I. Disposable amperometric CO₂ sensor employing bacteria and a miniature oxygen electrode. *Electroanalysis* 1991;3:53–7. doi:10.1002/elan.1140030110.
- [56] Piehler J, Brecht A, Geckeler KE, Gauglitz G. Surface modification for direct immunoprobes. *Biosensors and Bioelectronics* 1996;11:579–90. doi:10.1016/0956-5663(96)83293-3.
- [57] Morgan CL, Newman DJ, Price CP. Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clinical Chemistry* 1996;42:193–209.
- [58] Endo H, Fujisaki K, Ohkubo Y, Hayashi T, Watanabe E. A Biosensor System for the Determination of Cell Number of *Enterococcus seriolicida*. *Fisheries Science* 1996;62:235–9. doi:10.2331/fishsci.62.235.
- [59] Luong JHT, Mulchandani A, Guilbault GG. Developments and applications of biosensors. *Trends in Biotechnology* 1988;6:310–6. doi:10.1016/0167-7799(88)90026-1.
- [60] Clark LC, Lyons C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1962;102:29–45. doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [61] Palmisano F, Centonze D, Quinto M, Zambonin PG. A microdialysis fibre based sampler for flow injection analysis: determination of L-lactate in biofluids by an electrochemically synthesised bilayer membrane based biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 1996;11:419–25. doi:10.1016/0956-5663(96)82737-0.
- [62] Mai AT. Développement de biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection de polluants organiques en phase aqueuse n.d.:154.
- [63] Jenkins SH, Heineman WR, Halsall HB. Extending the detection limit of solid-phase electrochemical enzyme immunoassay to the attomole level. *Analytical Biochemistry* 1988;168:292–9. doi:10.1016/0003-2697(88)90321-1.
- [64] Braiek M, Rokbani KB, Chrouda A, Mrabet B, Bakhrouf A, Maaref A, et al. An Electrochemical Immunosensor for Detection of *Staphylococcus aureus* Bacteria Based on Immobilization of Antibodies on Self-Assembled Monolayers-Functionalized Gold Electrode. *Biosensors* 2012;2:417–26. doi:10.3390/bios2040417.
- [65] Tam-Chang S-W, Biebuyck HA, Whitesides GM, Jeon N, Nuzzo RG. Self-Assembled Monolayers on Gold Generated from Alkanethiols with the Structure RNHCOCH₂SH. *Langmuir* 1995;11:4371–82. doi:10.1021/la00011a033.
- [66] Wang S, Xie J, Jiang M, Chang K, Chen R, Ma L, et al. The Development of a Portable SPR Bioanalyzer for Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Sensors* 2016;16:1856. doi:10.3390/s16111856.
- [67] Moll N. Étude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries. thesis. Bordeaux 1, 2007.
- [68] MOLL N. Etude et réalisation d'un système immunocapteurs à ondes de Love : application à la détection de toxines, de virus ou de bactéries. Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, 2007.
- [69] Li T, Yao Z, Ding L. Development of an amperometric biosensor based on glucose oxidase immobilized through silica sol–gel film onto Prussian Blue modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2004;101:155–60. doi:10.1016/j.snb.2004.02.047.
- [70] Clark LC, Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci* 1962;102:29–45.
- [71] Hart JP, Pemberton RM, Luxton R, Wedge R. Studies towards a disposable screen-printed amperometric biosensor for progesterone. Oral presentation given at Biosensors '96, World Congress on Biosensors IV, Bangkok, Thailand, 29–31 May 1996.1.

- Biosensors and Bioelectronics 1997;12:1113–21. doi:10.1016/S0956-5663(97)00033-X.
- [72] Laitinen MPA, Vuento M. Affinity immunosensor for milk progesterone: identification of critical parameters. *Biosensors and Bioelectronics* 1996;11:1207–14. doi:10.1016/0956-5663(96)88085-7.
 - [73] Kimura J, Murakami T, Kuriyama T, Karube I. An integrated multibiosensor for simultaneous amperometric and potentiometric measurement. *Sensors and Actuators* 1988;15:435–43. doi:10.1016/0250-6874(88)81512-9.
 - [74] Luttge R. *Microfabrication for Industrial Applications*. Elsevier Science. William Andrew; 2011.
 - [75] Luttge R. *Nano- and microfabrication for industrial and biomedical applications*. Elsevier; 2016.
 - [76] Cai X, Glidle A, Cooper JM. Miniaturized Electroanalytical Sensor Systems in Micromachined Structures. *Electroanalysis* 2000;12:631–9. doi:10.1002/1521-4109(200005)12:9<631::AID-ELAN631>3.0.CO;2-7.
 - [77] Mello LD, Kubota LT. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 2002;77:237–56. doi:10.1016/S0308-8146(02)00104-8.
 - [78] Yang L, Ruan C, Li Y. Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance. *Biosensors and Bioelectronics* 2003;19:495–502. doi:10.1016/S0956-5663(03)00229-X.
 - [79] Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clinical Microbiology Reviews* 2014;27:631–46. doi:10.1128/CMR.00120-13.
 - [80] Laczka O, Maesa J-M, Godino N, del Campo J, Fougat-Hansen M, Kutter JP, et al. Improved bacteria detection by coupling magneto-immunocapture and amperometry at flow-channel microband electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* 2011;26:3633–40. doi:10.1016/j.bios.2011.02.019.
 - [81] Maalouf R, Fournier-Wirth C, Coste J, Chebib H, Saïkali Y, Vittori O, et al. Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance. *Anal Chem* 2007;79:4879–86. doi:10.1021/ac070085n.
 - [82] Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clinical Microbiology Reviews* 2014;27:631–46. doi:10.1128/CMR.00120-13.
 - [83] Weiner LM, Surana R, Wang S. Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2010;10:317–27. doi:10.1038/nri2744.
 - [84] Conroy PJ, Hearty S, Leonard P, O’Kennedy RJ. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2009;20:10–26. doi:10.1016/j.semcdb.2009.01.010.
 - [85] Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* 2012;30:489–511. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
 - [86] Sassolas A, Marty J-L. Biocapteurs au service du diagnostic médical. *Technologies biomédicales* 2013;2:24.
 - [87] Kim D, Herr AE. Protein immobilization techniques for microfluidic assays. *Biomicrofluidics* 2013;7. doi:10.1063/1.4816934.
 - [88] Trilling AK, Beekwilder J, Zuilhof H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst* 2013;138:1619–27. doi:10.1039/C2AN36787D.

- [89] Conroy PJ, Hearty S, Leonard P, O’Kennedy RJ. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2009;20:10–26. doi:10.1016/j.semcdb.2009.01.010.
- [90] Sharma S, Byrne H, O’Kennedy RJ. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors. *Essays In Biochemistry* 2016;60:9–18. doi:10.1042/EBC20150002.
- [91] Kierny MR, Cunningham TD, Kay BK. Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms. *Nano Rev* 2012;3. doi:10.3402/nano.v3i0.17240.
- [92] Feyssa B, Liedert C, Kivimaki L, Johansson L-S, Jantunen H, Hakalahti L. Patterned Immobilization of Antibodies within Roll-to-Roll Hot Embossed Polymeric Microfluidic Channels. *PLOS ONE* 2013;8:e68918. doi:10.1371/journal.pone.0068918.
- [93] Rahman MA, Shiddiky MJA, Park J-S, Shim Y-B. An impedimetric immunosensor for the label-free detection of bisphenol A. *Biosensors and Bioelectronics* 2007;22:2464–70. doi:10.1016/j.bios.2006.09.010.
- [94] Jarocka U, Sawicka R, Góra-Sochacka A, Sirko A, Zagórski-Ostoja W, Radecki J, et al. An Immunosensor Based on Antibody Binding Fragments Attached to Gold Nanoparticles for the Detection of Peptides Derived from Avian Influenza Hemagglutinin H5. *Sensors* 2014;14:15714–28. doi:10.3390/s140915714.
- [95] Lin P-C, Chen S-H, Wang K-Y, Chen M-L, Adak AK, Hwu J-RR, et al. Fabrication of Oriented Antibody-Conjugated Magnetic Nanoprobes and Their Immunoaffinity Application. *Analytical Chemistry* 2009;81:8774–82. doi:10.1021/ac9012122.
- [96] Shriver-Lake LC, Donner B, Edelstein R, Kristen Breslin, Bhatia SK, Ligler FS. Antibody immobilization using heterobifunctional crosslinkers. *Biosensors and Bioelectronics* 1997;12:1101–6. doi:10.1016/S0956-5663(97)00070-5.
- [97] Andersson O, Larsson A, Ekblad T, Liedberg B. Gradient Hydrogel Matrix for Microarray and Biosensor Applications: An Imaging SPR Study. *Biomacromolecules* 2009;10:142–8. doi:10.1021/bm801029b.
- [98] Zammattéo N, Jeanmart L, Hamels S, Courtois S, Louette P, Hevesi L, et al. Comparison between Different Strategies of Covalent Attachment of DNA to Glass Surfaces to Build DNA Microarrays. *Analytical Biochemistry* 2000;280:143–50. doi:10.1006/abio.2000.4515.
- [99] Le Goff G. Immobilisation de biomolécules pour l’analyse multiparamétrique sur biopuces : application au génotypage érythrocytaire haut-débit. thesis. Lyon 1, 2011.
- [100] de Juan-Franco E, Caruz A, Pedrajas JR, Lechuga LM. Site-directed antibody immobilization using a protein A–gold binding domain fusion protein for enhanced SPR immunosensing. *The Analyst* 2013;138:2023. doi:10.1039/c3an36498d.
- [101] Barton AC, Collyer SD, Davis F, Garifallou G-Z, Tsekenis G, Tully E, et al. Labelless AC impedimetric antibody-based sensors with pgml–1 sensitivities for point-of-care biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics* 2009;24:1090–5. doi:10.1016/j.bios.2008.06.001.
- [102] Ionescu RE, Gondran C, Bouffier L, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Cosnier S. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine. *Electrochimica Acta* 2010;55:6228–32. doi:10.1016/j.electacta.2009.11.029.
- [103] Park M, Cella LN, Chen W, Myung NV, Mulchandani A. Carbon nanotubes-based chemiresistive immunosensor for small molecules: Detection of nitroaromatic explosives. *Biosensors and Bioelectronics* 2010;26:1297–301. doi:10.1016/j.bios.2010.07.017.
- [104] Chebil S, Hafaiedh I, Sauriat-Dorizon H, Jaffrezic-Renault N, Errachid A, Ali Z, et al. Electrochemical detection of d-dimer as deep vein thrombosis marker using single-

- chain d-dimer antibody immobilized on functionalized polypyrrole. *Biosensors and Bioelectronics* 2010;26:736–42. doi:10.1016/j.bios.2010.06.048.
- [105] Encarnação JM, Rosa L, Rodrigues R, Pedro L, Da FS, Gonçalves J, et al. Piezoelectric biosensors for biorecognition analysis: application to the kinetic study of HIV-1 Vif protein binding to recombinant antibodies. *J Biotechnol* 2007;132:142–8. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.04.010.
- [106] Dunne L, Daly S, Baxter A, Haughey S, O’Kennedy R. Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay for the Detection of Aflatoxin B1 Using Single-Chain Antibody Fragments. *Spectroscopy Letters* 2005;38:229–45. doi:10.1081/SL-200058689.
- [107] Yan H, Shen Z, Mernaugh R, Zeng X. Single Chain Fragment Variable Recombinant Antibody as a Template for Fc Sensors. *Anal Chem* 2011;83:625–30. doi:10.1021/ac102087w.
- [108] Benhar I, Eshkenazi I, Neufeld T, Opatowsky J, Shaky S, Rishpon J. Recombinant single chain antibodies in bioelectrochemical sensors. *Talanta* 2001;55:899–907.
- [109] Grennan K, Strachan G, Porter AJ, Killard AJ, Smyth MR. Atrazine analysis using an amperometric immunosensor based on single-chain antibody fragments and regeneration-free multi-calibrant measurement. *Analytica Chimica Acta* 2003;500:287–98. doi:10.1016/S0003-2670(03)00942-5.
- [110] Love TE, Redmond C, Mayers CN. Real time detection of anthrax spores using highly specific anti-EA1 recombinant antibodies produced by competitive panning. *Journal of Immunological Methods* 2008;334:1–10. doi:10.1016/j.jim.2007.12.022.
- [111] Grewal YS, Shiddiky MJA, Gray SA, Weigel KM, Cangelosi GA, Trau M. Label-free electrochemical detection of an *Entamoeba histolytica* antigen using cell-free yeast-scFv probes. *Chem Commun (Camb)* 2013;49:1551–3. doi:10.1039/c2cc38882k.
- [112] Kausaite-Minkstiene A, Ramanavicius A, Ruksnaite J, Ramanaviciene A. A surface plasmon resonance immunosensor for human growth hormone based on fragmented antibodies. *Analytical Methods* 2013;5:4757. doi:10.1039/c3ay40614h.
- [113] *Electrochimie Analytique Et Reactions En Solution T.2 - Reactions Et Methodes - Tremillon Bernard - ELSEVIER-MASSON - Livres* n.d. <http://www.gibertjoseph.com/electrochimie-analytique-et-reactions-en-solution-t-2-reactions-et-methodes-2960033.html> (accessed March 28, 2018).
- [114] Xiao T, Wu F, Hao J, Zhang M, Yu P, Mao L. In Vivo Analysis with Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* 2017;89:300–13. doi:10.1021/acs.analchem.6b04308.
- [115] Wolfrum B, Kätelhön E, Yakushenko A, Krause KJ, Adly N, Hüske M, et al. Nanoscale Electrochemical Sensor Arrays: Redox Cycling Amplification in Dual-Electrode Systems. *Accounts of Chemical Research* 2016;49:2031–40. doi:10.1021/acs.accounts.6b00333.
- [116] Neethirajan S. Recent advances in wearable sensors for animal health management. *Sensing and Bio-Sensing Research* 2017;12:15–29. doi:10.1016/j.sbsr.2016.11.004.
- [117] Adhikari B-R, Govindhan M, Chen A. Carbon Nanomaterials Based Electrochemical Sensors/Biosensors for the Sensitive Detection of Pharmaceutical and Biological Compounds. *Sensors (Basel)* 2015;15:22490–508. doi:10.3390/s150922490.
- [118] Alwarappan S, Erdem A, Liu C, Li C-Z. Probing the Electrochemical Properties of Graphene Nanosheets for Biosensing Applications. *The Journal of Physical Chemistry C* 2009;113:8853–7. doi:10.1021/jp9010313.
- [119] Bollella P, Fusco G, Tortolini C, Sanzò G, Favero G, Gorton L, et al. Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. *Biosensors and Bioelectronics* 2017;89:152–66. doi:10.1016/j.bios.2016.03.068.

- [120] Chekin F, Singh SK, Vasilescu A, Dhavale VM, Kurungot S, Boukherroub R, et al. Reduced Graphene Oxide Modified Electrodes for Sensitive Sensing of Gliadin in Food Samples. *ACS Sensors* 2016;1:1462–70. doi:10.1021/acssensors.6b00608.
- [121] Pumera M. Electrochemistry of graphene: new horizons for sensing and energy storage. *Chem Rec* 2009;9:211–23. doi:10.1002/tcr.200900008.
- [122] Shao Y, Wang J, Wu H, Liu J, Aksay IA, Lin Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis* 2010;22:1027–36. doi:10.1002/elan.200900571.
- [123] Wu S, He Q, Tan C, Wang Y, Zhang H. Graphene-based electrochemical sensors. *Small* 2013;9:1160–1172.
- [124] He L, Wang Q, Mandler D, Li M, Boukherroub R, Szunerits S. Detection of folic acid protein in human serum using reduced graphene oxide electrodes modified by folic-acid. *Biosensors and Bioelectronics* 2016;75:389–95. doi:10.1016/j.bios.2015.08.060.
- [125] Wang Q, Vasilescu A, Wang Q, Coffinier Y, Li M, Boukherroub R, et al. Electrophoretic Approach for the Simultaneous Deposition and Functionalization of Reduced Graphene Oxide Nanosheets with Diazonium Compounds: Application for Lysozyme Sensing in Serum. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2017;9:12823–31. doi:10.1021/acsaami.6b15955.
- [126] Wang Q, Wang Q, Li M, Szunerits S, Boukherroub R. Preparation of reduced graphene oxide/Cu nanoparticle composites through electrophoretic deposition: application for nonenzymatic glucose sensing. *RSC Advances* 2015;5:15861–9. doi:10.1039/C4RA14132F.
- [127] Wang Q, Kaminska I, Niedziolka-Jonsson J, Opallo M, Li M, Boukherroub R, et al. Sensitive sugar detection using 4-aminophenylboronic acid modified graphene. *Biosensors and Bioelectronics* 2013;50:331–7. doi:10.1016/j.bios.2013.06.015.
- [128] Li F, Jiang X, Zhao J, Zhang S. Graphene oxide: A promising nanomaterial for energy and environmental applications. *Nano Energy* 2015;16:488–515. doi:10.1016/j.nanoen.2015.07.014.
- [129] Mevold AHH, Hsu W-W, Hardiansyah A, Huang L-Y, Yang M-C, Liu T-Y, et al. Fabrication of Gold Nanoparticles/Graphene-PDDA Nanohybrids for Bio-detection by SERS Nanotechnology. *Nanoscale Res Lett* 2015;10. doi:10.1186/s11671-015-1101-2.
- [130] Hong BJ, Compton OC, An Z, Eryzazici I, Nguyen ST. Successful Stabilization of Graphene Oxide in Electrolyte Solutions: Enhancement of Bio-functionalization and Cellular Uptake. *ACS Nano* 2012;6:63–73. doi:10.1021/nn202355p.
- [131] Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews* 1996;96:1533–54. doi:10.1021/cr9502357.
- [132] Allara DL, Nuzzo RG. Spontaneously organized molecular assemblies. 2. Quantitative infrared spectroscopic determination of equilibrium structures of solution-adsorbed n-alkanoic acids on an oxidized aluminum surface. *Langmuir* 1985;1:52–66. doi:10.1021/la00061a008.
- [133] Allara DL, Nuzzo RG. Spontaneously organized molecular assemblies. 1. Formation, dynamics, and physical properties of n-alkanoic acids adsorbed from solution on an oxidized aluminum surface. *Langmuir* 1985;1:45–52. doi:10.1021/la00061a007.
- [134] Schlotter NE, Porter MD, Bright TB, Allara DL. Formation and structure of a spontaneously adsorbed monolayer of arachidic on silver. *CHEM PHYS LETT*, *Chemical Physics Letters* 1986;132:93–8. doi:10.1016/0009-2614(86)80702-3.
- [135] Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, *Chemical Reviews* 1951, *Chemical Reviews* 1954, *Journal of the American Chemical Society* 2005;105:1103–69. doi:10.1021/cr0300789.

- [136] Lecollinet G, Delorme N, Edely M, Gibaud A, Bardeau J-F, Hindré F, et al. Self-Assembled Monolayers of Bisphosphonates: Influence of Side Chain Steric Hindrance. *Langmuir* 2009;25:7828–35. doi:10.1021/la8039576.
- [137] Lagrost C, Mattiuzzi A, Jabin I, Hapiot P, Reinaud O. Fonctionnalisation moléculaire des surfaces par réduction de sels d'aryldiazonium. *Techniques de l'ingénieur* 2014;18.
- [138] Vericat C, Vela ME, Benitez G, Carro P, Salvarezza RC. Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system. *Chem Soc Rev* 2010;39:1805–34. doi:10.1039/B907301A.
- [139] Kind M, Wöll C. Organic surfaces exposed by self-assembled organothiol monolayers: Preparation, characterization, and application. *Progress in Surface Science* 2009;7–8:230–78. doi:10.1016/j.progsurf.2009.06.001.
- [140] Bélanger D, Pinson J. Electrografting: a powerful method for surface modification. *Chemical Society Reviews* 2011;40:3995. doi:10.1039/c0cs00149j.
- [141] Wilbur JL, Whitesides GM. Self-Assembly and Self-Assembled Monolayers in Micro- and Nanofabrication. *Nanotechnology*, Springer, New York, NY; 1999, p. 331–69. doi:10.1007/978-1-4612-0531-9_8.
- [142] Subramanian P, Niedziolka-Jonsson J, Lesniewski A, Wang Q, Li M, Boukherroub R, et al. Preparation of reduced graphene oxide–Ni(OH)₂ composites by electrophoretic deposition: application for non-enzymatic glucose sensing. *J Mater Chem A* 2014;2:5525–33. doi:10.1039/C4TA00123K.
- [143] Chen D, Feng H, Li J. Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications. *Chemical Reviews* 2012;112:6027–53. doi:10.1021/cr300115g.
- [144] Haque A-MJ, Park H, Sung D, Jon S, Choi S-Y, Kim K. An Electrochemically Reduced Graphene Oxide-Based Electrochemical Immunosensing Platform for Ultrasensitive Antigen Detection. *Analytical Chemistry* 2012;84:1871–8. doi:10.1021/ac202562v.
- [145] Pumera M. Graphene in biosensing. *Materials Today* 2011;14:308–15. doi:10.1016/S1369-7021(11)70160-2.
- [146] Yang M, Hou Y, Kotov NA. Graphene-based multilayers: Critical evaluation of materials assembly techniques. *Nano Today* 2012;7:430–47. doi:10.1016/j.nantod.2012.08.006.
- [147] Subramanian P, Barka-Bouaifel F, Bouckaert J, Yamakawa N, Boukherroub R, Szunerits S. Graphene-Coated Surface Plasmon Resonance Interfaces for Studying the Interactions between Bacteria and Surfaces. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2014;6:5422–31. doi:10.1021/am405541z.
- [148] Zhang L, Lu Z, Zhao Q, Huang J, Shen H, Zhang Z. Enhanced Chemotherapy Efficacy by Sequential Delivery of siRNA and Anticancer Drugs Using PEI-Grafted Graphene Oxide. *Small* 2011;7:460–4. doi:10.1002/smll.201001522.
- [149] Chen B, Liu M, Zhang L, Huang J, Yao J, Zhang Z. Polyethylenimine-functionalized graphene oxide as an efficient gene delivery vector. *J Mater Chem* 2011;21:7736–41. doi:10.1039/C1JM10341E.
- [150] Zhou X, Laroche F, Lamers GEM, Torraca V, Voskamp P, Lu T, et al. Ultra-small graphene oxide functionalized with polyethylenimine (PEI) for very efficient gene delivery in cell and zebrafish embryos. *Nano Research* 2012;5:703–9. doi:10.1007/s12274-012-0254-x.
- [151] Wang Q, Vasilescu A, Wang Q, Coffinier Y, Li M, Boukherroub R, et al. Electrophoretic Approach for the Simultaneous Deposition and Functionalization of Reduced Graphene Oxide Nanosheets with Diazonium Compounds: Application for

- Lysozyme Sensing in Serum. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2017;9:12823–31. doi:10.1021/acsami.6b15955.
- [152] Belkhalifa H, Teodorescu F, Quéniat G, Coffinier Y, Dokhan N, Sam S, et al. Insulin impregnated reduced graphene oxide/Ni(OH) 2 thin films for electrochemical insulin release and glucose sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2016;237:693–701. doi:10.1016/j.snb.2016.06.132.
- [153] Maaoui H, Singh SK, Teodorescu F, Coffinier Y, Barras A, Chtourou R, et al. Copper oxide supported on three-dimensional ammonia-doped porous reduced graphene oxide prepared through electrophoretic deposition for non-enzymatic glucose sensing. *Electrochimica Acta* 2017;224:346–54. doi:10.1016/j.electacta.2016.12.078.
- [154] Subramanian P, Lesniewski A, Kaminska I, Vlandas A, Vasilescu A, Niedziolka-Jonsson J, et al. Lysozyme detection on aptamer functionalized graphene-coated SPR interfaces. *Biosensors and Bioelectronics* 2013;50:239–43. doi:10.1016/j.bios.2013.06.026.
- [155] An SJ, Zhu Y, Lee SH, Stoller MD, Emilsson T, Park S, et al. Thin Film Fabrication and Simultaneous Anodic Reduction of Deposited Graphene Oxide Platelets by Electrophoretic Deposition. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2010;1:1259–63. doi:10.1021/jz100080c.
- [156] Chavez-Valdez A, Shaffer MSP, Boccaccini AR. Applications of Graphene Electrophoretic Deposition. A Review. *The Journal of Physical Chemistry B* 2013;117:1502–15. doi:10.1021/jp3064917.
- [157] Subramanian P, Barka-Bouaifel F, Bouckaert J, Yamakawa N, Boukherroub R, Szunerits S. Graphene-coated surface plasmon resonance interfaces for studying the interactions between bacteria and surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014;6:5422–31. doi:10.1021/am405541z.
- [158] Srivastava S, Kumar V, Ali MA, Solanki PR, Srivastava A, Sumana G, et al. Electrophoretically deposited reduced graphene oxide platform for food toxin detection. *Nanoscale* 2013;5:3043–51. doi:10.1039/C3NR32242D.
- [159] Zhang H, Zhang X, Zhang D, Sun X, Lin H, Wang C, et al. One-step electrophoretic deposition of reduced graphene oxide and Ni(OH)₂ composite films for controlled syntheses supercapacitor electrodes. *J Phys Chem B* 2013;117:1616–27. doi:10.1021/jp305198j.
- [160] Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria. *ACS Nano* 2010;4:5731–6. doi:10.1021/nn101390x.
- [161] Tang L, Feng H, Cheng J, Li J. Uniform and rich-wrinkled electrophoretic deposited graphene film: a robust electrochemical platform for TNT sensing. *Chem Commun* 2010;46:5882–4. doi:10.1039/C0CC01212B.

2 BIODÉTECTION ÉLECTROCHIMIQUE DES BACTÉRIES

2.1 Biodétection des bactéries par rGO/PEI

La détection rapide, fiable et sélective des micro-organismes est très importante dans l'analyse clinique ainsi que dans la surveillance de la qualité des aliments et de l'eau. Dans cette étude, nous abordons la stratégie de la construction d'un immunocapteur pour des applications électrochimiques sensibles et sélectives pour la détection des bactéries uropathogènes *Escherichia Coli* (*E. Coli*) UTI89 dans des échantillons de sérum. Nous avons exploité le procédé du dépôt électrophorétique (EPD) pour préparer, dans une manière simple, contrôlable et rentable, des électrodes d'or modifiées avec des couches mince active d'oxyde de graphène réduit / polyéthylèneimine (rGO/PEI). Comme le rGO présente une grande surface et des propriétés électrochimiques favorables, la présence des groupes de NH_2 dans le PEI offrent une multitude de possibilités pour la fonctionnalisation de la surface du capteur. Pour atteindre la sélectivité de détection, la surface de l'électrode était modifiée de manière covalente par des anticorps anti-fimbriae d'*E. Coli* via la formation d'une liaison amide. Pour minimiser l'adsorption non spécifique, l'immunocapteur a été modifié avec des fractions pyrène-polyéthylèneglycol (pyrène-PEG) avant l'immobilisation de l'anticorps.

La détection d'*E. Coli* reposait sur la restriction du transfert d'électrons du milieu redox, dans notre cas le ferrocyanure de potassium, vers le transducteur électrique modifié par rGO/PEI en raison de la formation d'un complexe immunitaire. L'immunocapteur développé a montré une réponse sigmoïdale avec une gamme linéaire de 1×10^1 - 1×10^4 cfu mL^{-1} ($R^2 = 0,995$) pour i (μA) = $-16,66 - 20,5 \times \log [\text{E. Coli}]$ (cfu mL^{-1}) et une limite de détection de 10 cfu mL^{-1} . De plus, le capteur s'est bien comporté à la fois dans l'eau, le sérum et les milieux d'urine. Cela est essentiel quant à son utilisation potentielle pour le diagnostic clinique des

maladies pathogènes. Les études de sélectivité ont montré que l'immunocapteur était capable de différencier entre E. Coli UTI89 souche sauvage et UTI89 *Δfim*, sans opéron.

2.1.1 Introduction

Dans un travail récent, une étude a révélé que E. Coli UTI89 est une bactérie uropathogène qui interagit fortement avec la surface modifiée de graphène / polyéthylèneimine (PEI) par des interactions électrostatiques [1].

Étant donné que ces interactions ne sont pas spécifiques, dans cette étude nous proposons une nouvelle stratégie pour la détection rapide et spécifique de E. Coli uropathogène UTI89 en solution aqueuse et sérique par une lecture électrochimique. La détection sensible et sélective de E. Coli UTI89 est obtenue par fonctionnalisation chimique des groupes $-NH_2$ du PEI des électrodes d'oxyde de graphène réduit (rGO). Ce dernier est modifié avec des anticorps anti-fimbrial E. Coli avec des unités de pyrène modifiées par le polyéthylène glycol (PEG) afin d'inhiber l'adsorption non-spécifique des bactéries E. Coli sur la surface du capteur. Le changement du pic du courant du couple redox de ferrocyanure de potassium on utilisant la voltammétrie différentielle à impulsions (DPV) a été utilisé pour l'analyse quantitative des solutions contaminées par E. Coli UTI89. Cela dépend du fait que la formation d'un immunocomplexe entre d'anticorps E. Coli anti-fimbrial et E. Coli UTI89 induise une restriction du transfert d'électrons du potassium ferrocyanure au transducteur électrique, qui évolue linéairement avec la concentration de l'E. Coli UTI89. La puce pathogène conçue peut détecter spécifiquement E. Coli UTI89 à 10 ufc mL^{-1} d'une manière très spécifique même dans l'échantillon de sang et d'urine.

2.1.2 Produits chimiques

La polyéthylèneimine branchée (PEI, $M_w \sim 25,000$), le carbodiimide hydrosoluble monohydrochloride 1-ethyl-3[3-diméthylaminopropyl] (EDC.HCl), l'ester N-hydroxysuccinimide (NHS), le tampon phosphate salin (PBS, 10 mM, pH 7.4), le de potassium ($[K_4Fe(CN)_6]$), le chlorure d'hexaammineruthénium(III) ($[Ru(NH_3)_6]Cl_3$), l'acide 1-pyrenecarboxylique (97%, Pyr-COOH), le carbonate de N,N'-disuccinimidyle ($\geq 95.0\%$, DSC), le solvant dichlorométhane (CH_2Cl_2), la triéthylamine ($\geq 99.5\%$, TEA), l'oxyde d'éthylène O-(2-aminoéthyl)-O'-(2-méthyléthyl) heptaéthylène glycol ($\geq 90\%$, $NH_2-PEG_8-N_3$) sont obtenus chez Sigma-Aldrich (France). L'oxyde de graphène (GO) en poudre provient de Graphenea, Espagne. Les échantillons de Sérum et urine sont fournis par le Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

2.1.3 Synthèse de N-(26-azide-3,6,9,12,15,18,21,24-

octaoxahehexacosyl)pyrene-1-carboxamide (Pyrene-PEG)

Brièvement, l'acide 1-pyrenecarboxylique (100 mg, 0.41 mmol) et le DSC (125 mg, 0.49 mmol) sont dissous dans anhydre CH_2Cl_2 (15 mL). A cette solution, TEA (68 μL , 0.49 mmol) et $\text{H}_2\text{N-PEG}_8\text{-N}_3$ (214 mg, 0.49 mmol) dissout dans CH_2Cl_2 (2 mL) sont ajoutés doucement sous agitation. La mixture obtenue est gardée sous agitation toute la nuit à température ambiante. Ensuite le solvant est évaporé sous pression. Le produit brut est dissout dans CH_2Cl_2 (6 mL), lavé avec 5% HCl solution aqueuse (5 mL, deux fois) et H_2O (5 mL, deux fois), et séché sous MgSO_4 . Le résidu est purifié par le gel de silica de chromatographie sur colonne en utilisant deux fois CH_2Cl_2 et le produit est isolé sous la forme d'une huile jaune pâle visqueuse ; rendement = 135 mg, (50 %).

2.1.4 Formation d'anti-fimbrial E. Coli modifié avec pyrene-PEG

recouvert de GO/PEI d'électrodes modifiée (PEG/rGO/PEI-anti-fimbrial)

2.1.4.1 Dépôt électrophorétique rGO/PEI sur l'électrode d'or

Nous avons utilisé les mêmes paramètres de dépôt électrophorétique d'oxyde de graphène/ polyéthylèneimine (GO/PEI) cité précédemment dans le chapitre de la détection de la dopamine), sauf que le dépôt électrophorétique (EPD) a été réalisé sur des substrats en verre revêtus d'or ($76 \times 26 \times 1 \text{ mm}^3$, CML France).

2.1.4.2 Fonctionnalisation de l'interface rGO/PEI avec le pyrène-PEG (PEG/rGO/PEI)

L'interface Au/rGO/PEI a été immergée dans une solution aqueuse de 5 mM de pyrène-PEG à température ambiante pendant 1 h. La surface résultante était largement rincée avec de l'eau Milli-Q et séché à l'azote.

2.1.4.3 L'immobilisation covalente d'anticorps anti-fimbriae d'E. Coli sur l'Électrode PEG / rGO / PEI (PEG/rGO/PEI-anti-fimbrial)

La liaison covalente d'anticorps anti-fimbriae du lapin sur rGO/PEI fonctionnalisé avec pyrène-PEG a été obtenu par couplage chimique des groupes -NH_2 de PEI avec les fonctions -COOH des anticorps anti-fimbriae E. Coli en utilisant EDC/NHS comme agents de réticulation. Brièvement, l'interface de l'or recouvert de PEG / rGO / PEI a été incubée dans une solution aqueuse de solution d'anticorps anti-fimbriae E. Coli (10 ng mL^{-1}), EDC·HCl (25 mM) et NHS (25 mM) à 4°C pendant 2 h sous agitation. La surface obtenue est lavée soigneusement avec du PBS pour éliminer les anticorps en excès et les réactifs n'ayant pas réagi. La surface fonctionnalisée a ensuite été stockée dans du tampon PBS à 4°C avant utilisation.

2.1.5 Caractérisation

2.1.5.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images MEB ont été obtenues à l'aide d'un microscope électronique ULTRA 55 (Zeiss, France) équipé d'un émetteur d'émission de champ thermique et de trois détecteurs différents (détecteur EsB avec grille filtrante, détecteur In-lens SE haute efficacité et détecteur électronique Secondaire Everhart-Thornley).

Les images MEB des bactéries ont été enregistrées en utilisant un instrument Zeiss Compat Merlin à 2 kV sous un vide poussé. Les échantillons biologiques ont été fixés avec 1% de solution glutaraldéhyde pendant 30 min à température ambiante dans l'obscurité, puis recouvert d'une épaisseur de 5 nm film de platine.

2.1.5.2 Mesures du potentiel zêta

Les mesures du potentiel zêta ont été effectuées en utilisant un Zeta-sizer Nano-ZS (Malvern Instruments Inc. Worcestershire, Royaume-Uni). Les échantillons ont été dilués à $25 \text{ }\mu\text{g/mL}$ et mesurés dans de l'eau Milli-Q à pH 7,0.

2.1.5.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La transmission des spectres FTIR de GO, rGO et PEI ont été enregistrés en utilisant un spectromètre FTIR PerkinElmer Spectrum One. Les échantillons (1 mg) ont été mélangés

avec de la poudre de KBr (100 mg) dans un mortier d'agate. Le mélange a été pressé en une pastille sous une charge de 10 t pendant 2-4 min, et le spectre a été enregistré immédiatement. Concernant le rGO / PEI déposé par électrophorèse sur l'électrode d'or, le spectromètre a été équipé d'un accessoire de réflectance spéculaire à angle variable VeeMax II de Pike Technologies. Chaque spectre a été recueilli en accumulant 34 balayages avec une résolution de 4 cm^{-1} dans la gamme de 4000 à 650 cm^{-1} . Le signal provenant de la pastille de KBr ou d'or a été soustrait en tant qu'arrière-plan. Le logiciel Omnic 10 a été utilisé pour les mesures et pour la correction de la ligne de base.

2.1.5.4 Spectroscopie Raman

Les mesures de spectroscopie micro-Raman ont été effectuées sur Système LAbRam HR Micro-Raman (Horiba Jobin Yvon, France) combiné avec une diode laser de 473 nm comme source d'excitation. La lumière visible était concentrée par un objectif de 100×. La lumière diffusée a été recueillie par le même objectif en configuration de rétrodiffusion, dispersé par un Monochromateur de longueur focale de 1800 mm et détecté par un CCD

2.1.5.5 Profilométrie optique

Un profilomètre optique (Proximomètre optique Zygo NewView 6000 avec le logiciel MetroPro) avec une résolution de hauteur de 1 nm a été utilisé pour les mesures d'épaisseur.

2.1.5.6 Mesures électrochimiques

Les propriétés électrochimiques des électrodes développées ont été évaluées par voltammétrie (CV) et voltampérométrie impulsionnelle différentielle (DPV) en utilisant un Autolab potentiostat 30 (Eco-Chemie, Utrech, Pays-Bas). Un système conventionnel à trois électrodes constituées d'une électrode de travail (Au film), d'une électrode de référence (fil d'argent), et une contre-électrode (maille de platine) a été utilisé. Les conditions suivantes optimisées (temps de modulation: 0,05 s, intervalle: 0,5 s, potentiel de pas: 5 mV; amplitude de modulation: 50 mV) ont été utilisés pour enregistrer la voltampérométrie impulsionnelle différentielle.

2.1.6 Culture bactérienne et détection à base d'anticorps E. Coli anti-fimbriae sur interface modifiés PEG / rGO / PEI

Trois souches bactériennes sont utilisées dans cette étude, dont E. Coli UTI89 (souche de type sauvage), E. Coli UTI89 Δfim (sans opéron fim) et S. aureus. Une seule colonie E. Coli ou S. aureus de la plaque d'agar LB / BHI (milieu de culture) complétée par les antibiotiques appropriés était inoculée pendant une nuit dans le milieu LB/BHI à 37 °C sous agitation modérée. La préculture a été diluée 50 fois et maintenue sous agitation modérée pendant encore 3-4 h, jusqu'à ce que le OD_{600nm} (densité optique) avait atteint 0,6 - 1. Les bactéries ont été remises en suspension dans de l'eau stérile Milli-Q et ajustée à la concentration requise ($1 \times 10^1 - 1 \times 10^8$ ufc mL⁻¹).

Une série de concentrations de cellules bactériennes allant de 1×10^1 à 1×10^8 ufc mL⁻¹ dans 100 µL de volume ont été incubées sur des anticorps anti-fimbriae E. Coli des électrodes fonctionnalisées PEG/rGO/PEI pendant 30 min pour obtenir l'immobilisation des cellules bactériennes. Après incubation, l'électrode fonctionnalisée a été soigneusement rincée avec de l'eau Milli-Q pour enlever les cellules planctoniques en excès et ensuite les conserver dans du tampon PBS ou dans un milieu de croissance à 4°C pour une analyse plus approfondie. Enfin, la réponse électrochimique dans la solution redox 10 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} dans 0,1 M KCl a été enregistrée en utilisant DPV.

2.1.7 Résultats et discussion

2.1.7.1 Fonctionnalisation par rGO/PEI

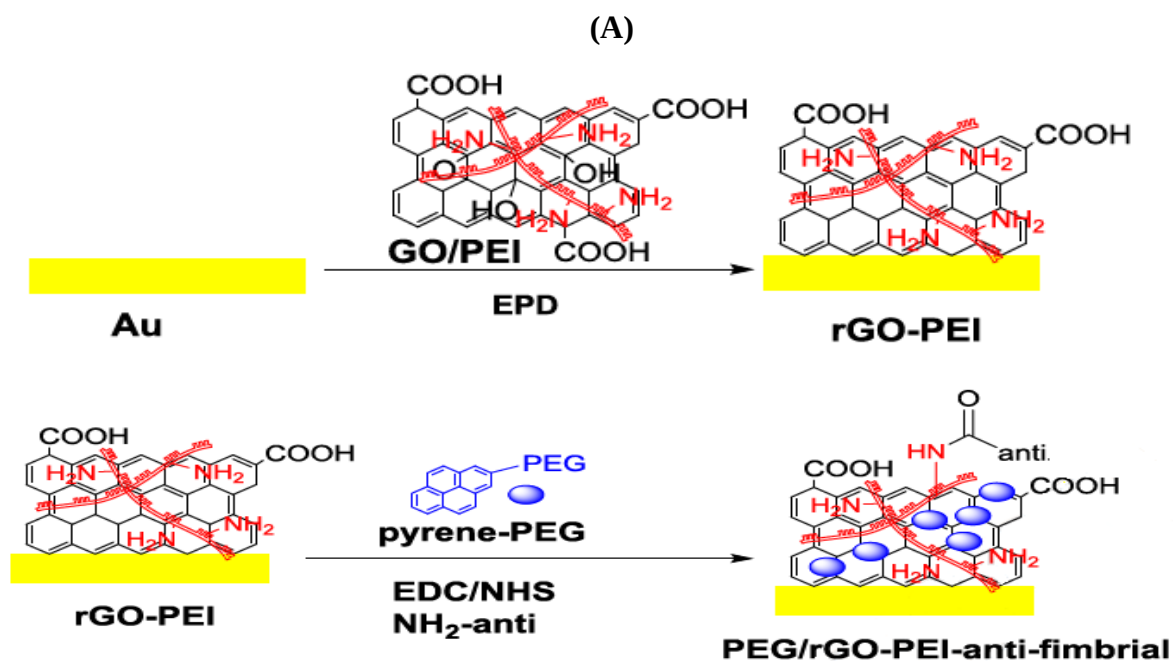
La Figure 21A présente la stratégie utilisée pour la préparation des électrodes destinées à la détection spécifique de E. Coli UTI89 par des moyens électrochimiques. La stratégie se base sur la fonctionnalisation d'une électrode en or (Au) par dépôt électrophorétique de rGO / PEI, suivi d'une modification non covalente avec le pyrène-PEG (voir la synthèse du pyrène-PEG). Par la suite procédé au greffage d'anticorps anti-fimbriae E. Coli UTI89 aux groupes amine de PEI par une liaison covalente.

Nous avons opté pour le concept de dépôt électrophorétique (EPD), comme EPD anodique de rGO en utilisant GO comme matière de départ. En outre, EPD est bien adapté pour la fonctionnalisation de différentes surfaces d'électrode pour concevoir des plates-formes de détection [2]. Les solutions aqueuses GO présentent un potentiel zêta négatif ($\zeta = -41,3 \pm 0,8$ mV), ce qui engendre la migration des feuillets d'oxyde de graphène (GO) vers l'anode

par l'application d'une tension continue (DC) [3]. Pour une réduction plus complète de GO à rGO, un dépôt cathodique EPD et une matrice avec un potentiel zêta positif est nécessaire. Cela peut être obtenu en chargeant GO avec un polymère cationique avec des groupes aminés répétés tels que polyéthylèneimine (PEI). Un mélange 1/1 de GO et de PEI donne des nanofeuillets GO/PEI avec $\zeta = +36,4 \pm 1,3$ mV, étant bien adapté à l'EPD cathodique.

La Figure 21B montre la morphologie d'une électrode d'or avant et après revêtement électrophorétique avec rGO/PEI. Lors de l'application de +15 V_{DC} pendant 4 min, l'électrode en or est revêtue d'un film homogène de nanofeuillets rGO/PEI d'environ 4 nm d'épaisseur déterminé par des mesures de profilométrie.

La Figure 21C montre les voltammogrammes d'impulsion différentielle du film mince d'électrode d'or, avant et après revêtement avec rGO/PEI par dépôt électrophorétique en utilisant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ comme sonde redox. Par rapport à l'électrode d'or nue, la fonctionnalisation avec un film mince de rGO/PEI a entraîné une augmentation significative du courant redox.



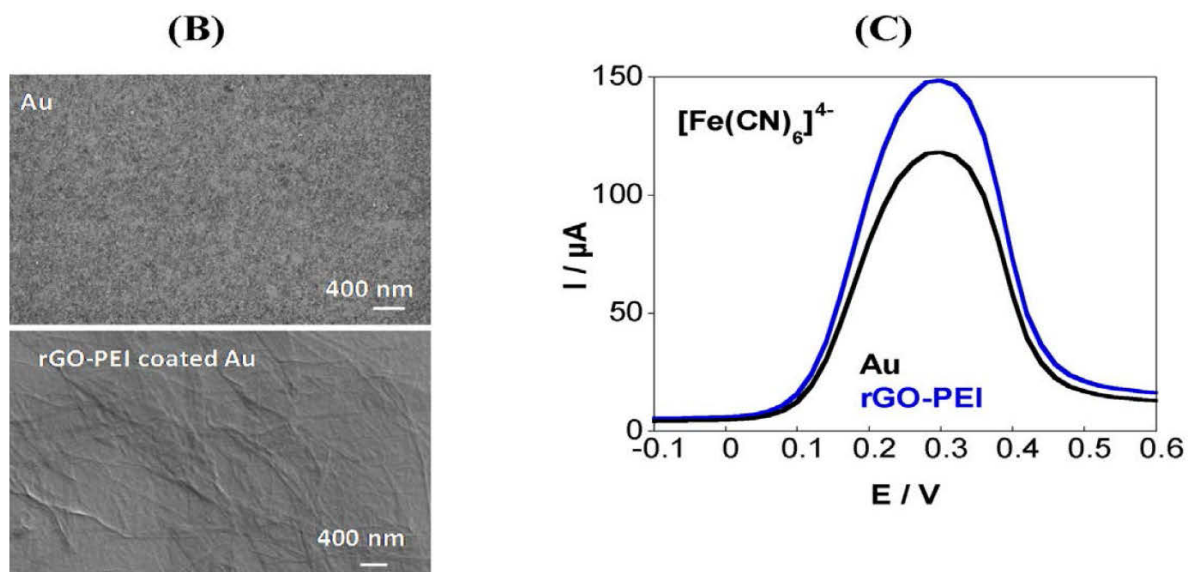


Figure 21 : (A) différentes étapes utilisées pour la construction de l'immunocapteur pour la détection électrochimique sélective de E. Coli UTI89; (B) des micrographies d'électrodes par microscope électronique à balayage (SEM) avant et après le revêtement électrophorétique avec nanofeuillets de rGO/PEI lors de l'application de 15 V_{DC} pendant 4 min; (C) Voltammogrammes d'impulsions différentielles d'or (noir) et d'or recouvertes de rGO/PEI (bleu) enregistrées dans $[Fe(CN)_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M).

Le courant amplifié de l'électrode d'or modifiée avec le film mince rGO/PEI est corrélé avec les propriétés électroniques de rGO/PEI. En effet, ce dernier augmente la surface d'interface et favorise l'interaction électrostatique entre la solution redox chargée négativement et l'interface rGO/PEI chargée positivement. L'utilisation d'une solution redox chargée positivement conduit à une petite augmentation du courant redox de l'interface rGO/PEI par rapport à l'électrode d'or nu (Figure 22).

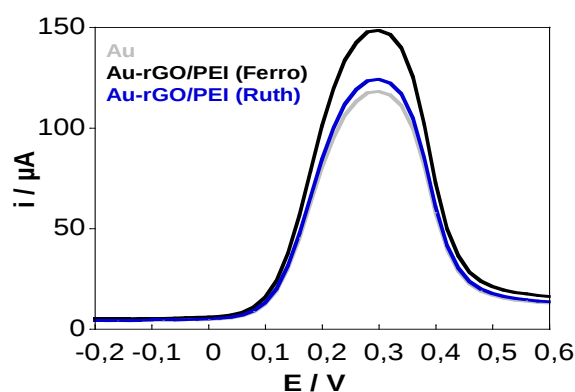


Figure 22 : voltammogrammes d'impulsions différentielles Au (gris) et Au-rGO/PEI dans $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (5 mM)/PBS (0,1 M) (noir), dans $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+}$ (5 mM) / PBS (0,1 M) (bleu)

Afin de déterminer si les électrodes d'or recouvertes de rGO/PEI sont adaptables à la détection des bactéries, les interfaces ont d'abord été immergées dans des solutions de *E. Coli*. La Figure 23A montre le changement du courant redox de l'interface d'or revêtue rGO/PEI dans le $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ comme sonde redox lors de l'incubation pendant 30 min dans une solution de *E. Coli* UTI89 à différentes concentrations. Après une augmentation insignifiante du pic du courant de la solution *E. Coli* d'une concentration de 10^2 ufc mL^{-1} , une diminution faible mais régulière du courant redox est observée lors de l'augmentation de la concentration de *E. Coli*. Les interfaces se sont avérées cependant peu spécifiques à *E. Coli* UTI89, en particulier à de faibles concentrations, où un changement de signature électrochimique observé lors de l'incubation avec *E. Coli* UTI89 ΔFim , (Figure 23B). SEM images d'une interface d'or revêtue de rGO/PEI incubée avec *E. Coli* UTI89 pendant 30 min confirme l'adsorption d'*E. Coli* UTI89 sur l'interface (Figure 23C).

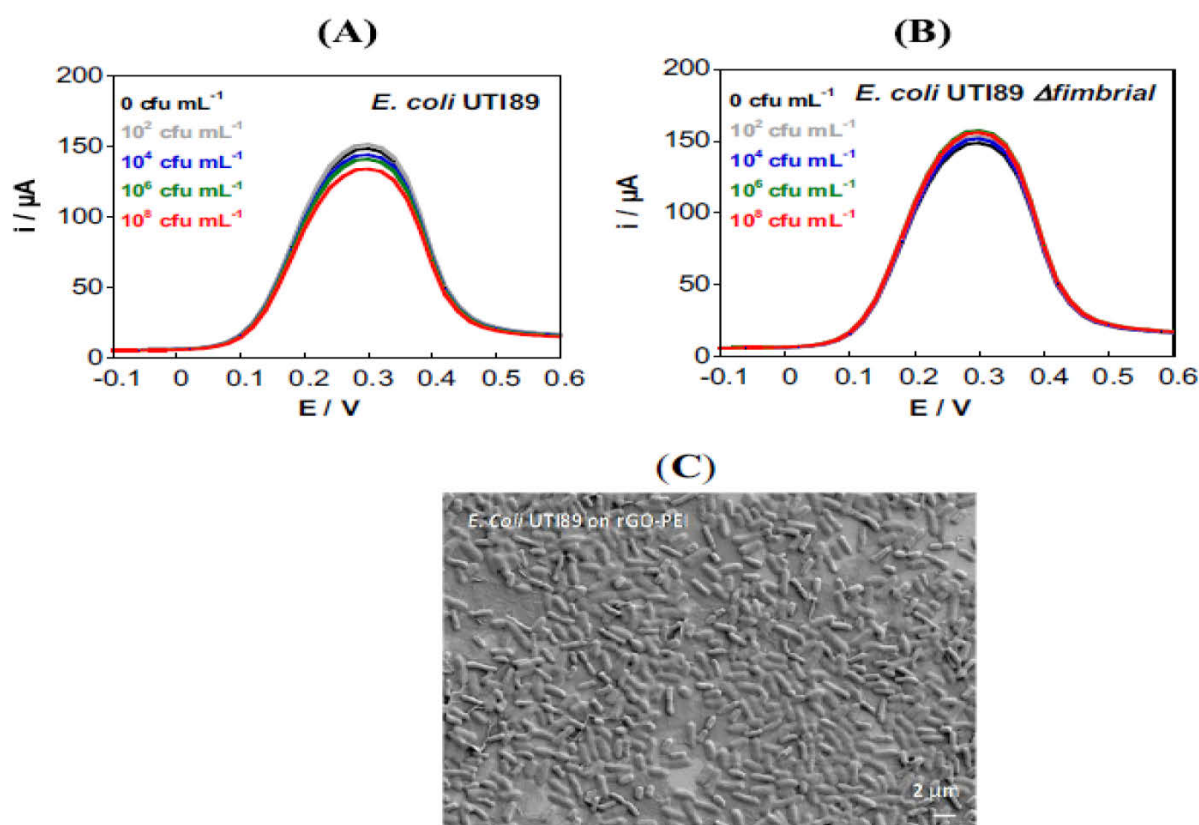


Figure 23 : voltampérogrammes d'impulsions différentielles enregistrées en $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M) sur des électrodes d'or revêtues de rGO / PEI avant (en noir) et après 30 min d'incubation avec *E. Coli* UTI89 (A) et *E. Coli* UTI89 $\Delta fimbrial$ (B) solutions de différentes concentrations; (C) Image au MEB d'une électrode d'or revêtue de rGO/PEI incubée avec *E. Coli* UTI89 (10^8 ufc mL^{-1}) pendant 30 minutes

2.1.7.2 Fonctionnalisation avec anticorps anti-encrassement anti-fimbrial sur l'électrode Au E. Coli-rGO/PEI

La détection sélective des bactéries a été réalisée par fonctionnalisation covalente de l'interface Au/rGO /PEI avec des anticorps contre la protéine majeure piline FimA d'E. Coli UTI89 - du type-1fimbriae, en utilisant la chimie classique de couplage EDC/NHS (Figure 24). En effet, les études de résonance plasmonique de surface (SPR) montrent des interactions spécifiques et dépendantes de la concentration des anticorps polyclonaux IgG avec des fimbriae purifiées de type-1 immobilisées sur une puce de capteur, en utilisant la procédure standard EDC/NHS.

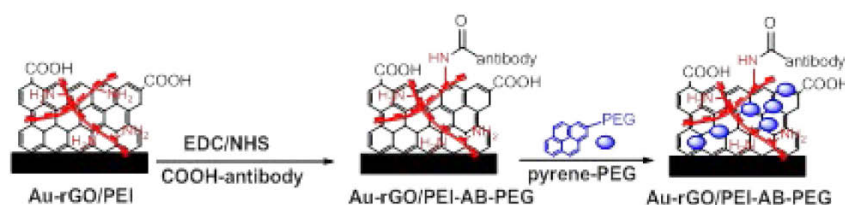


Figure 24 : différentes étapes de fonctionnalisation de l'électrode d'or par rGO/PEI/AB/pyrène -PEG

Le meilleur ajustement pourrait être obtenu en utilisant un modèle de liaison de Langmuir 1:1, avec une valeur K_d globale de $6 \pm 4 \mu\text{M}$. La même stratégie de fonctionnalisation de surface a été employée pour l'interface de détection électrochimique utilisant la chimie de couplage EDC/NHS, aboutissant à une formation d'une liaison amide entre les fonctions NH_2 libres présentes sur la matrice rGO/PEI et les groupes COOH disponibles de l'anticorps (Figure 24). Pour minimiser les problèmes (antifouling) d'anti-encrassement, avant l'immobilisation de l'anticorps, l'électrode en Au revêtue de rGO/PEI a été immergée dans du PEG-pyrène pour bloquer les sites rGO libres. En fait, cela s'est avéré plus efficace que la post-fonctionnalisation des interfaces rGO/PEI modifiées avec le pyrène-PEG; C'est très probable en raison de la restriction des interactions aromatique (ou π - π stacking) et des liaisons H des fragments pyrène avec rGO par les anticorps anti-fimbriae immobilisés sur la surface de rGO/PEI.

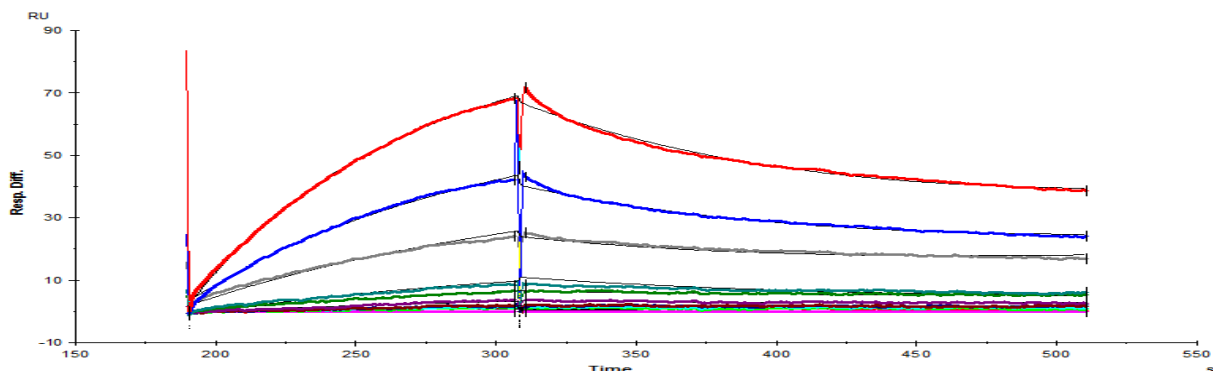


Figure 25 : sensogrammes SPR après interaction d'anticorps polyclonaux IgG purifiés à partir de sérum de rat, pour des concentrations allant de 6 μM (ligne rouge) à 3 nM (ligne rose), dissous dans du tampon courant (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM et 0,005 % P20, mesurée à 30 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$, enregistrée sur une puce de capteur CM5 modifiée par covalence avec des fibres de type 1 de la souche E. Coli (AIEC) LF82 adhérente-adhérente en utilisant la procédure standard EDC / NHS.

2.1.7.3 Détection électrochimique

La réponse électrochimique de l'interface anticorps anti-fimbriae E. Coli modifié a été bien étudiée. Alors que le pyrène-PEG n'influence pas transfert d'électron, sa présence montre d'excellentes propriétés anti-encrassement (Figure 26A). La liaison de l'anticorps dirigé contre la piline majeure FimA de E. Coli UTI89 type-1 fimbriae à l'interface donne un blocage partiel du transfert d'électrons de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ vu dans la diminution du courant redox (Figure 26B).

L'imagerie au MEB de rGO / PEI modifié au pyrène-PEG après immersion dans E. Coli UTI89 à une concentration élevée de 1×10^8 ufc mL^{-1} pendant 2 h indique clairement l'absence des pathogènes en surface et les bonnes propriétés anti-encrassement d'électrodes modifié du pyrène-PEG (Figure 26C). Cette image contraste avec celle obtenue quand anti-fimbrial était immobilisé sur la surface (Figure 26D).

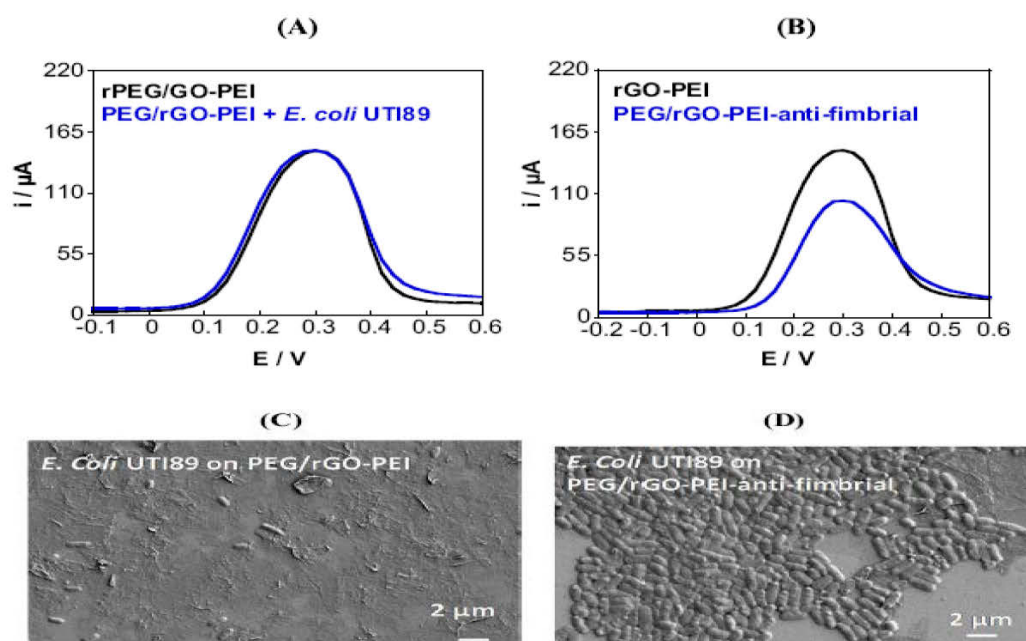


Figure 26 : (A) DPVs d'électrodes Au modifié PEG / rGO / PEI avant et après incubation pendant 2 h dans une solution de *E. Coli* UTI89 (10^8 ufc mL^{-1}) contenant $[Fe(CN)_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M); (B) DPV de PEG / rGO / PEI anti-fimbrial modifié Au électrodes avant et après incubation pendant 2 h dans une solution de *E. Coli* UTI89 (10^8 ufc mL^{-1}) contenant $[Fe(CN)_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M); Images SEM de PEG / rGO / PEI ; (C) et PEG / rGO / PEI-anti-fimbrial (D) a modifié les électrodes d'or après 2 h d'incubation avec *E. Coli* UTI89 wt 10^8 ufc mL^{-1} .

La sensibilité de l'électrode PEG/rGO/PEG-anti-fimbriale vis-à-vis de la détection sélective d'*E. Coli* UTI89 en solution aqueuse a été testée dans une large gamme de concentrations de bactéries. La Figure 29A représente le changement du pic du courant DPV de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ sonde redox lors de l'incubation de l'électrode pendant 30 min avec *E. Coli* UTI89.

En l'absence de bactérie (contrôle), la valeur du courant était de $144 \pm 3 \mu A$ (I_0). Une fois les bactéries UTI89 (100 ufc mL^{-1}) ajoutées, la réponse électrochimique du système était modifiée en raison de la restriction de transfert d'électrons de $[Fe(CN)_6]^{4-}$ à l'interface électrique. Le courant a diminué à $120 \pm 3 \mu A$ (I_c) et même plus avec une augmentation de concentration de cellules UTI89 en solution. Pour démontrer la performance du capteur à transduire la réaction de biorecognition entre l'anticorps et le FimA pathogène en signal mesurable, le changement de courant en fonction de la concentration du pathogène a été tracé. La Figure 29B présente la courbe d'étalonnage, où le changement du pic du courant

I_0-I_c vs log [E. Coli UTI89] est tracée, avec I_0 étant le courant initial en l'absence de pathogènes, une gamme linéaire de 1×10^1 - 1×10^4 ufc mL^{-1} ($R^2 = 0,995$) selon $i(\mu\text{A}) = -16,66 - 20,5 \times \log [\text{E. Coli}]$ (ufc mL^{-1}) est obtenu. Le système affiche une limite de détection pour UTI89 inférieure à 10 ufc mL^{-1} à partir de cinq signaux blancs.

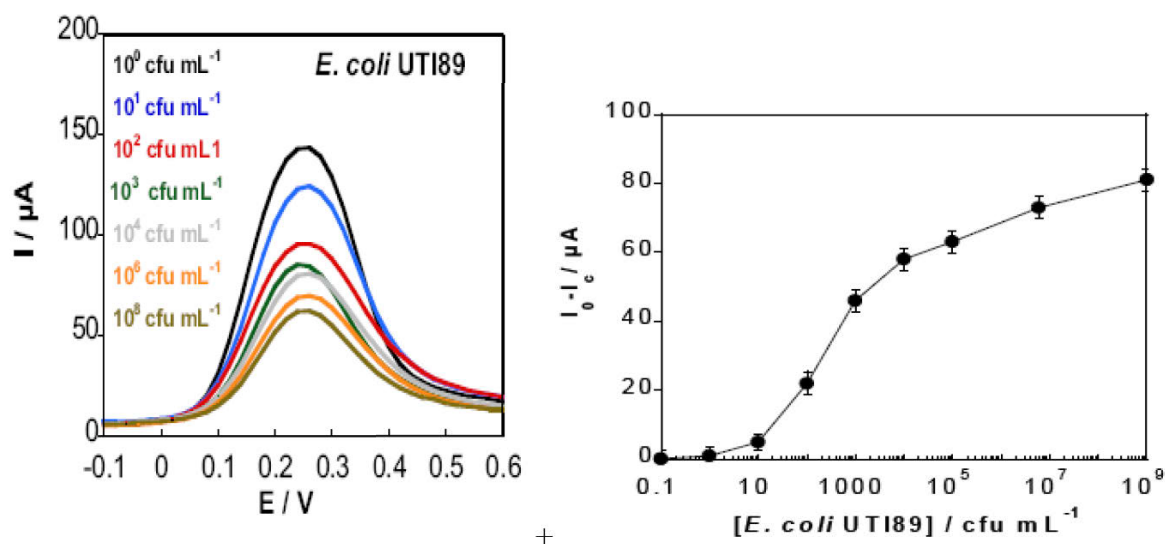


Figure 27: changement du courant oxydatif des DPV dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M) après une incubation de 30 min dans des solutions aqueuses de *E. Coli* UTI89 de différentes concentrations (10^1 - 10^8 ufc / mL^{-1}) en utilisant les électrodes Au modifiées PEG/rGO-PEI-anti-fimbrial; (B) Courbe d'étalonnage respective pour les solutions *E. Coli* UTI89.

Le Tableau 11 compare les performances électroanalytiques de notre capteur à celles d'autres plates-formes de détection électriques ou électrochimiques d'agents pathogènes. La performance du capteur développé est comparable ou légèrement inférieure à ceux décrits dans la littérature. Cependant, la plage linéaire enregistrée pour notre capteur est assez grande par rapport à celle rapportée par d'autres systèmes avec l'avantage du présent capteur d'être facile à mettre en œuvre et polyvalent.

En fait, la PEI contient beaucoup de groupes $-\text{NH}_2$ qui peuvent être facilement couplés à divers groupes fonctionnels pour des différentes conceptions plates-formes de détection. De plus, la méthode de dépôt électrophorétique utilisée pour le schéma de fonctionnalisation est un procédé assez rapide et à faible coût employé pour un large éventail de procédés industriels.

Tableau 9 : Exemples choisis d'immunocapteurs de E. Coli rapportés dans la littérature.

Méthode	Interface	Pathogène	LOD ufc mL ⁻¹	Gamme Linéaire	Réf.
EIS	EC _{AB} /rGO-CysCu/Au electrode	E.coli O157:H7	3.8	10–10 ⁸	[4]
EIS	Anti-E. Coli antibodies/SAM/Au electrode	E. Coli	10	10–10 ³	[5]
EIS	Anti-E. Coli antibodies/IDA microelectrode	E.coli O157:H7	10 ⁶	$4.36 \times 10^5 - 4.36 \times 10^8$	[6]
EIS	Anti-E. Coli antibodies/SAM/Au electrode	E. Coli	10 ³	$3 \times 10^3 - 3 \times 10^7$	[7]
EIS	Anti-E. Coli antibodies/Glu/PANI/Au electrode	E.coli O157:H7	10 ²	10 ² –10 ⁷	[8]
EIS	thiolated antibodies/Au SPEs	E. Coli	3.3	5–10 ⁸	[9]
Amperométrie	Anti-E. Coli antibodies/Au NPs/FeDC modified SPCEs	E.coli O157:H7	600	10 ² –10 ⁷	[10]
Capacitance	Graphène + pyrene-maleimide + anti-E. Coli antibodies	E.coli O157:H7	10–100	10–10 ⁷	[11]
GFET	CVD graphène + anti-E. Coli antibodies	E. Coli	10	10–10 ⁴	[12]
GFET	rGO + anti-E. Coli antibodies	E. Coli O157:H7	10	10–10 ³	[13]
GFET	holey reduced graphène oxide functionalized + antimicrobial peptide	E. Coli	803	–	[14]
Potentiométrie	rGO + aptamer	S. aureus	1	10–10 ³	[15]
DPV	rGO-PEI + anti-fimbrial antibody	E. Coli UTI89	10	10 ¹ –10 ⁴	Ce travail

Il est bien connu que la quantité d'anticorps liée à la surface peut avoir des conséquences sur les performances du capteur. La quantité d'anticorps greffés sur l'interface PEG/rGO/PEI s'est avérée très importante pour la performance de détection. La Figure 28A représente sous la forme d'un diagramme à barres le courant oxydatif enregistré lors de l'incubation avec E. Coli UTI89 lorsque différentes concentrations d'anticorps anti-fimbriale E. Coli ont été immobilisés sur la surface du capteur. Une interface modifiée avec 10 ng mL⁻¹ anti-fimbriale anticorps donne en effet une détection optimale de courant d'E. Coli UTI89 avec la plus grande baisse de courant.

La spécificité de cette architecture d'électrode pour la détection de FimA portant E. Coli UTI89 sur $\Delta fimA$ E. Coli spécifique est mise en évidence sur la Figure 28B, montrant un changement beaucoup plus bas de la réponse actuelle par rapport à celle d'E. Coli UTI89 (Figure 28A).

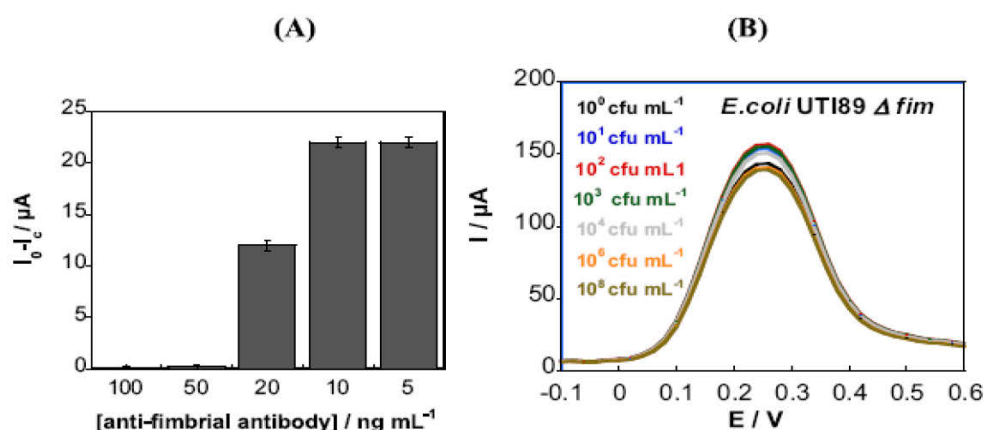


Figure 28 : (A) influence de la concentration d'anticorps anti-fimbriae sur la réponse du courant d'électrodes modifiées au PEG/rGO/PEI-anti-fimbrial dans $[Fe(CN)_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M); Le courant a été enregistré lors de l'incubation avec 100 ufc mL^{-1} . (B) DPV des électrodes modifiées au PEG/rGO/PEI-anti-fimbrial mesurées en $[Fe(CN)_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M) avant et après l'incubation pendant 30 min dans des solutions aqueuses de *E. Coli* UTI89 Δfim (10^1 - 10^8 ufc mL^{-1}).

La reproductibilité des électrodes d'or modifiées anti-fimbriae PEG /rGO /PEI-anti-pour pour la détection d'*E. Coli* UTI89, exprimée en termes de l'écart type relatif, était déterminée à 2,3% pour une concentration de bactéries *E. Coli* UTI89 de 10^4 ufc mL^{-1} pour cinq essais ($n = 5$). La stabilité à long terme de l'électrode anti-fimbriae PEG/rGO/PEI lors du stockage dans le PBS à 4°C pendant deux semaines a également été évaluée. Une perte de 2,8% du pic du courant était observée à la concentration de bactéries *E. Coli* UTI89 de 10^4 ufc mL^{-1} .

2.1.8 Mesures dans des échantillons réels

La fiabilité et l'application potentielle du capteur développé pour la détection de bactéries dans des échantillons réels ont été examinées. Le taux d'infection à *E. Coli* dans les échantillons d'urine et de sérum humain ensemencés avec *E. Coli* UTI à différentes concentrations ont été déterminées et la réponse du courant a été comparée à celle obtenue dans du PBS.

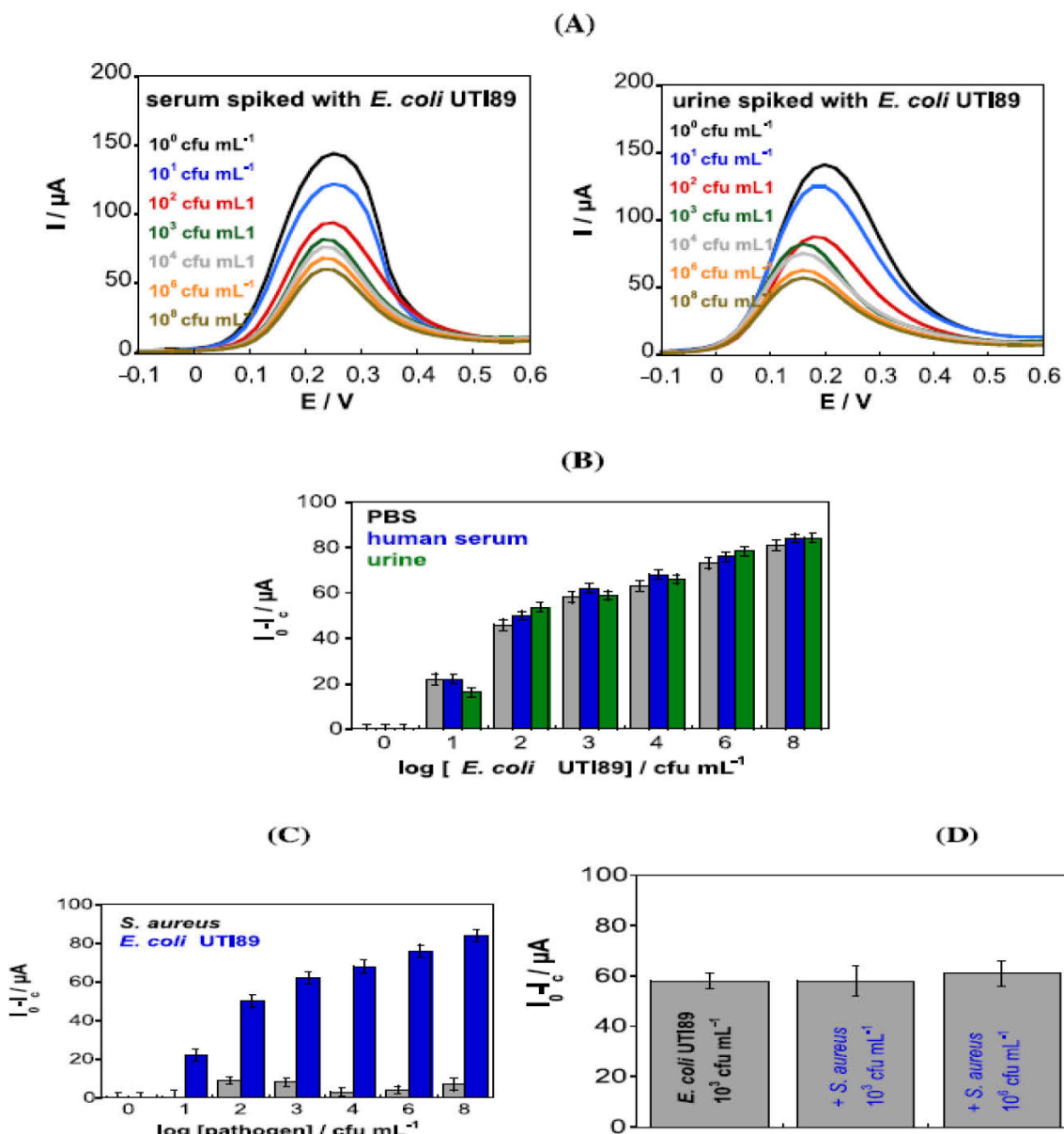


Figure 29 : DPV des électrodes d'or modifiées anti-fimbrial PEG / rGO / PEI enregistrées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) avant et après incubation pendant 30 min dans du sérum humain et des échantillons d'urine enrichis avec différentes concentrations de *E. Coli* UTI89 (10^1 - 10^8 ufc mL^{-1}); (B) Comparaison entre la signature électrochimique de *E. Coli* UTI89 dans PBS (gris), dans le sérum humain (bleu) et dans l'urine (vert); (C) enregistrement du courant oxydatif dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) dans du sérum humain additionné de différentes concentrations de *S. aureus* (10^1 - 10^8 ufc mL^{-1}); (D) Comparaison entre la signature électrochimique du sérum humain enrichi de 10^3 ufc mL^{-1} *E. Coli* UTI89 et en présence de *S. aureus* à 10^3 et 10^6 ufc mL^{-1} .

La Figure 29A représente le signal électrochimique obtenu à partir de sérum et d'urine dopés, montrant la même tendance que dans le PBS, c'est-à-dire une diminution du courant avec l'augmentation de la concentration de *E. Coli* UTI89. La Figure 29B compare la réponse du courant pour *E. Coli* UTI89 détectées sur des électrodes d'or modifiées PEG/rGO/PEI-anti-fimbriae dans du PBS ou du sérum et de l'urine humains dopés.

Les différences dans les concentrations d'*E. Coli* UTI89 détectées sont dans l'erreur de la technique d'analyse, indiquant la possibilité d'analyser des échantillons réels avec le capteur développé.

La détection spécifique d'*E. Coli* pathogène dans les milieux complexes reste un défi pour étudier si l'électrode développée est bien adaptée à la détection d'*E. Coli* UTI89 dans le sérum. Pour cela nous avons d'abord testé des échantillons de sérum dopés avec *S. aureus*. Aucun changement dans le signal électrochimique n'a été observé même pour des concentrations élevées de *S. aureus*, impliquant une haute spécificité de l'électrode modifiée anti-fimbriae envers *E. Coli* UTI89 (Figure 29C). Le capteur développé a finalement été exploité pour détecter *E. Coli* UTI89 dans des échantillons de sérum humain dopés avec 10^3 ufc mL⁻¹ *E. Coli* UTI89, en plus de *S. aureus* (10^3 et 10^6 ufc mL⁻¹). D'après la Figure 29D, il devient évident que la présence de *S. aureus* n'interfère pas significativement avec la réponse du courant détectée de *E. Coli* UTI89 sur les électrodes d'or modifiées anti-fimbrial PEG / rGO / PEI.

2.1.9 Conclusion

Nous avons démontré que le potentiel de polyéthylèneimine modifié avec des nanofeuillets d'oxyde de graphène réduit déposés par électrophorèse sur l'électrode d'or pour la détection électrochimique est sensible à l'*E. Coli* UTI89 et sélective par rapport à une autre souche de la même espèce *E. Coli* UTI89 $\Delta fimA$. La fonctionnalisation covalente de l'électrode d'or avec des anticorps anti-fimbriae *E. Coli* a abouti à un dispositif de détection hautement sensible à *E. Coli* UTI89. L'utilisation de la voltammétrie à impulsion différentielle et $[Fe(CN)_6]^{4-}$ en tant que sonde redox nous a permis d'obtenir une limite de détection de 10 ufc mL⁻¹. Comme les concentrations d'*E. Coli* UTI89 de 10^4 ufc mL⁻¹ sont corrélées à des patients hautement infectés, une faible limite de détection permettra de donner des indications aux premiers stades d'éventuelles infections urinaires. Les interfaces se sont également révélées adéquates pour la détection dans des échantillons de sérum et d'urine humains ainsi qu'en présence d'autres espèces de bactéries, faisant l'approche d'un grand

intérêt clinique. En outre, le concept d'utilisation d'une électrode modifiée par rGO / PEI pour la modification covalente avec des anticorps pathogènes est général et peut être facilement adapté à toute autre espèce pathogène, ce qui rend l'approche très polyvalente.

2.2 Biodétection électrochimiques des bactéries modifiée par un sel de diazonium

Le but de ce travail a consisté en la modification d'une surface d'or qui peut agir comme électrode modifiée pour la détection électrochimique de bactéries pathogènes.

La caractérisation modification de l'électrode a été effectuée par voltammétrie cyclique en balayant le potentiel entre 0 V et 0,6 V pour 'n' nombre optimisé de cycles. La modification de la surface de l'électrode par le 4-carboxyphényle a été confirmée par voltammétrie cyclique, mesures de l'angle de contact, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Ensuite, le capteur électrochimique à base d'anticorps E. Coli (capteur AB-E. Coli) reposant sur l'or modifié au 4-carboxy phényle a été fabriqué par l'immobilisation de AB-E. Coli. Le capteur AB-E. Coli résultant peut détecter la bactérie E. Coli K12 en mesurant la densité de courant du capteur AB-E. Coli. Des mesures par voltampérométrie cyclique et voltampérométrie impulsionnelle différentielle avec des concentrations différentes de la bactérie cible ont permis de corroborer ces résultats.

2.2.1 Electrogreffage des sels d'aryl diazonium

Les points clés de la chimie de surface du sel de diazonium sont : facilité de préparation, rapide (électro) réduction, large choix des groupes fonctionnels réactifs et forte liaison surface aryl. Le groupement R peut être une espèce réactive (amine, carboxylique acide, azide, alcynyle, hydroxyalkyle, chloroalkyle, 4-benzoylphényle, ester activé, etc.). Il est clair que les polymères peuvent être couplés à des surfaces via l'ancrage du groupe R [16]. Le couplage peut être atteint par une approche "greffant sur" consistant à lier un polymère réactif préfabriqué, ou par des méthodes de "greffage" [17–21] consistant en une polymérisation initiée en surface. R est le groupe initiateur ou un groupe qui pourrait être post-fonctionnalisé pour la fixation de l'initiateur ou un monomère polymérisable [22]. L'ajout de radicaux produits à la surface est un autre moyen pour réaliser des électrodes modifiées avec des applications catalytiques, analytiques ou biotechnologiques [23].

Le dépôt électrochimique de différents dérivés aromatiques du diazonium a été caractérisé et utilisé pour la modification de surface de carbone différent (carbone vitreux, graphite, fibre de carbone, pâte de carbone, carbone nanotubes, etc.) ou électrodes métalliques avec diverses applications pratiques [24]. La modification des surfaces par la réduction électrochimique des sels de diazonium se résume sur trois types de surfaces, le carbone, le métal et un semiconducteur comme indiqué dans la Figure 30.

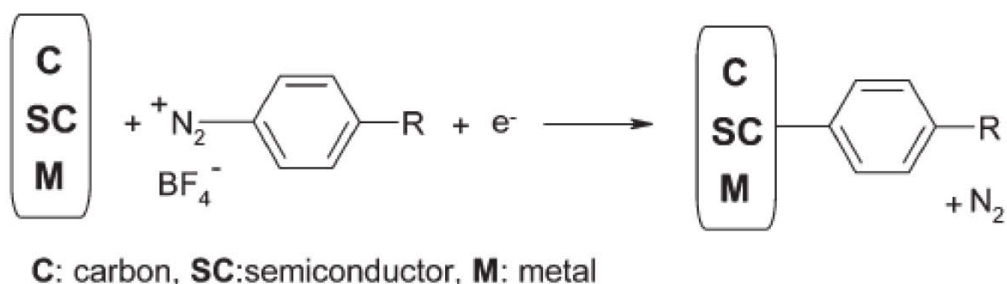


Figure 30: modification des surfaces par la réduction électrochimique des sels de diazonium sur carbone, métal ou semi-conducteur

La méthode est assez simple : un sel de diazonium ArN_2^+ ($c \approx 1$ à 10 mM) dissous dans un milieu aprotique avec un support électrolyte (acétonitrile ACN + $0,1$ M NBu_4BF_4) ou en milieu acide aqueux (par exemple H_2SO_4 $0,1$ M) est réduit, en utilisant la surface à modifier en tant que cathode. Le potentiel de cette cathode est réglé à l'aide d'un potentiostat au potentiel du pic voltamétrique du diazonium ou à un potentiel plus cathodique (plus négatif) pour une période variable de temps (secondes à minutes). Après un rinçage complet de l'électrode dans un bain à ultrasons afin d'éliminer tout produit chimique faiblement adsorbé, il est possible d'observer le groupe aryle lié à la surface par différentes méthodes (spectroscopiques).

2.2.2 Les différentes méthodes de greffage du sel diazonium

Dans leur article de 1992, Pinson et collaborateurs ont décrit le mécanisme de réaction de la modification des électrodes de carbone par les sels d'aryl diazonium [25]. L'électroréduction génère un radical phényle qui peut réagir avec la surface directement "sur l'électrode", par transfert d'électrons accompagné du clivage du diazote. Alternativement, il est possible de greffer des couches d'aryle: i) spontanément, sans induction électrochimique; ii) par ultrasons; iii) sous lumière UV; iv) avec assistance micro-ondes. En outre, les composés de diazonium peuvent être générés *in situ* à partir des anilines parentes et fournir

une approche efficace particulièrement souhaitable pour la modification des nanotubes de carbone. Les polymères diazotés [26,27] et les dendrimères [28,29] se sont avérés très intéressants et efficace dans la modification des nanotubes de carbone (CNT) et nanoparticules métalliques générées *in situ*, respectivement.

Les molécules de diazonium modifiées avec divers groupes fonctionnels ont été introduits sur des électrodes pour l'immobilisation de biomolécules telles que les enzymes [30–32], protéines [33] et anticorps [33,34] pour applications de biodétection. À notre connaissance, il n'y a que quelques travaux sur l'utilisation de cette chimie pour l'immobilisation de l'ADN [35–38] et ceux-ci ne concernaient que les essais d'hybridation.

Le Tableau 12 résume les principales méthodes actuellement utilisées pour obtenir une couche d'aryle greffée sur des électrodes planes et des particules en suspension [22].

Tableau 10: principales méthodes pour greffer des couches d'aryle à partir de composés de diazonium [22]

Méthodes	Substrats	Références
Électrolytiques	Zinc, Nickel, Fer, carbone vitreux carbone nanotubes	[39]
		[40]
Chimique	Nanoparticules d'or Nanoparticules de palladium, Nanoparticules d'oxyde de Titane	[41]
		[42]
		[43]
Électrochimique	Carbone vitreux Or Nanotubes de carbone Fer Fibres de carbone Diamant unltreanocristallin	[44,45]
		[46]
		[47,48]
		[49]
		[50]
Photochimique	les nanotubes de carbone multifeuillets	[51]
Sonochimique	Nano-diamant L'oxyde d'indium-étain (ITO)	[52]
		[53]
Thermique	Carbone nanotubes	[54]
Micro-onde	Carbone nanotubes	[55]
Mécano-chimique	sphères de carbone vitreux	[56]

2.2.3 Le greffage du sel diazonium sur électrode d'or

Les électrodes en or sont utiles pour construire des capteurs électrochimiques car elles peuvent être utilisées dans un large intervalle de potentiel et sont chimiquement inertes. En outre, ce matéla est facilement déposé par les techniques de microfabrication en salle blanche. Les groupes aminophényles ont été greffés électrochimiquement à la surface d'une électrode

en or par réduction *in situ* pour générer des cations de monodiazoniumde chlorure d'aminobenzyle (Figure 31).

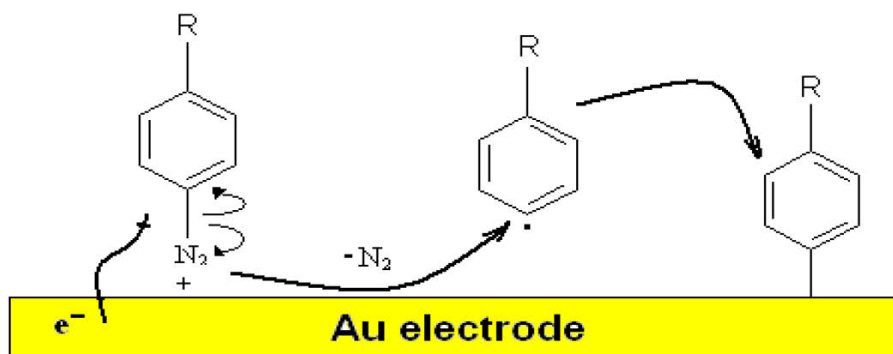


Figure 31: mécanisme de l'électrogreffage du sel de diazonium sur des surfaces d'or [58]

2.2.4 Expérience

La synthèse de sel diazonium 4-carboxyphenyl sur greffé sur l'électrode d'or a été réalisé par le protocole établi par Chung et al [59], les produits chimiques sont achetés de Sigma Aldrich. Toutes les solutions pour les expériences sont préparées avec l'eau purifiée Milli-Q plus (water purification system Millipore Co. Ltd.; la résistivité final de l'eau est $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Anticorps polyclonal d'E. Coli de chèvre (tous Antigènes) est de Meridian Life sciences, Bactérie E.coli K12.

Concernant la culture et l'incubation de la bactérie étudiée, nous avons suivi le même protocole cité dans le paragraphe « Culture bactérienne et détection à base d'anticorps E. Coli anti-fimbriae sur interface modifiés PEG / rGO / PEI ». Ce protocole a fait l'objet d'une publication cité dans les références [60]. Après lavage, le précipité a été mis en suspension dans 15 mL de PBS et utilisé comme solution mère originale d'E. Coli ; toutes les autres concentrations ont été faites en diluant ceci dans PBS. La concentration de la bactérie pathogène dans la solution mère a été estimée en mesurant la densité à 600 nm par corrélation entre la densité optique et la concentration bactérienne (ufc.mL^{-1}) [61].

2.2.4.1 Modification de l'électrode

L'électrode en or a été pré-nettoyée en utilisant de l'acétone, puis de l'alcool et ultrasoniquée pendant 30 minutes avant utilisation et finalement lavée avec l'eau ultra pure (UPW, Ultra Pure Water). La modification de l'électrode a été effectuée par réduction électrochimique du sel de diazonium dans une solution de mélange contenant 0,01 M d'acide

4-aminobenzoïque dissous dans 20 mL de solution aqueuse de chlorhydrate chaud (0,22 M). Après refroidissement à 0°C, 0,011 M de NaNO₂ aqueux a été ajouté lentement au mélange réactionnel sous agitation. Les voltamogrammes cycliques ont été enregistrés dans la plage de potentiel allant de 0,2 V (I= 0 A) à -0,2 V (vs. Ag/AgCl). Après modification électrochimique, les électrodes ont été lavées avec UPW et séchées à température ambiante. L'électrode modifiée par carboxyphényle est désignée par COOH-Au.

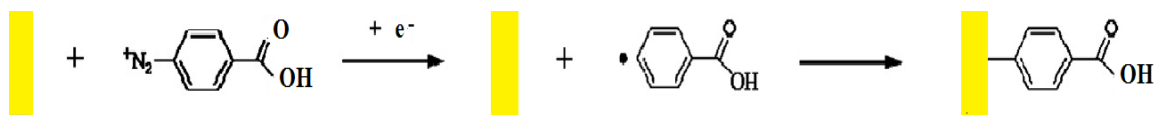


Figure 32: modification de l'électrode d'or par carboxyphényle

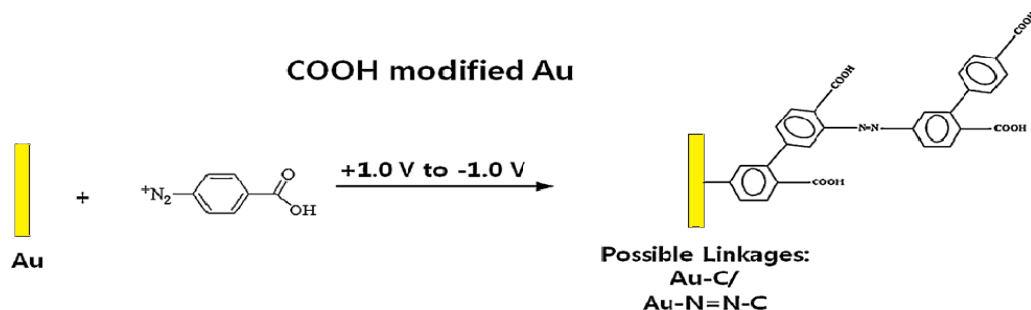


Figure 33: modification 4-carboxyphényle plausible à l'électrode Au

La voltamétrie cyclique (CV) et la voltampérométrie impulsionnelle différentielle (DPV) ont été réalisées en utilisant un potentiostat Autolab 30 (Eco-Chemie, Utrecht, Pays-Bas).

Les expériences électrochimiques ont été réalisées avec un système conventionnel à trois électrodes. La surface d'or modifiée a été utilisée comme électrode de travail. Le fil de platine été utilisé comme contre-électrode. Les potentiels électrochimiques ont été rapportés par rapport à Ag⁺/Ag (fil d'argent) et Ag/AgCl (KCl saturé). K₃[Fe(CN)₆] (5 mM) et K₄[Fe(CN)₆] (5 mM) (1: 1) dans du PBS 0,1 M ont été utilisés comme électrolyte support.

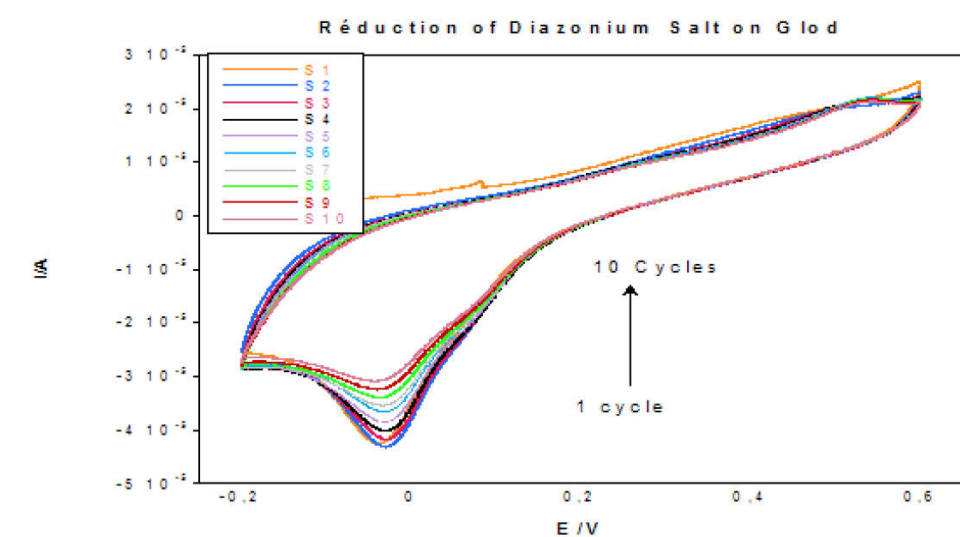


Figure 34. voltamogrammes cycliques de l'électrode d'or nu dans une solution de mélange contenant 0,01 M d'acide 4-aminobenzoïque dissous dans 20 mL de solution aqueuse de chlorhydrate chaude (0,22 M). Après refroidissement à 0 ° C, 0,011 M de NaNO₂ aqueux à la vitesse de balayage 100 mV / s.

2.2.4.2 Immobilisation de la sonde AC sur l'électrode

Le biocapteur AC-E. Coli a été fabriqué en utilisant le sel de 4-carboxyphényldiazonium comme suit. Le groupement carboxyle sur or a été activé par immersion dans du PBS 0,1 M (pH 7,0) contenant 30 mM d'EDC et 30 mM de NHS pendant 2 h à température ambiante [62,63]. L'électrode / COOH-Au a été rincée avec du PBS 0,1 M pour éliminer l'EDC et le NHS excessifs ou non liés. Nous avons également utilisé du DSTP (ester de di (N-hydroxysuccinimide) acide 3,3'-dithiodipropionique 30 mM à la place du couple EDC / NHS afin de comparer l'efficacité de l'immobilisation. Puis l'électrode a été fonctionnalisée avec AC-E. Coli dans PBS contenant 200 µg/mL d'AC-E. Coli pendant 2 h à température ambiante et rincée avec du PBS 0,1 M. Enfin, nous avons incubé les électrodes modifiées avec différentes concentrations de E. Coli K12 de 10 à 10⁸ ufc mL⁻¹.

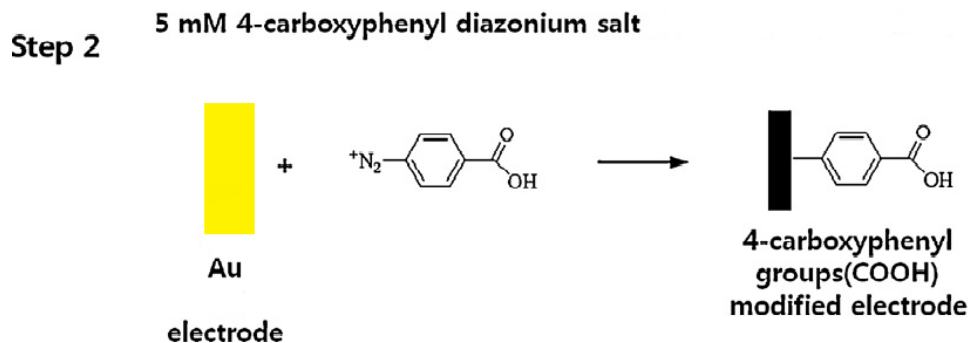
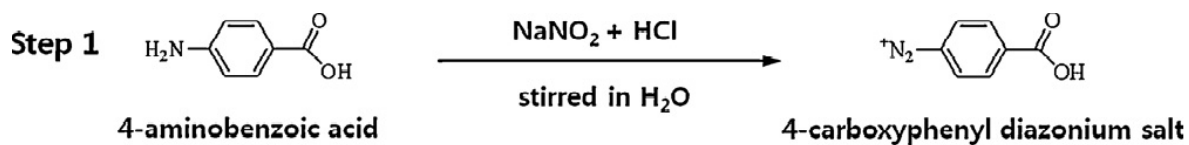


Figure 35 : modification électrochimique de l'électrode avec le sel de 4-carboxyphényl diazonium.

2.2.5 Caractérisations

2.2.5.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

La spectroscopie infrarouge a été utilisée pour caractériser chimiquement le sel de diazonium déposé sur la surface d'électrode en or. Le spectromètre a été équipé d'un accessoire de réflectance spéculaire à angle variable VeeMax II de Pike Technologies. Chaque spectre a été recueilli en accumulant 34 balayages à une résolution de 4 cm^{-1} dans la gamme de 4000 à 650 cm^{-1} . Le signal de l'électrode d'or propre a été soustrait en tant qu'arrière-plan. Le logiciel Omnic10 a été utilisé pour les mesures et la correction de l'arrière-plan.

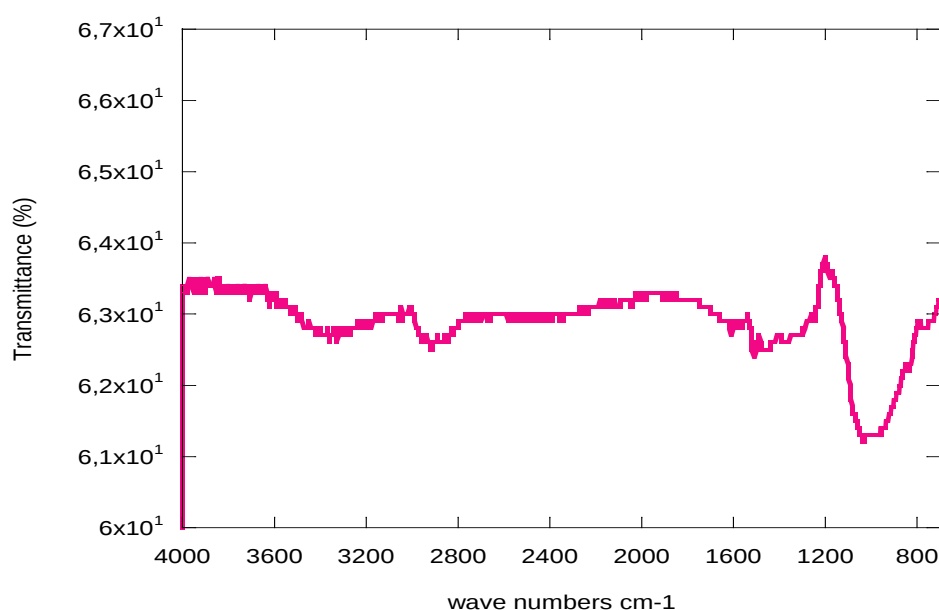


Figure 36: spectre IR du sel de 4-carboxyphényl diazonium déposé sur une électrode en or en réduction cathodique.

Le spectre FT-IR du sel de 4-carboxyphényl diazonium (Figure 36) montre la bande d'étirement O-H à $3384,7\text{ cm}^{-1}$. L'apparition des bandes à $1692,4\text{ cm}^{-1}$ et $1608,6\text{ cm}^{-1}$ correspondant à la présence du groupe carboxylique et C=C du cycle aromatique, démontre clairement la modification de surface à partir de la formation de sel de diazonium. Les bandes observées sont résumées dans le Tableau 13.

Tableau 11: vibrations et fréquences IR des groupes fonctionnels du sel diazonium

Bands (cm^{-1})	Vibration
3384.7	O-H du groupe acide
2915.6	C-H
2849.6	C-H
1692.4	C=O
1608.6	C=C de la partie aromatique

2.2.5.2 Mesures d'angle de contact

Les changements d'angles de contact entre l'or nu et Au-COOH modifié sont présentés sur la Figure 37 en utilisant la méthode de la goutte pendante avec une précision de $0,1\text{ mNm} \pm 1$ (DSA 100, Kruss GmbH, Allemagne). L'angle de contact des surfaces d'électrodes nues est de $82,9^\circ$ alors qu'il est de $31,9^\circ$ pour l'électrode modifiée. Les résultats ont révélé que les angles de contact des surfaces d'électrodes modifiées diminuaient par rapport à

l'électrode nue. La variation de l'angle de contact après modification confirme la modification électrochimique de l'or après réduction cathodique du sel de diazonium. L'étendue de la diminution de l'angle de contact a montré une variation entre les électrodes due au type de liaisons formé entre l'électrode et les groupes organiques et la nature du film.



Figure 37: mesures de l'angle de contact des surfaces Au (a) et COOH-Au (b)

2.2.5.3 Microscope électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage a été réalisée avec un appareil à haute résolution « ENVIRONNEMENTAL FEI QUANTA 450W », le microscope est équipé de différents détecteurs permettant de former des images grâce aux électrons secondaires et rétrodiffusés. Une tension d'accélération de 15 kV a été utilisée. Ces caractérisations ont été faites dans la salle blanche de FEMTO-ST. La Figure 38 représente la photo prise par le MEB de l'électrode avant la modification (a) et après la modification par sel de diazonium (b).

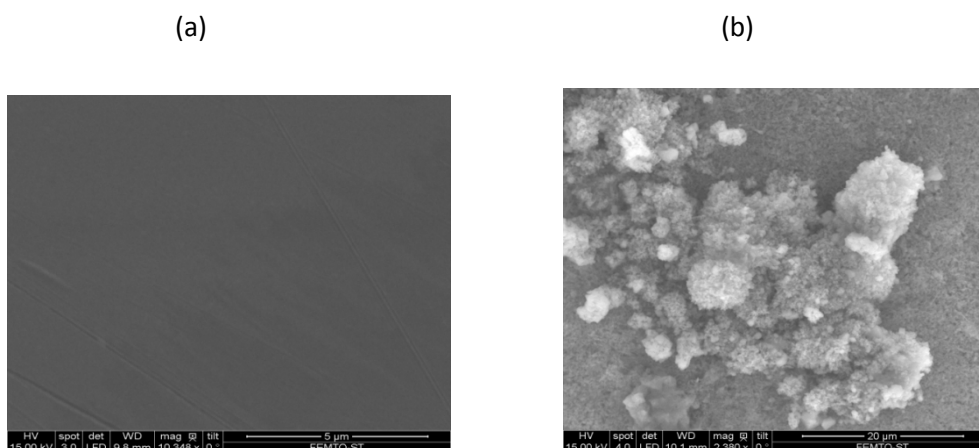
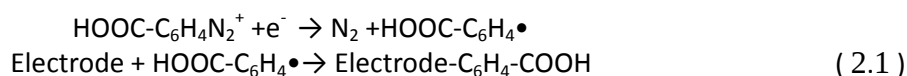


Figure 38: photo MEB de l'électrode d'or (a) avant et (b) après le dépôt électrochimique du sel de diazonium après plusieurs mois

2.2.6 Discussions

La réduction électrochimique du sel de 4-carboxyphényl diazonium (5 mM) sur l'électrode d'or est représentée sur la Figure 34 avec des balayages CV successifs. Dans le

premier cycle de potentiel, un pic de réduction à environ -0,03 V est observé et correspond à la formation de radicaux 4-carboxyphényle au niveau de l'électrode (Schéma 1, étape 1) [64]. Le pic de réduction diminue au fur et à mesure des balayages suivants. Ce comportement est dû à l'adsorption de groupes carboxyphényles qui pourraient bloquer la surface de l'électrode [65–70]. Au niveau de l'électrode d'or, la réduction du cation de diazonium et le dépôt subséquent de matériaux se font par un procédé en deux étapes. Le dépôt de groupement aryle par réduction électrochimique de cations diazonium a été rapporté comme un film multicouche formé sur la surface d'or par des liaisons Au–C et / ou Au–N=N–C [71]. La réduction électrochimique des sels de 4-carboxyphényl diazonium sur or est la suivante:



Une couche d'auto-formation suivant la réaction du sel de diazonium à la surface de l'électrode a été rapportée [72]. Les sels de diazonium subissent une réduction spontanée à la surface de l'électrode pour former des radicaux aryles et des films. Ces films comprennent des multicouches désordonnées [73]. Downard et ses collègues [74] ont évalué la formation spontanée de couches dérivées de diazonium sur la surface de l'or. L'épaisseur des films modifiés au diazonium a montré une influence sur le temps d'incubation et d'autres paramètres expérimentaux. Dans de tels cas, il est difficile de contrôler l'épaisseur et la reproductibilité du film dans des conditions expérimentales. Dans ce travail, nous avons utilisé la voltampérométrie cyclique avec un nombre fixe de cycles de potentiel et de vitesse de balayage. Cela a assuré une modification d'électrode reproductible avec des groupes carboxyphényles. L'électroactivité des électrodes modifiées par COOH⁻ a été évaluée par des mesures d'électroactivité.

2.2.6.1 Electroactivité des électrodes modifiées au 4-carboxyphényle

Les réductions cathodiques du sel de diazonium sur l'électrode d'or nu et l'électrode modifiée (COOH-Au) dans K₃[Fe(CN)₆] (5 mM) et K₄[Fe(CN)₆] (5 mM) (1:1) contenant du PBS 0,1 M à une vitesse de balayage de 100 mV/s sont présentées sur la Figure 39. La présence de pics du courant faradiques souligne le processus de transfert d'électrons Fe(CN)₆³⁻/⁴⁻ avec une séparation en potentiel entre pic d'oxydation et de réduction de 0,1V. Après la modification de l'électrode par le phénylcarboxyle, la séparation du pic redox était presque identique (0,09 V). Cependant, une diminution significative du pic du courant est observée

après la modification de la surface de l'électrode. Nous attribuons la raison de ce changement à l'électroactivité du revêtement. En effet, l'électrode modifiée par COOH est chargée négativement. Cela exerce une répulsion électrostatique pour les ions $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ qui entravent la diffusion du $\text{Fe(CN)}_6^{3-/4-}$ à la surface de l'électrode et entraînent une diminution du pic. La diminution du pic du courant de l'électrode modifiée par COOH provient de l'introduction de groupes organiques isolants sur la surface de l'électrode.

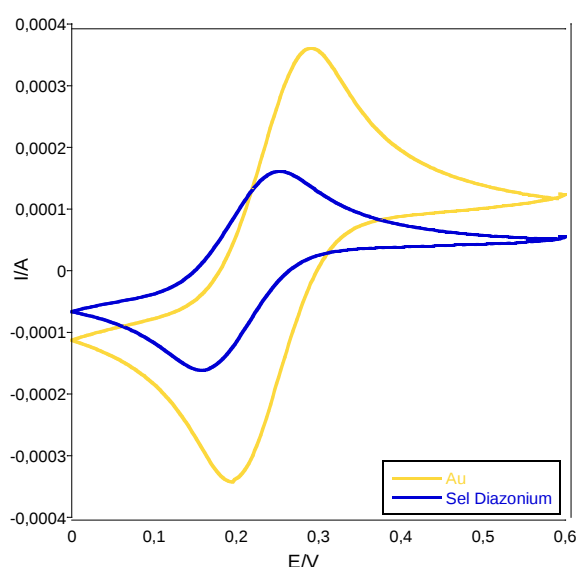


Figure 39: la réduction cathodique (CVs) du sel de diazonium sur de l'électrode l'or nu et l'électrode modifiée (COOH-Au) dans $\text{K}_3[\text{Fe(CN)}_6]$ (5 mM) et $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$ (5 mM) (1:1) contenant du PBS 0,1 M à une vitesse de balayage de 100 mV/s

2.2.6.2 Electroactivité du capteur E-AC-E. Coli

L'électroactivité des électrodes, lors d'une modification séquentielle à partir de l'or nu pour la fabrication d'un biocapteur AC-Au, a été étudiée par CV en présence de $\text{K}_3[\text{Fe(CN)}_6]$ (5 mM) et $\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$ (5 mM) (1:1) contenant 0,1 M de PBS avec une vitesse de balayage de 100mV/s. Les CVs de (a) l'or nu, de COOH-Au, d'EDC/NHS-Au, d'E.Coli-AC-Au, sont représentés sur la Figure 40 (a) et (b). Comme décrit précédemment, après le dépôt électrochimique des groupes 4-carboxyphényle, le pic de courant diminue par rapport à l'or nu. Ceci indique qu'une partie de la surface de l'électrode peut être bloquée par des groupes organiques adsorbés [75]. L'électrode COOH-Au a été traitée avec 30 mM d'EDC et 30 mM de NHS dans du PBS 0,1 M (pH 7,0) pendant 2 h à température ambiante pour obtenir une réticulation EDC/NHS. Nous avons également essayé avec DTSP 30 mM dans le PBS 0,1 M (pH 7,0) pour comparer l'efficacité de l'activation de l'électrode de surface par rapport à la voie EDC/NHS. Après modification EDC/NHS ou DTSP, le pic du courant de l'électrode a

augmenté. Ceci peut être interprété par la facilité du transfert de charge par l'effet tunnel du cation $-NH^+$ dans la surface activée (62). Ensuite, l'électrode EDC/NHS-Au ou DTSP-Au a été rincée avec du PBS afin d'éliminer tout excès de EDC/NHS ou du DTSP et incubé avec AC-E.Coli dans une solution de PBS (200 $\mu\text{g/mL}$) pendant 2 h à température ambiante, suivi par rinçage au PBS pour éliminer l'excès des anticorps non-greffés.

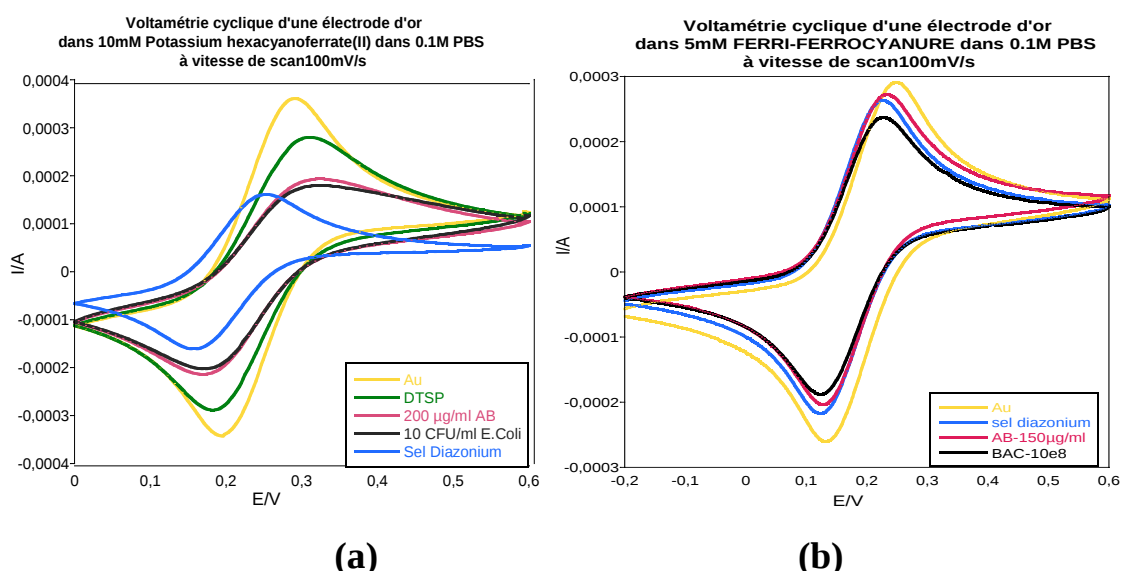


Figure 40 : voltampérogramme cyclique dans $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM) dans du PBS (0,1 M), vitesse de balayage 100 mV / s pour 10 ufc mL^{-1} activation AB avec DTSP (a), 10^8 ufc. mL^{-1} activation AC avec Couple EDC/NHS (b).

L'immobilisation de l'anticorps a été étudiée également par voltamétrie cyclique. Après activation du groupe carboxylique et immobilisation covalente des anticorps, le pic de courant de réduction de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ a encore augmenté (Figure 40). Cette faible augmentation peut être attribuée à la neutralisation de la charge négative des groupes carboxyliques terminaux sur la surface avec l'anticorps chargé positivement. Un comportement similaire a été signalé dans d'autres travaux [76,77].

2.2.6.3 Détection des bactéries

Les immunocapteurs à base d'anticorps ont été l'approche la plus explorée dans le développement de la détection de pathogènes [78,79]. Cependant, la stabilité limitée des anticorps est un inconvénient majeur dans leur utilisation généralisée. Les tests basés sur l'affinité entre un ligand (anticorps, bactériophages ou lectines) et récepteurs sur la surface des cellules microbiennes ont également été largement étudiés [80]. L'électrochimie est d'une

importance particulière en raison de ses avantages tels que la sensibilité élevée, la sélectivité, l'instrumentation simple et le faible bruit de fond endogène [81,82].

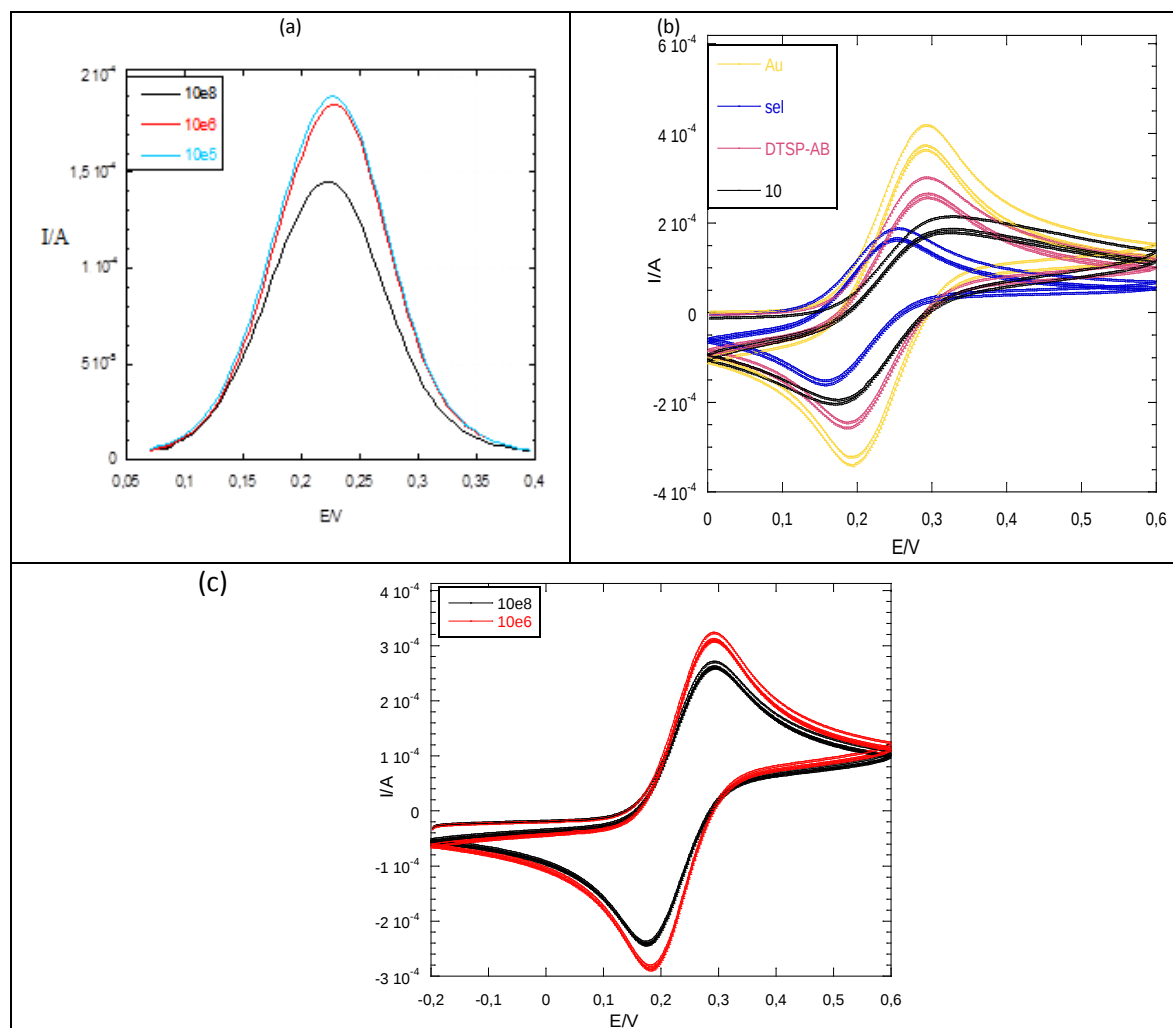


Figure 41: (a) voltampérogrammes d'impulsions différentielles mesurées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM) / PBS (0,1 M) après E. Coli incubation pendant 30 min avec AC-E. Coli (200 μg / mL) pour différentes concentrations: 10^8 ufc mL $^{-1}$ (noir), 10^6 ufc mL $^{-1}$ (rouge), 10^5 ufc mL $^{-1}$ (bleu), (b) et (c) voltammogramme cyclique en $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM) dans du PBS (0,1 mM), de différentes concentrations: 10 cfu.mL $^{-1}$ (b), (c) 10^8 ufc mL $^{-1}$ (noir), 10^6 ufc mL $^{-1}$ (rouge), vitesse de balayage 100 mV/s.

La détection des bactéries a été réalisée après incubation des différentes concentrations d'E. Coli pendant 30 min dans une solution tampon de PBS (0,1 M) à pH=7.4. Après un lavage de 15 min dans du tampon PBS 10 mM (pH =7,4), les électrodes ont été immergées dans une solution contenant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mM) / PBS (0,1 M) pour effectuer une mesure électrochimiques par DPV et CV. Les Figure 41 a, b et c montrent la diminution du pic de courant suite l'augmentation de la concentration de la bactérie détectée par le capteur qui est

dû soit à l'effet de blocage physique des bactéries capturées, soit à la répulsion électrostatique entre les cellules bactériennes chargées négativement et la sonde redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

2.2.7 Conclusion

Dans cette étude, nous avons introduit avec succès des groupes carboxyphényles sur une électrode d'or par réduction électrochimique du sel de 4-carboxyphényl diazonium. Les électrodes modifiées par le carboxyphényle ont été caractérisées par voltammétrie cyclique, angle de contact, spectroscopie infrarouge FTIR. L'électrode modifiée a été utilisée pour la détection spécifique de la bactérie E. Coli par un anticorps polyclonal AC-E. Coli. Cependant ce travail n'est pas encore finalisé. Il reste l'étude de spécificité avec d'autres bactéries et anticorps pour valider l'efficacité du capteur. Le capteur ainsi réalisé pour la détection de la bactérie a présenté une sensibilité élevée, une limite de détection jusqu'à 10^3 ufc mL^{-1} .

Bibliographie

- [1] Subramanian P, Barka-Bouaifel F, Bouckaert J, Yamakawa N, Boukherroub R, Szunerits S. Graphene-coated surface plasmon resonance interfaces for studying the interactions between bacteria and surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014;6:5422–31. doi:10.1021/am405541z.
- [2] Subramanian P, Lesniewski A, Kaminska I, Vlandas A, Vasilescu A, Niedziolka-Jonsson J, et al. Lysozyme detection on aptamer functionalized graphene-coated SPR interfaces. *Biosensors and Bioelectronics* 2013;50:239–43. doi:10.1016/j.bios.2013.06.026.
- [3] An SJ, Zhu Y, Lee SH, Stoller MD, Emilsson T, Park S, et al. Thin Film Fabrication and Simultaneous Anodic Reduction of Deposited Graphene Oxide Platelets by Electrophoretic Deposition. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 2010;1:1259–63. doi:10.1021/jz100080c.
- [4] Pandey CM, Tiwari I, Singh VN, Sood KN, Sumana G, Malhotra BD. Highly sensitive electrochemical immunosensor based on graphene-wrapped copper oxide-cysteine hierarchical structure for detection of pathogenic bacteria. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2017;238:1060–9. doi:10.1016/j.snb.2016.07.121.
- [5] Maalouf R, Fournier-Wirth C, Coste J, Chebib H, Saïkali Y, Vittori O, et al. Label-free detection of bacteria by electrochemical impedance spectroscopy: comparison to surface plasmon resonance. *Anal Chem* 2007;79:4879–86. doi:10.1021/ac070085n.
- [6] Yang L, Li Y, Erf GF. Interdigitated Array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal Chem* 2004;76:1107–13. doi:10.1021/ac0352575.
- [7] Geng P, Zhang X, Meng W, Wang Q, Zhang W, Jin L, et al. Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of *Escherichia coli* using electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* 2008;53:4663–8. doi:10.1016/j.electacta.2008.01.037.
- [8] Chowdhury AD, De A, Chaudhuri CR, Bandyopadhyay K, Sen P. Label free polyaniline based impedimetric biosensor for detection of *E. coli* O157:H7 Bacteria. *Sensors & Actuators: B Chemical* 2012;Complete:916–23. doi:10.1016/j.snb.2012.06.004.
- [9] Escamilla-Gómez V, Campuzano S, Pedrero M, Pingarrón JM. Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive *Escherichia coli* quantisation. *Biosens Bioelectron* 2009;24:3365–71. doi:10.1016/j.bios.2009.04.047.
- [10] Lin Y-H, Chen S-H, Chuang Y-C, Lu Y-C, Shen TY, Chang CA, et al. Disposable amperometric immunosensing strips fabricated by Au nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for the detection of foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Biosens Bioelectron* 2008;23:1832–7. doi:10.1016/j.bios.2008.02.030.
- [11] Pandey A, Gurbuz Y, Ozguz V, Niazi JH, Qureshi A. Graphene-interfaced electrical biosensor for label-free and sensitive detection of foodborne pathogenic *E. coli* O157:H7. *Biosens Bioelectron* 2017;91:225–31. doi:10.1016/j.bios.2016.12.041.
- [12] Huang Y, Dong X, Liu Y, Li L-J, Chen P. Graphene-based biosensors for detection of bacteria and their metabolic activities. *J Mater Chem* 2011;21:12358–62. doi:10.1039/C1JM11436K.
- [13] Chang J, Mao S, Zhang Y, Cui S, Zhou G, Wu X, et al. Ultrasonic-assisted self-assembly of monolayer graphene oxide for rapid detection of *Escherichia coli* bacteria. *Nanoscale* 2013;5:3620–6. doi:10.1039/c3nr00141e.

- [14] Chen Y, Michael ZP, Kotchey GP, Zhao Y, Star A. Electronic Detection of Bacteria Using Holey Reduced Graphene Oxide. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014;6:3805–10. doi:10.1021/am500364f.
- [15] Hernández R, Vallés C, Benito AM, Maser WK, Rius FX, Riu J. Graphene-based potentiometric biosensor for the immediate detection of living bacteria. *Biosens Bioelectron* 2014;54:553–7. doi:10.1016/j.bios.2013.11.053.
- [16] Mahouche-Chergui S, Gam-Derouich S, Mangeney C, Chehimi MM. Aryl diazonium salts: a new class of coupling agents for bonding polymers, biomacromolecules and nanoparticles to surfaces. *Chemical Society Reviews* 2011;40:4143. doi:10.1039/c0cs00179a.
- [17] Wang G-J, Huang S-Z, Wang Y, Liu L, Qiu J, Li Y. Synthesis of water-soluble single-walled carbon nanotubes by RAFT polymerization. *Polymer* 2007;48:728–33. doi:10.1016/j.polymer.2006.12.024.
- [18] Santos LM, Ghilane J, Fave C, Lacaze P-C, Randriamahazaka H, Abrantes LM, et al. Electrografting Polyaniline on Carbon through the Electroreduction of Diazonium Salts and the Electrochemical Polymerization of Aniline. *The Journal of Physical Chemistry C* 2008;112:16103–9. doi:10.1021/jp8042818.
- [19] Deniau G, Azoulay L, Bougerolles L, Palacin S. Surface Electroinitiated Emulsion Polymerization: Grafted Organic Coatings from Aqueous Solutions. *Chemistry of Materials* 2006;18:5421–8. doi:10.1021/cm060739t.
- [20] Matrab T, Chehimi MM, Perruchot C, Adenier A, Guillez A, Save M, et al. Novel Approach for Metallic Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization Using Electrografted Initiators Based on Aryl Diazonium Salts. *Langmuir* 2005;21:4686–94. doi:10.1021/la046912m.
- [21] Gam-Derouich S, Carbonnier B, Turmine M, Lang P, Jouini M, Ben Hassen-Chehimi D, et al. Electrografted Aryl Diazonium Initiators for Surface-Confined Photopolymerization: A New Approach to Designing Functional Polymer Coatings. *Langmuir* 2010;26:11830–40. doi:10.1021/la100880j.
- [22] Salmi Z, Gam-Derouich S, Mahouche-Chergui S, Turmine M, Chehimi M. On the interfacial chemistry of aryl diazonium compounds in polymer science. *Chemical Papers* 2012;66. doi:10.2478/s11696-012-0135-5.
- [23] Nassef HM, Civit L, Frago A, O'Sullivan CK. Amperometric sensing of ascorbic acid using a disposable screen-printed electrode modified with electrografted o-aminophenol film. *Analyst* 2008;133:1736–41. doi:10.1039/B808499H.
- [24] Khoshroo M, Rostami AA. Electrochemical and impedance spectroscopy studies of various diazonium salts on a glassy carbon electrode. *Monatsh Chem* 2010;141:841–6. doi:10.1007/s00706-010-0335-z.
- [25] Delamar M, Hitmi R, Pinson J, Saveant JM. Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts. *Journal of the American Chemical Society* 1992;114:5883–4. doi:10.1021/ja00040a074.
- [26] Bahr JL, Tour JM. Highly Functionalized Carbon Nanotubes Using in Situ Generated Diazonium Compounds. *Chemistry of Materials* 2001;13:3823–4. doi:10.1021/cm0109903.
- [27] Bahr JL, Yang J, Kosynkin DV, Bronikowski MJ, Smalley RE, Tour JM. Functionalization of Carbon Nanotubes by Electrochemical Reduction of Aryl Diazonium Salts: A Bucky Paper Electrode. *Journal of the American Chemical Society* 2001;123:6536–42. doi:10.1021/ja010462s.
- [28] Ratheesh Kumar VK, Gopidas KR. Palladium nanoparticle-cored G1-dendrimer stabilized by carbon–Pd bonds: synthesis, characterization and use as chemoselective,

- room temperature hydrogenation catalyst. *Tetrahedron Letters* 2011;52:3102–5. doi:10.1016/j.tetlet.2011.04.011.
- [29] Kumar VKR, Gopidas KR. Synthesis and Characterization of Gold-Nanoparticle-Cored Dendrimers Stabilized by Metal–Carbon Bonds. *Chemistry – An Asian Journal* 2010;5:887–96. doi:10.1002/asia.200900388.
- [30] Bourdillon C, Delamar M, Demaille C, Hitmi R, Moiroux J, Pinson J. Immobilization of glucose oxidase on a carbon surface derivatized by electrochemical reduction of diazonium salts. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1992;336:113–23. doi:10.1016/0022-0728(92)80266-7.
- [31] Polsky R, Harper JC, Dirk SM, Arango DC, Wheeler DR, Brozik SM. Diazonium-functionalized horseradish peroxidase immobilized via addressable electrodeposition: direct electron transfer and electrochemical detection. *Langmuir* 2007;23:364–6. doi:10.1021/la062916a.
- [32] Radi A-E, Montornés JM, O’Sullivan CK. Reagentless detection of alkaline phosphatase using electrochemically grafted films of aromatic diazonium salts. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2006;587:140–7. doi:10.1016/j.jelechem.2005.11.003.
- [33] Corgier BP, Marquette CA, Blum LJ. Diazonium-protein adducts for graphite electrode microarrays modification: direct and addressed electrochemical immobilization. *J Am Chem Soc* 2005;127:18328–32. doi:10.1021/ja056946w.
- [34] Ho J-AA, Hsu W-L, Liao W-C, Chiu J-K, Chen M-L, Chang H-C, et al. Ultrasensitive electrochemical detection of biotin using electrically addressable site-oriented antibody immobilization approach via aminophenyl boronic acid. *Biosens Bioelectron* 2010;26:1021–7. doi:10.1016/j.bios.2010.08.048.
- [35] Torrens M, Ortiz M, Turner APF, Beni V, O’Sullivan CK. Controlled Zn-Mediated Grafting of Thin Layers of Bipodal Diazonium Salt on Gold and Carbon Substrates. *Chemistry - A European Journal* 2014.
- [36] Torrens M, Ortiz M, Turner A, Beni V, OSullivan CK. Amperometric detection of *Francisella tularensis* genomic sequence on Zn-mediated diazonium modified substrates. *Electrochemistry Communications* 2015;53.
- [37] Shabani A, Mak AW, Gerges I, Cuccia LA, Lawrence MF. DNA immobilization onto electrochemically functionalized Si(100) surfaces. *Talanta* 2006;70:615–23. doi:10.1016/j.talanta.2006.01.033.
- [38] Ruffien A, Dequaire M, Brossier P. Covalent immobilization of oligonucleotides on p-aminophenyl-modified carbon screen-printed electrodes for viral DNA sensing. *Chem Commun* 2003;0:912–3. doi:10.1039/B300439B.
- [39] Adenier A, Barré N, Cabet-Deliry E, Chaussé A, Griveau S, Mercier F, et al. Study of the spontaneous formation of organic layers on carbon and metal surfaces from diazonium salts. *Surface Science* 2006;21:4801–12. doi:10.1016/j.susc.2006.07.061.
- [40] Dyke CA, Tour JM. Unbundled and Highly Functionalized Carbon Nanotubes from Aqueous Reactions. *Nano Letters* 2003;3:1215–8. doi:10.1021/nl034537x.
- [41] Kumar VKR, Gopidas KR. Synthesis and Characterization of Gold-Nanoparticle-Cored Dendrimers Stabilized by Metal–Carbon Bonds. *Chemistry–An Asian Journal* 2010;5:887–896.
- [42] Kumar VKR, Gopidas KR. Palladium nanoparticle-cored G1-dendrimer stabilized by carbon–Pd bonds: synthesis, characterization and use as chemoselective, room temperature hydrogenation catalyst. *Tetrahedron Letters* 2011;52:3102–3105.
- [43] Mesnage A, Abdel Magied M, Simon P, Herlin-Boime N, Jégou P, Deniau G, et al. Grafting polymers to titania nanoparticles by radical polymerization initiated by diazonium salt. *Journal of Materials Science* 2011;46:6332–8. doi:10.1007/s10853-011-5709-z.

- [44] Delamar M, Hitmi R, Pinson J, Saveant JM. Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts. *Journal of the American Chemical Society* 1992;114:5883–4. doi:10.1021/ja00040a074.
- [45] Baranton S, Bélanger D. Electrochemical Derivatization of Carbon Surface by Reduction of in Situ Generated Diazonium Cations. *J Phys Chem B* 2005;109:24401–10. doi:10.1021/jp054513+.
- [46] Bernard M-C, Chaussé A, Cabet-Deliry E, Chehimi MM, Pinson J, Podvorica F, et al. Organic Layers Bonded to Industrial, Coinage, and Noble Metals through Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Salts. *Chemistry of Materials* 2003;15:3450–62. doi:10.1021/cm034167d.
- [47] Marcoux PR, Hapiot P, Batail P, Pinson J. Electrochemical functionalization of nanotube films: growth of aryl chains on single-walled carbon nanotubes. *New J Chem* 2004;28:302–7. doi:10.1039/B309509F.
- [48] Matrab T, Chancolon J, Mayne-L'Hermite M, Rouzaud J-N, Deniau G, Boudou J-P, et al. Atom transfer radical polymerization (ATRP) initiated by aryl diazonium salts: a new route for surface modification of multiwalled carbon nanotubes by tethered polymer chains. *Colloids and Surfaces A, Physicochemical and Engineering Aspects* 2018;287. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.05.028.
- [49] Adenier A, Bernard M-C, Chehimi MM, Cabet-Deliry E, Desbat B, Fagebaume O, et al. Covalent Modification of Iron Surfaces by Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Salts. *Journal of the American Chemical Society* 2001;123:4541–9. doi:10.1021/ja003276f.
- [50] Matrab T, Nguyen MN, Mahouche S, Lang P, Badre C, Turmine M, et al. Aryl Diazonium Salts for Carbon Fiber Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. *The Journal of Adhesion* 2008;84:684–701. doi:10.1080/00218460802352645.
- [51] Wang J, Carlisle JA. Covalent immobilization of glucose oxidase on conducting ultrananocrystalline diamond thin films 2006;15:279–84. doi:10.1016/j.diamond.2005.09.017.
- [52] Pan Y, Tong B, Shi J, Zhao W, Shen J, Zhi J, et al. Fabrication, Characterization, and Optoelectronic Properties of Layer-by-Layer Films Based on Terpyridine-Modified MWCNTs and Ruthenium(III) Ions. *The Journal of Physical Chemistry C* 2010;114:8040–7. doi:10.1021/jp909904t.
- [53] Dahoumane SA, Nguyen MN, Thorel A, Boudou J-P, Chehimi MM, Mangeney C. Protein-functionalized hairy diamond nanoparticles. *Langmuir* 2009;25:9633–8. doi:10.1021/la9009509.
- [54] Mirkhalaf F, Mason TJ, Morgan DJ, Saez V. Frequency Effects on the Surface Coverage of Nitrophenyl Films Ultrasonically Grafted onto Indium Tin Oxide. *Langmuir* 2011;27:1853–8. doi:10.1021/la104402z.
- [55] Bahr JL, Tour JM. Highly Functionalized Carbon Nanotubes Using in Situ Generated Diazonium Compounds. *Chemistry of Materials* 2001;13:3823–4. doi:10.1021/cm0109903.
- [56] Liu J, i Zubiri MR, Vigolo B, Dossot M, Humbert B, Fort Y, et al. Microwave-Assisted Functionalization of Single-Wall Carbon Nanotubes Through Diazonium 2007. doi:info:doi/10.1166/jnn.2007.819.
- [57] Pandurangappa M, Ramakrishnappa T, Compton RG. Functionalization of glassy carbon spheres by ball milling of aryl diazonium salts. *Carbon* 2009;47:2186–93.

- [58] CHIRA A, COVACI O-I, RADU GL. A COMPARATIVE STUDY OF GOLD ELECTRODES MODIFICATION METHODS WITH AROMATIC COMPOUNDS BASED ON DIAZONIUM AND THIOL CHEMISTRY n.d.:10.
- [59] Chung D-J, Oh S-H, Komathi S, Gopalan AI, Lee K-P, Choi S-H. One-step modification of various electrode surfaces using diazonium salt compounds and the application of this technology to electrochemical DNA (E-DNA) sensors. *Electrochimica Acta* 2012;76:394–403. doi:10.1016/j.electacta.2012.05.044.
- [60] Jijie R, Kahlouche K, Barras A, Yamakawa N, Bouckaert J, Gharbi T, et al. Reduced graphene oxide/polyethylenimine based immunosensor for the selective and sensitive electrochemical detection of uropathogenic *Escherichia coli*. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2018;260:255–63. doi:10.1016/j.snb.2017.12.169.
- [61] Bagheryan Z, Raoof J-B, Golabi M, Turner APF, Beni V. Diazonium-based impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of *Salmonella typhimurium* in food sample. *Biosensors and Bioelectronics* 2016;80:566–73. doi:10.1016/j.bios.2016.02.024.
- [62] Park JW, Jung HS, Lee HY, Kawai T. Electrical recognition of label-free oligonucleotides upon streptavidin-modified electrode surfaces. *Biotechnology and Bioengineering* 2005;10:505–9. doi:10.1007/BF02932285.
- [63] Chung D-J, Oh S-H, Komathi S, Gopalan AI, Lee K-P, Choi S-H. One-step modification of various electrode surfaces using diazonium salt compounds and the application of this technology to electrochemical DNA (E-DNA) sensors. *Electrochimica Acta* 2012;76:394–403. doi:10.1016/j.electacta.2012.05.044.
- [64] Andrieux CP, Pinson J. The Standard Redox Potential of the Phenyl Radical/Anion Couple. *Journal of the American Chemical Society* 2003;125:14801–6. doi:10.1021/ja0374574.
- [65] Pinson J, Podvorica F. Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts. *Chemical Society Reviews* 2005;34:429. doi:10.1039/b406228k.
- [66] BRAHAM Y, BARHOUMI H, MAAREF A, BAKHROUF A, JAFFREZIC-RENAULT N. *Proteus Mirabilis* Bacteria Biosensor Development Based on Modified Gold Electrode with 4-Carboxyphenyl Diazonium Salts for Heavy Metals Toxicity Detection 2014;27:10.
- [67] Betelu S, Tijunelyte I, Boubekur-Lecaque L, Ignatiadis I, Ibrahim J, Gaboreau S, et al. Evidence of the Grafting Mechanisms of Diazonium Salts on Gold Nanostructures. *The Journal of Physical Chemistry C* 2016;120:18158–66. doi:10.1021/acs.jpcc.6b06486.
- [68] Liu G, Böcking T, Gooding JJ. Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2007;600:335–44. doi:10.1016/j.jelechem.2006.09.012.
- [69] Kullapere M, Marandi M, Sammelselg V, Menezes HA, Maia G, Tammeveski K. Surface modification of gold electrodes with anthraquinone diazonium cations. *Electrochemistry Communications* 2009;11:405–8. doi:10.1016/j.elecom.2008.12.001.
- [70] Ahmad R, Mocaer A, Gam-Derouich S, Lamouri A, Lecoq H, Decorse P, et al. Grafting of polymeric platforms on gold by combining the diazonium salt chemistry and the photoiniferter method. *Polymer* 2015;57:12–20. doi:10.1016/j.polymer.2014.12.007.
- [71] Ricci AM, Tognalli N, de la Llave E, Vericat C, Méndez De Leo LP, Williams FJ, et al. Electrochemistry of Os(2,2'-bpy)2ClPyCH2NHCOPh tethered to Au electrodes by S–Au and C–Au junctions. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2011;13:5336. doi:10.1039/c0cp02409k.

- [72] Laurentius L, Stoyanov SR, Gusarov S, Kovalenko A, Du R, Lopinski GP, et al. Diazonium-Derived Aryl Films on Gold Nanoparticles: Evidence for a Carbon–Gold Covalent Bond. *ACS Nano* 2011;5:4219–27. doi:10.1021/nn201110r.
- [73] Kariuki JK, McDermott MT. Formation of Multilayers on Glassy Carbon Electrodes via the Reduction of Diazonium Salts. *Langmuir* 2001;17:5947–51. doi:10.1021/la010415d.
- [74] Lehr J, Williamson BE, Flavel BS, Downard AJ. Reaction of Gold Substrates with Diazonium Salts in Acidic Solution at Open-Circuit Potential. *Langmuir* 2009;25:13503–9. doi:10.1021/la902002n.
- [75] Madoz J, Kuznetzov BA, Medrano FJ, Garcia L, Fernandez VM. Functionalization of Gold Surfaces for Specific and Reversible Attachment of a Fused β -Galactosidase and Choline-Receptor Protein 1997:9.
- [76] Eissa S, Zourob M. A graphene-based electrochemical competitive immunosensor for the sensitive detection of okadaic acid in shellfish. *Nanoscale* 2012;4:7593. doi:10.1039/c2nr32146g.
- [77] Radi A-E, Muñoz-Berbel X, Cortina-Puig M, Marty J-L. An electrochemical immunosensor for ochratoxin A based on immobilization of antibodies on diazonium-functionalized gold electrode. *Electrochimica Acta* 2009;54:2180–4. doi:10.1016/j.electacta.2008.10.013.
- [78] Chung B, Shin GW, Choi W, Joo J, Jeon S, Jung GY. Precise characterization method of antibody-conjugated magnetic nanoparticles for pathogen detection using stuffer-free multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* 2014;35:3283–9. doi:10.1002/elps.201400180.
- [79] Seymour E, Daaboul GG, Zhang X, Scherr SM, Ünlü NL, Connor JH, et al. DNA-Directed Antibody Immobilization for Enhanced Detection of Single Viral Pathogens. *Anal Chem* 2015;87:10505–12. doi:10.1021/acs.analchem.5b02702.
- [80] Karmali MA. Host and pathogen determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome. *Kidney International* 2009;75:S4–7. doi:10.1038/ki.2008.608.
- [81] Zelada-Guillén GA, Riu J, Düzgün A, Rius FX. Immediate detection of living bacteria at ultralow concentrations using a carbon nanotube based potentiometric aptasensor. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48:7334–7. doi:10.1002/anie.200902090.
- [82] Labib M, Zamay AS, Kolovskaya OS, Reshetneva IT, Zamay GS, Kibbee RJ, et al. Aptamer-based viability impedimetric sensor for bacteria. *Anal Chem* 2012;84:8966–9. doi:10.1021/ac302902s.

3 APPLICATION À NOTRE MICROSYSTÈME

Dans le cadre de mon travail de thèse, je me suis intéressée à l'étude et au développement d'un immunocapteur dans le domaine des sciences de l'environnement et de la santé. Cela consiste en la réalisation d'un microsystème pour la Nanomédecine, via la fonctionnalisation avec des matériaux performants en termes de détection, de sensibilité, sélectivité. Nous avons ciblé l'impact des maladies nosocomiales sur la santé publique et l'économie dans les pays industrialisés comme dans les pays émergents. Nous proposons une solution innovante et pertinente à ce problème pour l'appliquer à des zones géographiques en France comme en Algérie.

Ce projet consiste à fonctionnaliser des micro-surfaces par voie humide avec des matériaux ou biomatériaux d'intérêt pour la détection d'analytes dans le domaine de la Nanomédecine.

Dans ce projet l'accent est mis sur l'utilisation de matériaux conducteurs tels que les nanoparticules d'or et/ou les nanotubes de carbone et ou le graphène du fait des propriétés isolantes des anticorps immobilisés à la surface des électrodes. Les nanoparticules de carbone sont considérées depuis leur récente découverte comme des nano matériaux prometteurs. Cela est dû à leur nanostructure et leur surface spécifique élevée qui fournit des caractéristiques attrayantes pour la détection de molécules chimiques.

Les Microsystèmes jouent un rôle important dans des différentes applications biologiques et environnementales. L'intégration d'une interface électrique dans un tel system miniaturisé fournit de nouvelles opportunités pour la détection électrochimique. Une forte sélectivité et sensibilité par rapport à l'analyte sont exigées.

La modification de l'électrode de travail, présente un défi pour les microsystèmes compacts. Dans ce travail, nous démontrons l'avantage du dépôt électrophorétique (EPD) d'oxyde de graphène réduit / polyéthylèneimine (rGO / PEI) pour la modification sélective des

microélectrodes d'or dans un microsystème comprenant une électrode auxiliaire en Platine (Pt) et une électrode de référence en Argent et de chlorure d'argent Ag/AgCl. Le microsystème fonctionnalisé a été appliqué avec succès pour la détection sélective de la dopamine avec une limite de détection de 50 nM. En outre, le microsystème a montré de bonnes performances pour détecter les niveaux de dopamine dans les échantillons de viande.

3.1 Introduction

Le but de la présente étude est de vérifier si l'EPD est bien adapté pour la fonctionnalisation d'une microélectrode dans un microsystème. Pour atteindre ce but, nous avons d'abord optimisé les paramètres de la déposition électrophorétique de l'Oxyde de Graphène Réduit/Polyéthylèneimine (rGO/PEI) sur une électrode plane et le seuil de détection d'une telle modification pour la dopamine (DA). Puis, nous avons étudié l'EPD de rGO/PEI sur une microélectrode d'un microsystème. La morphologie de l'interface modifiée a été caractérisée par différentes techniques. La microélectrode d'or (électrode de travail) fonctionnalisée avec rGO/PEI présente une réponse électrochimique bien défini. Pour démontrer l'intérêt de ce microsystème pour les applications de détection, nous avons étudié la détection par électrochimie des différents niveaux de dopamine dans les échantillons de viande. Le résultat a été comparé à celui obtenu à l'aide de la spectrophotométrie UV-Vis, étant l'une des approches actuelles pour la détection de la dopamine.

3.2 Réalisation d'un capteur électrochimique

La conception des microélectrodes se base sur le système classique de trois électrodes (référence, auxiliaire et travail) avec une dimension de 14 mm x 6.3 mm. Pour la microfabrication en salle blanche nous avons utilisé la photolithographie par lift-off sur un substrat de verre ($500 \pm 25 \mu\text{m}$) (Figure 42). La photorésine Standard AZ5214 positive photoresist 5214 est déposée par spin-coating sur le substrat de verre (wafer) et exposée à la lumière UV à travers un masque photolithographique (Mask Aligner EVG 620).

Le principe de cette photolithographie consiste à pulvériser ou évaporer le métal sur des motifs de résine dont le flanc est l'inverse de celui traditionnellement obtenu en développement une résine positive, de manière à pouvoir dissoudre le polymère recouvert par le métal. C'est la technique du lift-off, mettant en œuvre une résine positive inversible. La résine positive inversible AZ 5214 traitée en inversion, donnant la polarité inverse de celle du masque, est largement utilisée pour des épaisseurs de films métalliques jusqu'à environ 500

nm. La résine non polymérisée est éliminée avec le révélateur spécifique AZ726. La pulvérisation (PLASSYS MP500, ALCATEL) est ensuite utilisée pour déposer une couche d'adhérence en titane (10 nm) suivie d'une couche de 200 nm d'or (électrode de travail) et de platine (contre-électrode et connecteurs). Pour la fabrication de l'électrode de référence, l'évaporation par faisceau d'électrons (EVA450, concept Alliance) est utilisée pour déposer une couche d'adhérence en titane (10 nm) suivie d'une couche d'argent de 200 nm (électrode de référence). En éliminant par la suite toute la résine photosensible (décollement) après chaque dépôt, les couches métalliques sont laissées dans les positions souhaitées sur le verre. L'oxyde de silicium est ensuite déposé sur le dispositif par un dépôt chimique en phase vapeur par plasma couplé par induction (ICPECVD, SENTECH, Instruments GmbH) pour permettre la déposition d'une gouttelette d'analyte sur le microsystème pour analyse. Afin d'assurer une couche de protection plus étanche, la résine photosensible SU8 (SU-8 2000, Microchem, Newton, MA) a été en outre déposée par spin-coating et polymérisée à l'aide d'un masque photolithographique (Deltamask, Pays-Bas), suivi par la dissolution du polymère non polymérisé avec le révélateur Microchem SU-8.

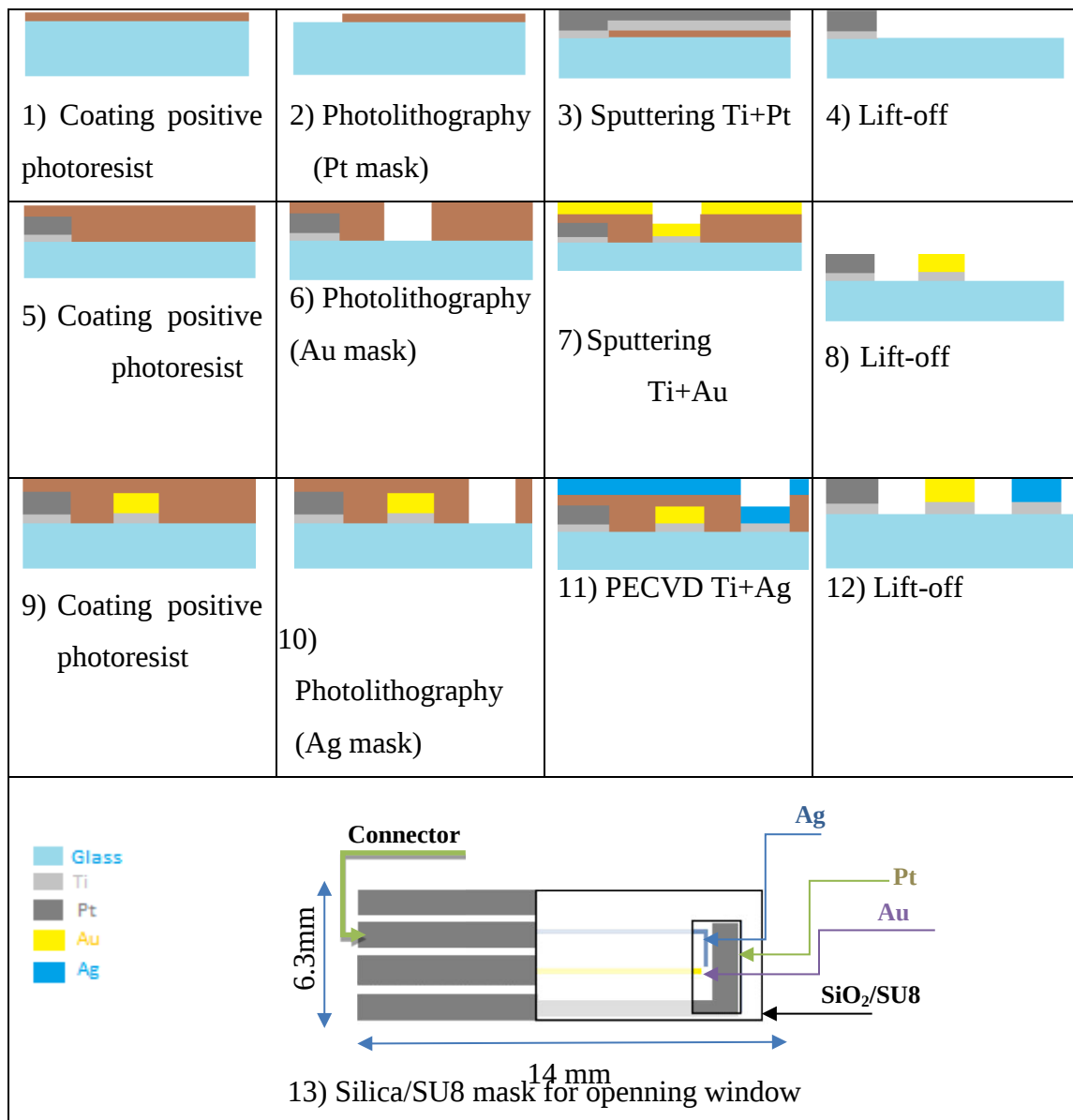


Figure : processus des étapes de fabrication des microsystèmes, lift-off pour le dépôt des métaux des électrodes et des connecteurs (étapes 1 à 12). Enfin, une fenêtre sur les électrodes est réalisée par étape SiO_2 (lift-off) ou SU8 (photolithographie) (13).

3.2.1 Procédé de la photolithographie par lift off

Le lift-off est la technique de microfabrication directement dérivée de la technologie du circuit intégré. Comme dans cette dernière, il s'agit de superposer des couches dont la géométrie est obtenue par photolithographie. Par rapport aux techniques de fabrication des circuits intégrés, la clé est l'utilisation de certaines couches comme " couches sacrificielles " destinées à être éliminées en fin de procédé afin de libérer les motifs désirés. A côté de la gravure humide ou sèche, le décollement ou lift off est une technique courante pour transférer

des motifs sur des films métalliques ou diélectriques à l'échelle micrométrique ou submicrométrique. Les principaux critères pour le choix d'une résine photosensible la mieux adaptée sont :

- L'épaisseur du matériau a déposé
- La technologie de revêtement (évaporation, pulvérisation cathodique, CVD, ...) et la température maximale
- La résolution requise
- La disposition du photomasque chargé positivement ou négativement
- La durée et l'intensité de la longueur d'onde lors de l'exposition

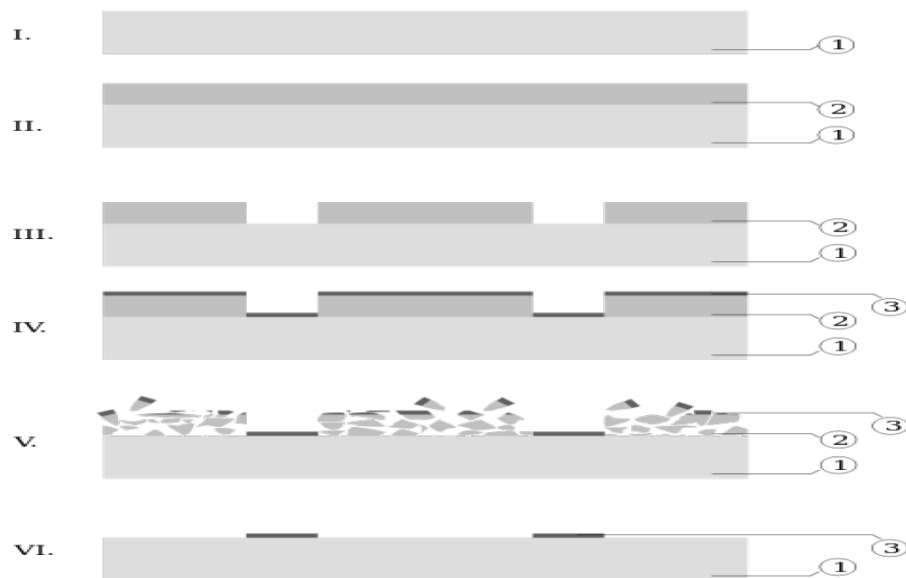


Figure 42 : étapes du processus de lift off, I. Préparation du substrat; II. Dépôt de la couche de pochoir sacrificiel ; III. Modélisation de la couche sacrificielle (ex: gravure), création d'un motif inverse ; IV. Dépôt du matériau cible ; V. Laver la couche sacrificielle avec le matériau cible sur sa surface ; VI. Couches de motif final ; 1) Substrat ; 2) Couche sacrificielle 3) le motif désiré (6)

Le lift-off consiste à former une image inverse du motif désiré sur la plaquette en utilisant une couche sacrificielle qui recouvre certaines zones sur la plaquette et expose le reste. La couche à « paterner » est ensuite déposée sur la plaquette. Dans les zones exposées du motif, le matériau de la couche se dépose directement sur le substrat de la plaquette, tandis que dans les zones couvertes, le matériau se dépose sur le dessus du film pochoir.

Une fois le matériau de la couche déposé, la plaquette est immergée dans un liquide qui peut dissoudre la couche sacrificielle. Après dissolution, le matériau de la couche est enlevé (d'où le terme «décollement»), laissant derrière le matériau de la couche qui a été déposé sur le substrat de la plaquette, qui forme le motif final.

3.2.2 Comparaison entre le procédé lift off et le procédé de gravure

Une couche de résine photosensible est souvent utilisée comme masque temporaire lors de la gravure d'une couche sous-jacente, de sorte que le motif peut être transféré à cette couche. La photorésine peut également être utilisée comme motif pour le matériau de structuration déposé après la lithographie (Figure 43). La résine photosensible est ensuite éliminée par attaque chimique ou par sonication (bain ultrasons) dans l'acétone et le matériau déposé sur le photosensible est "enlevé".

L'approche de (lift off) pour transférer un motif de la couche photosensible à une autre couche est moins courante que d'utiliser de motif de photosensible comme masque de gravure. La raison est que la résine photosensible est incompatible avec la plupart des processus de dépôt de MEMS. La raison est qu'elle ne peut pas résister à des températures élevées et peut agir comme une source de contamination [1].

3.3 Caractérisation électrochimique

Le microsystème électrochimique, basé sur le système classique de trois électrodes (électrodes de référence, de compteur et de travail) (Figure 44A) est validé par la caractérisation électrochimique. Une voltammétrie cyclique dans une solution contenant un médiateur redox connu permet de déterminer, à partir du courant stationnaire, la taille réelle de la microélectrode en utilisant l'équation (3.1). La Figure 44B montre la réponse électrochimique de la microélectrode d'or dans le microsystème en utilisant $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ comme une solution d'espèces redox.

La surface active de l'électrode de travail d'or a été déterminée à $4080 \mu\text{m}^2$ avec une largeur de bande de $6 \mu\text{m}$ et une longueur de $680 \mu\text{m}$. Le courant d'oxydation atteint un courant stationnaire pour une configuration de microélectrode due à la couche de diffusion étant en forme hémisphérique. La caractéristique des électrodes de bande est que la couche de diffusion se développe à partir d'un plan parallèle à la surface de l'électrode.

La distribution de densité de courant est non uniforme et débute aux bords de l'électrode. Dans ces conditions, le courant permanent est approximativement donné par:

$$i_{ss} = 2\pi n F c D b \left\{ \frac{1}{\ln \theta + 3} - \frac{0.577}{(\ln \theta + 3)^2} - \frac{1.313}{(\ln \theta + 3)^3} - \dots \right\} \approx 2\pi n F c D b \quad (3.2)$$

où i_{ss} est le courant permanent, n est le nombre d'électrons dans la réaction, F est la constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), D est le coefficient de la diffusion de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($D = 5,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), c est la concentration de la solution de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM), b est la longueur d'électrode (680 μm) et $\Theta = Dt/w^2$, avec w est la largeur de l'électrode (6 μm). L'électrode de bande montre un courant d'état d'équilibre de 25 nA, qui est en accord avec un courant stable prévu de ce microsysteme.

La voltammétrie cyclique (CV) et la voltampérométrie impulsionnelle différentielle (DPV) ont été réalisées à l'aide d'un potentiostat Autolab 30 (Eco-Chemie, Utrecht, Les Pays-Bas).

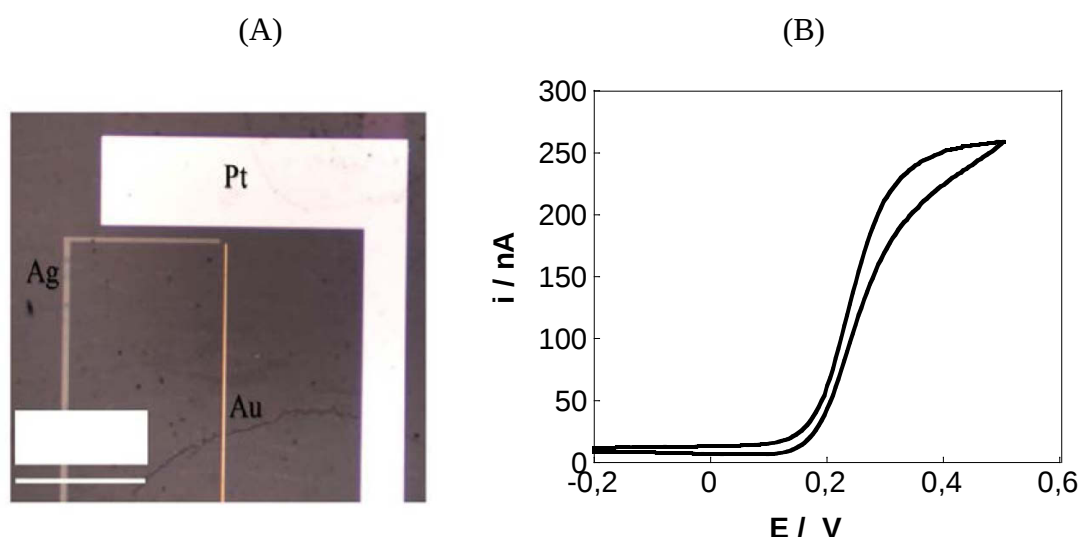


Figure 43: (A) image optique zoomée sur la configuration du microsysteme à trois électrodes; (B) CV du microsysteme dans $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM) / PBS (10 mM); vitesse de balayage: 50 mVs^{-1} .

Afin de valider le microsysteme, des tests électrochimiques comme la voltammétrie cyclique (CV), voltampérométrie d'impulsions différentielles (DPV) et d'impédance électrochimique (Electrochemical Impedance Spectroscopy – EIS)

Ces procédés concernent des réactions électrochimiques au sens large, c'est-à-dire qui mettent en jeu un transfert d'électrons, soit hétérogène, soit homogène. Le point commun de ces méthodes est la production d'espèces radicalaires à partir du transfert d'électrons, espèces qui vont ensuite réagir pour former une liaison avec la surface. Les processus peuvent s'effectuer, soit par voie oxydante, soit par voie réductrice.

L'objectif de toute méthode d'immobilisation est de retenir l'activité maximale du ligand biologique sur la surface du transducteur. La sélection d'une méthode d'immobilisation appropriée dépend de la nature du ligand biologique, du type de transducteur utilisé, des propriétés physico-chimiques de l'analyte et des conditions opératoires du biocapteur.

Aussi, nous avons validé un protocole de nettoyage afin de préparer les électrodes pour la détection. Ce protocole a pour objectif de maintenir un signal stable lors des mesures électrochimiques (Figure 45).

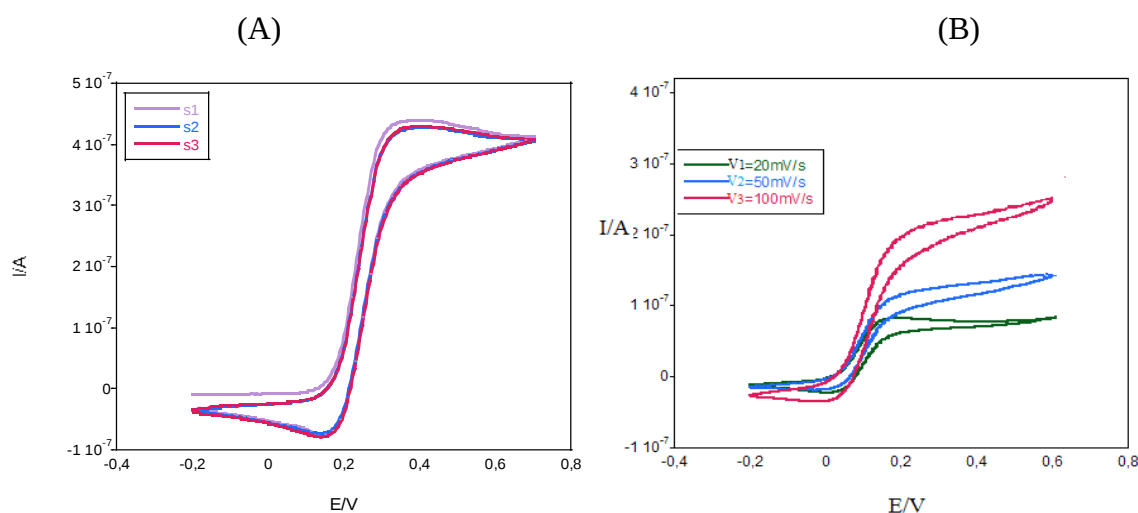


Figure 44 : CV d'une microélectrode d'un microsystème dans une solution d'hexacyanoferrate (II) de potassium $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM) / PBS (10 mM), vitesse de scan 50mVs^{-1} . (A) trois scan (S1, S2, S3) (B) à des différents vitesses de scan $V_1 = 0.02\text{ v.s}^{-1}$, $V_2 = 0.05\text{ v.s}^{-1}$, $V_3 = 0.1\text{ v.s}^{-1}$

3.4 La fonctionnalisation chimique

Après réalisation et validation du microsystème par des tests électrochimiques (Figure 45), nous avons procédé à la mise au point d'un protocole de fonctionnalisation du microsystème par différentes méthodes. En effet, à partir du microsystème développé, il est possible de réaliser un système de capteurs génériques pour la détection d'analytes à l'état liquide et les adapter à différentes problématiques.

Le microsystème est placé dans un connecteur C) qui sera connecté à un potentiostat pour effectuer des mesures électrochimiques. Ensuite, la surface de l'électrode de travail est simplement mise au contact d'une solution contenant des molécules possédant une fonction terminale capable de réagir spontanément et très spécifiquement avec la surface.

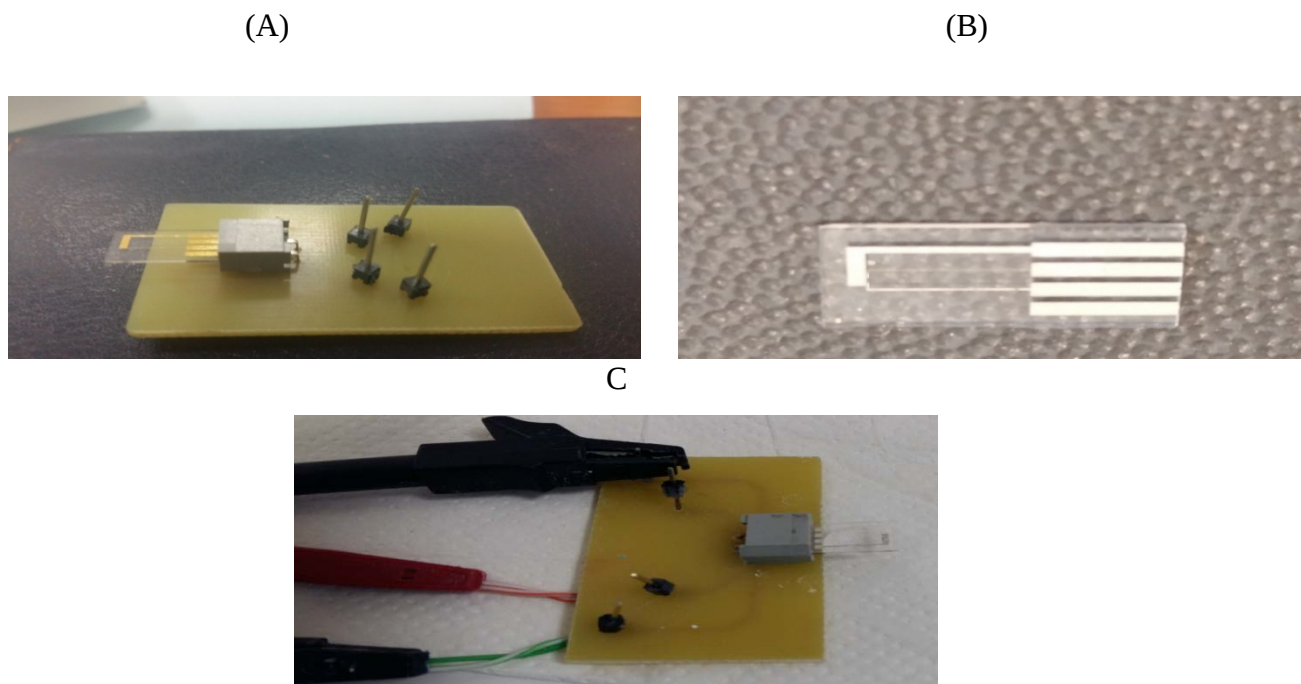


Figure 45 : prototype de (A) la première et (B) la deuxième version produit fini après le découpage, (C) la connexion du microsystème au potentiostat

Le protocole de fonctionnalisation des microélectrodes se compose de plusieurs étapes. L'oxyde de graphène a été sélectionné comme une plateforme de base pour la fonctionnalisation. Ce choix repose sur les nombreux travaux qui ont prouvé son efficacité pour la détection ainsi que son faible coût.

3.4.1 Synthèse de l'oxyde de graphène (GO)

3.4.1.1 Mode opératoire

L'oxyde de graphène est synthétisé par la méthode « Hummers » [2–6] qui consiste à ajouter 69 mL de H_2SO_4 concentré à un mélange de paillettes de graphite (3,0 g, 1% en poids) et NaNO_3 (1,5 g, 0,5% en poids). Ensuite, le mélange est refroidi à 0°C . 9,0 g, 3% massique du KMnO_4 sont ajoutés lentement en portions pour maintenir la température de réaction inférieure à 20°C . La réaction est réchauffée à 35°C et agitée pendant 30 min puis 138 mL d'eau sont ajoutés lentement, ce qui donne une exothermie à 98°C . La solution est chauffée pour maintenir la température de réaction à 98°C pendant 15 minutes, puis refroidie en utilisant un bain d'eau pendant 10 min. L'ajout de 420 mL d'eau et 3 mL 30% de H_2O_2 entraînent une autre exothermie. Après refroidissement à l'air, le mélange est purifié par

centrifugation et décantation, puis séchage sous vide pour donner 1,2 g d'oxyde de graphène solide.

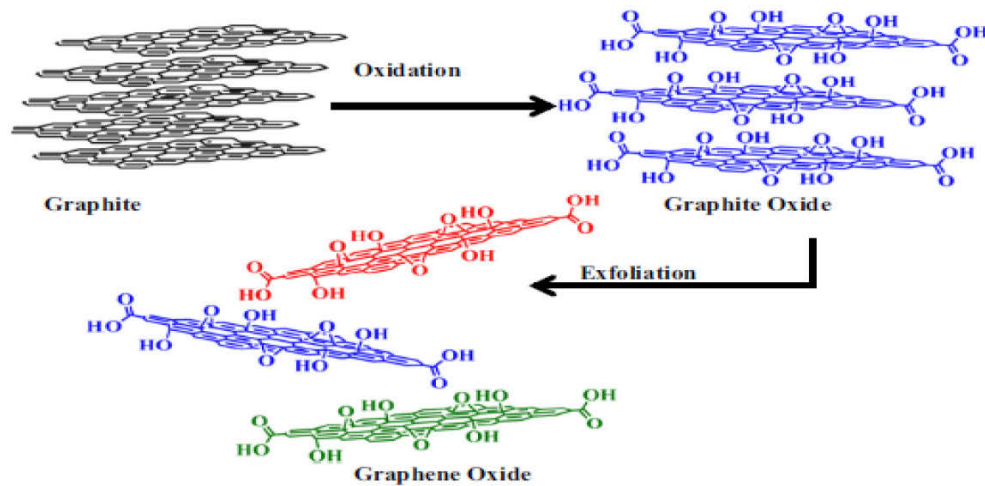


Figure 46 : les trois étapes de préparation de l'oxyde de graphène GO à partir de graphite [7]
[adapté de Garg et al. (2014)].

a. Le potentiel zêta

Avant de commencer l'électrodéposition il faut avoir une idée sur la charge de la solution. Le potentiel zêta est un bon indicateur des interactions entre particules et donc de la stabilité des colloïdes tels que les émulsions (selon la théorie DLVO développée par Derjaguin, Verwey, Landau et Overbeek en 1940 qui propose que la stabilité des particules en suspension dépend d'un potentiel d'interaction total). La mesure du potentiel zêta permet donc de prévoir le comportement par rapport aux charges qui peut être positif (cationique) ou négatif (anionique). Il nous permet de mesurer l'intensité de la répulsion ou de l'attraction électrostatique ou électrique entre particules. C'est l'un des paramètres fondamentaux connus pour affecter la stabilité. La mesure apporte une vision détaillée des causes de dispersion, d'agréation ou de floculation et peut être appliquée pour améliorer la formulation de dispersions, d'émulsions ou de suspensions (Figure 48).

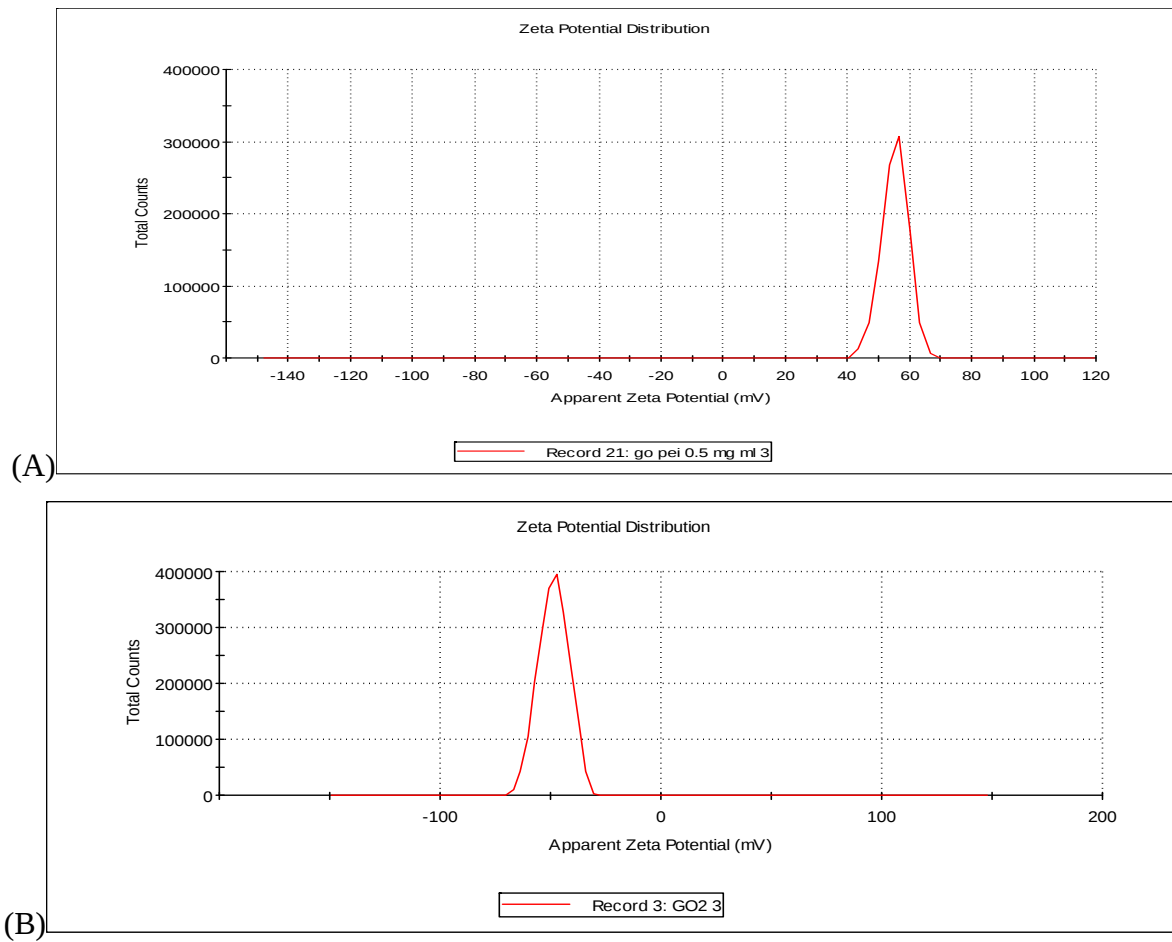


Figure 47 : la mesure du potentiel zêta des solutions utilisées dans la déposition électrophorétique (A) GO/PEI (1 :1) : 54.7 mV, (B) GO : -47mV

b. Mesures de potentiel zêta

Les propriétés de surface des échantillons préparés ont été caractérisées par la mesure du potentiel zêta à l'aide d'un Zeta-sizer Nano-ZS (Malvern Instruments Inc. Worcestershire, ROYAUME-UNI). Les mesures ont été effectuées dans de l'eau Milli-Q (pH 7,0) avec un échantillon de concentration $25 \mu\text{g mL}^{-1}$

3.4.2 Dépôt électrophorétique de rGO / PEI sur une microélectrode Au d'un microsysteme

Une solution aqueuse GO / PEI a été obtenue en mélangeant GO ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) et PEI ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) dans un rapport volumique de 1/1 tout en agitant pendant 48 h à température ambiante.

Le dépôt électrophorétique (EPD) sur des substrats en verre revêtus d'or préparés par évaporation thermique de 5 nm de titane (couche d'accroche) et de 50 nm d'or sur des lames

de verre nettoyées ($76 \times 26 \times 1 \text{ mm}^3$, CML France). L'EPD a été réalisée dans une cellule à deux électrodes où les deux électrodes sont placées parallèlement l'une à l'autre et sont séparées d'une distance de 1 cm. Une feuille de platine ($1 \times 2 \text{ cm}^2$) agit comme l'anode et le substrat verre / Ti / Au comme cathode. Le dépôt électrophorétique (EPD) de rGO / PEI (1 mg / mL) se fait en appliquant une tension continue (15 V) pendant 2 min. Après dépôt, l'interface est rincée avec de l'eau Milli-Q et séchée à l'air.

Nous avons utilisé un générateur (MS major science Mini-300) pour fonctionnaliser l'électrode de travail (Au) par électrophorèse avec une solution d'oxyde de graphène (GO) qui sera réduit à la surface de l'électrode / rGO (Figure 49).

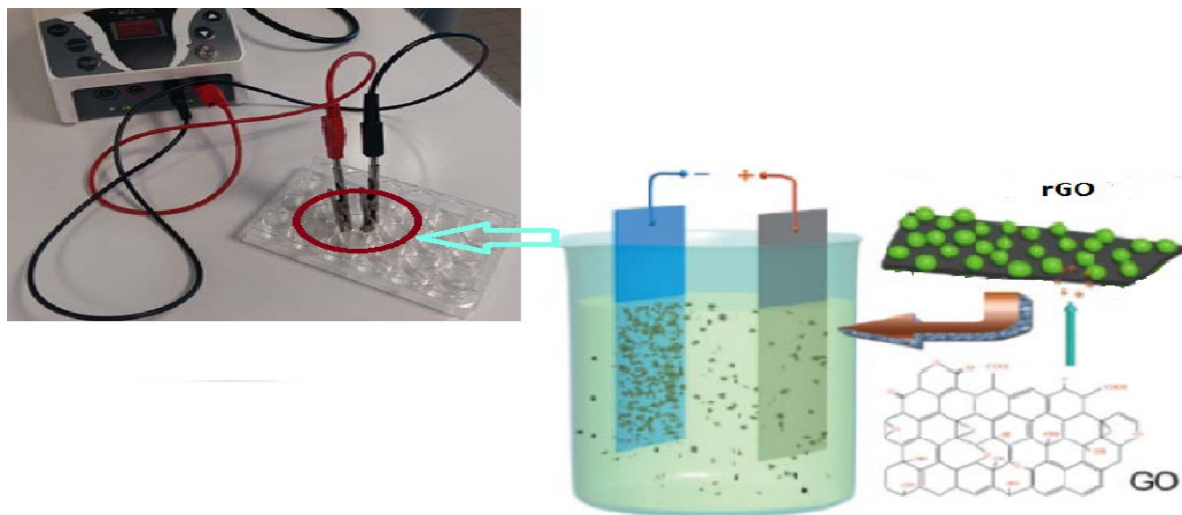


Figure 48 : dépôt du Graphène oxyde par électrophorèse par un générateur (Réf MS major science Mini-300)

La Figure 50 montre bien l'effet de la fonctionnalisation de l'or par l'oxyde graphène sur l'amplification du signal et par conséquent le transfert des électrons.

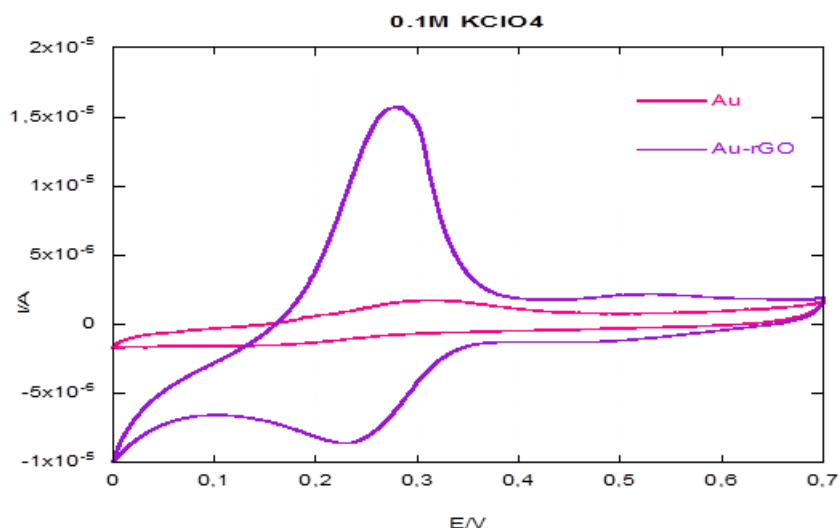


Figure 49: étude de la voltamétrie cyclique (CV) du rGO (1mg/mL) sur une électrode d'Or (50nm Au+10nm Ti) à une vitesse de scan $V = 0.05\text{v.s}^{-1}$ dans une solution de 0,1M de HClO₄

Nous avons effectué une étude électrochimique pour optimiser les paramètres du dépôt de l'oxyde de graphène sur les électrodes d'or qui se base sur la variation du temps la tension appliqués . La Figure 51 A et B représente respectivement quelques courbes de l'effet de la variation de la tension et le temps de dépôt sur l'amplification du signal. Nous avons donc trouvé que les valeurs optimales pour l'EDP sont 2 min pour une tension de 15 V.

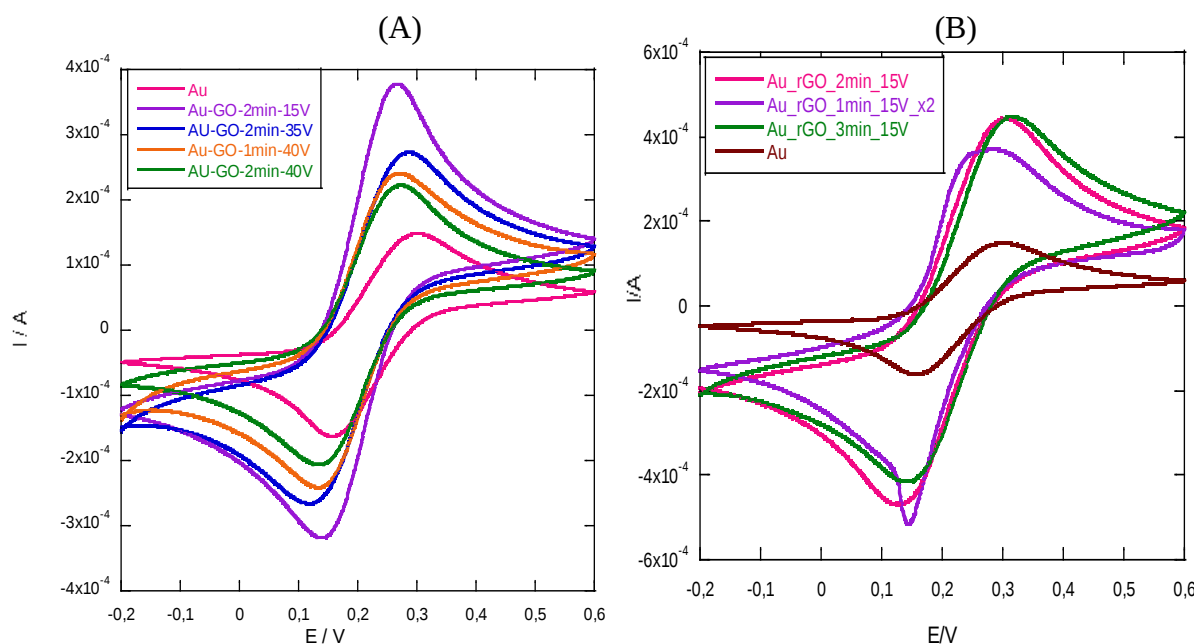


Figure 50 : optimisation des paramètres de EDP par la voltamétrie cyclique (CV) du rGO (0.5mg/mL) sur une électrode d'or (50nm Au+10nm Ti) à une vitesse de scan $v = 0.05\text{V.s}^{-1}$ dans une solution de 5mM de $\text{K}_4\text{Fe(CN)}_6/\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ 0.1mM KCl

3.5 Résultats et discussions

3.5.1 Dépôt électrophorétique de rGO/PEI

Nous avons récemment démontré que des films rGO d'épaisseur nanométrique peuvent être formés sur des interfaces d'or en utilisant le dépôt électrophorétique anodique (EPD) [8–10]. Les suspensions aqueuses de GO ont un potentiel zêta négatif de $\zeta = -38,3 \pm 2 \text{ mV}$, et les plaquettes GO migrent vers l'anode lors de l'application d'une tension continue. Cependant, pour obtenir un meilleur degré de réduction de GO à rGO, le dépôt EPD cathodique serait plus adapté. Ceci peut être réalisé en chargeant GO avec des ions métalliques tels que les ions Ni^{2+} [9] ou Cu^{2+} [8,11]. La présence d'ions métalliques conduit en outre au dépôt de nanoparticules catalytiques sur les nanofeuillets rGO qui pourraient ne pas être destinés à certaines applications. L'interaction d'un polymère cationique avec des groupes aminés répétés tels que la polyéthylèneimine (PEI) conduira également à une matrice GO / PEI chargée positivement. En effet, une solution aqueuse de quantités égales de GO et de PEI dérivées chimiquement, GO / PEI = 1, donne des nanofeuillets GO / PEI avec $\zeta = +40,3 \pm 2$

mV. Dans ces conditions, il est possible d'effectuer une EPD cathodique et obtenir une réduction GO efficace (Figure 52).

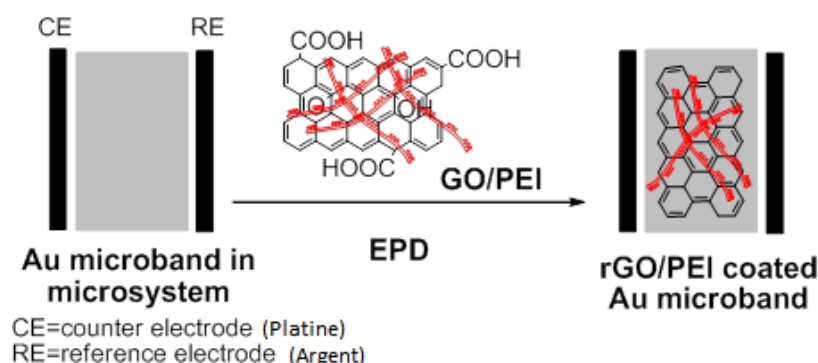


Figure 51 : revêtement électrophorétique sélectif de l'électrode microbande Au avec rGO/PEI

Nous avons donc procédé à une investigation pour voir l'influence d'une plateforme négative (rGO) et positive (rGO/PEI) sur l'évolution de l'amplification du signal. Ces derniers sont préparés à leur tour par EPD avec le même procédé EDP utilisé auparavant. La Figure 53A montre clairement que le signal est nettement plus grand avec une interface de rGO/PEI. Ce résultat nous a permis d'opter pour ce dernier dans une solution redox chargée négativement avec du $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, vu que l'utilisation d'une solution chargée positivement avec du $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ n'a pas donné un signal représentatif (Figure 53B).

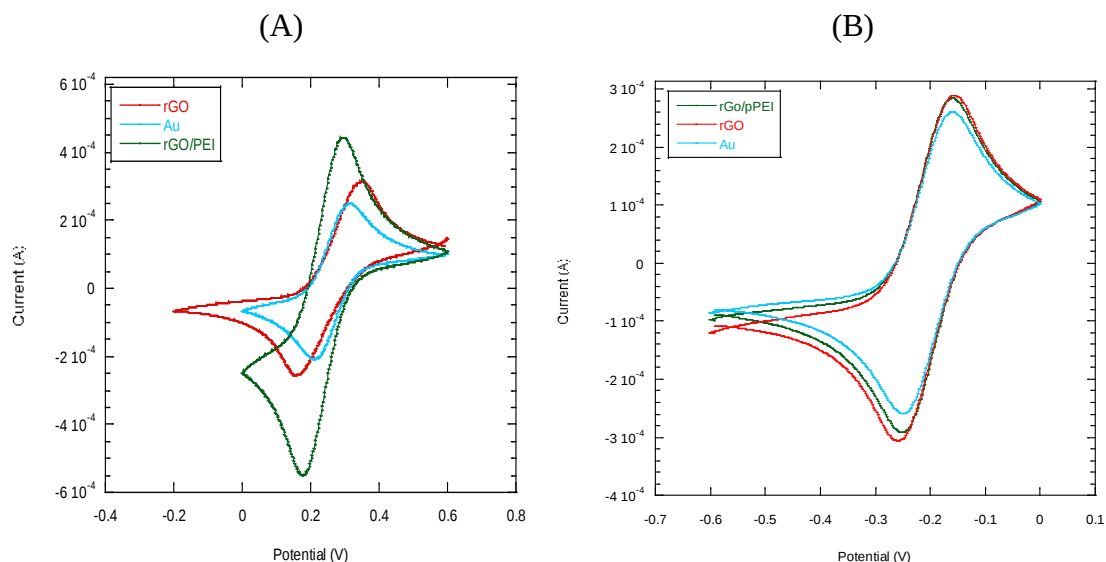


Figure 52 : CV d'une macroélectrode fonctionnalisée avec le rGO et une autre avec le rGO/PEI dans (A) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM) / PBS (10 mM), (B) $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (10 mM)/PBS (0.1 M); vitesse de scan 50mVs^{-1} .

Par la suite nous avons transposé les paramètres de la méthode EDP ainsi que la CV sur notre microsystème. La Figure 54 montre clairement que le temps de dépôt est optimal en appliquant une tension continue (15 V) pendant 2 min, suivi par un rinçage à l'eau Milli-Q et séchée à l'air. La même opération avec les mêmes paramètres donne une amplification optimale du signal.

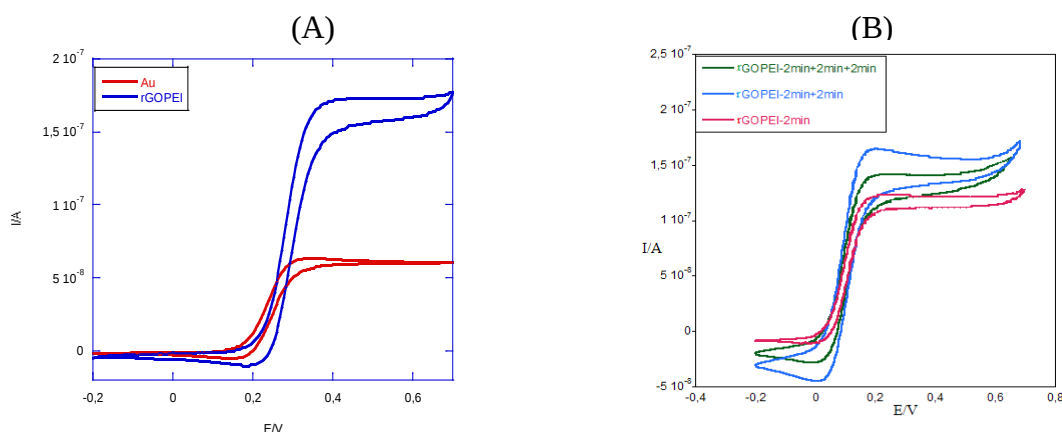


Figure 53 : optimisation du temps de dépôt du GO / PEI (1 mg / mL) en appliquant une tension continue (15 V) par la voltamétrie cyclique (CV) sur une microélectrode d'Or (50nm Au+10nm Ti) à une vitesse de scan $v = 0.05 \text{ V.s}^{-1}$ dans une solution de 5mM de $\text{K}_4\text{Fe(CN)}_6/\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ 0.1mM KCl

Les propriétés électrochimiques de l'électrode d'or fonctionnalisée ont été évalués en utilisant différents couples redox. Une comparaison de réponse électrochimique de la microbande d'or revêtue de rGO / PEI par rapport à l'électrode vierge montre clairement une augmentation du courant d'oxydation lorsque Fe(CN)_6^{4-} est utilisé comme un couple redox (A) par rapport au comportement observé en utilisant une solution redox $[\text{Ru(NH}_3)_6]^{3+}$ (B) Cela pourrait être dû à l'attraction électrostatique entre la sonde redox chargée négativement et la matrice rGO / PEI chargée positivement. En revanche, en utilisant une solution redox chargée positivement, $[\text{Ru(NH}_3)_6]^{3+}$, la réponse électrochimique n'est pas affectée par le revêtement rGO / PEI. Ceci est dû à la répulsion électrostatique entre la surface de rGO / PEI chargée positivement et le couple redox. Ce résultat concorde parfaitement avec celui trouvé avec les électrodes testés précédemment.

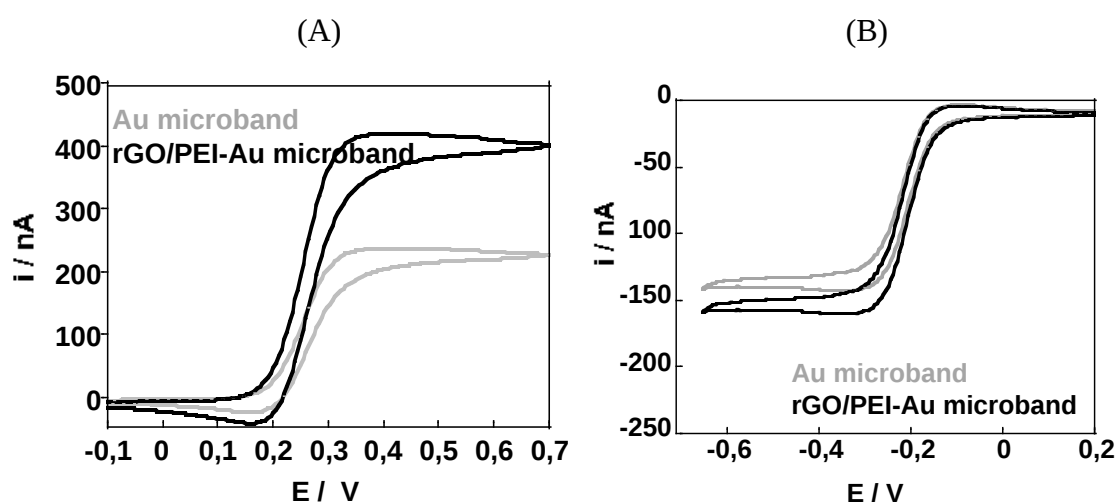


Figure 54 : CV de l'électrode microbande d'or dans (A) $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (10 mM) / PBS (10 mM), (B) $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ (10 mM)/PBS (0.1 M); vitesse de scan 50mVs^{-1} .

La Figure 56 montre les images MEB d'une partie de l'électrode microbande d'or dans le microsystème avant et après revêtement avec rGO / PEI par l'application d'une tension continue de 15 V pendant 2 min. Alors que la microélectrode d'or non enrobée montre une morphologie lisse, l'électrode enrobée par rGO / PEI montre clairement la présence d'une fine couche par la présence d'une surface rugueuse. L'épaisseur de la couche déposée était d'environ 2 nm, comme déterminé par les mesures de profilométrie. Il est important de remarquer que le dépôt électrophorétique est très localisé et la dimension globale 2D telles que la largeur et la longueur de l'électrode ne sont pas modifiées.

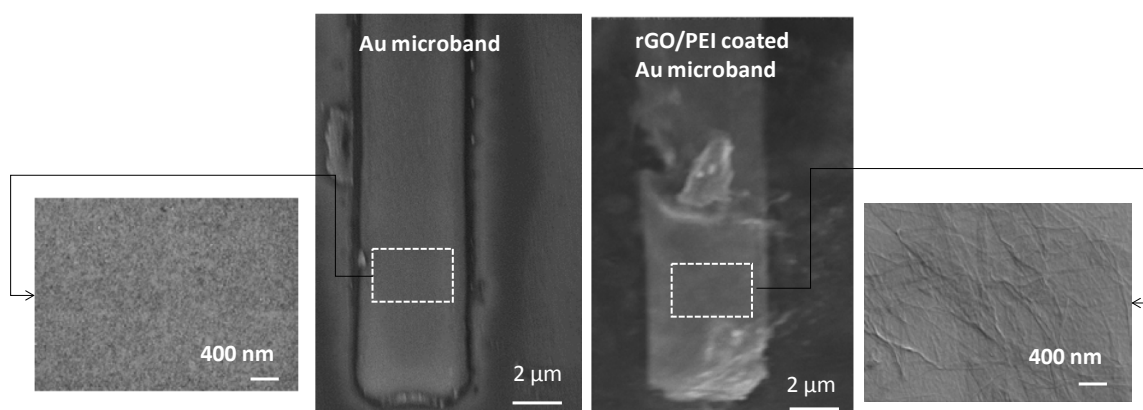


Figure 55 : revêtement électrophorétique sélectif de l'électrode microbande Au avec rGO / PEI

La spectroscopie FT-IR a été utilisée pour obtenir plus d'informations sur la composition chimique du composite rGO / PEI sur la microbande. La Figure 57A représente les spectres FTIR de transmission de rGO / PEI déposés par électrophorèse ainsi que les spectres de GO, rGO et PEI. GO comprend plusieurs bandes à 3330, 1739, 1618, 1227 et 1050 cm^{-1} . Le pic à 3330 cm^{-1} est attribué à la vibration d'étirement des groupes hydroxyle (-OH) en surface et / ou de l'eau adsorbée. Les pics à 1739, 1618, 1227 et 1050 cm^{-1} sont attribués au mode d'étirement C=O des groupes COOH situés sur les bords des feuilles de GO et la vibration de réseau du graphite non oxydé et l'étirement des vibrations des groupes contenant de l'oxygène (époxy et hydroxyle des groupes fonctionnels C-O), respectivement. Le spectre FTIR de PEI est constitué de pics caractéristiques à 3283 cm^{-1} (élongation N-H), 2939-2818 cm^{-1} (élongation C-H), 1580 cm^{-1} (liaison N-H), 1460 cm^{-1} (liaison C-H), 1301-1050 (élongation C-N) et 771 cm^{-1} (vibration N-H). La seule bande de vibration visible sur le spectre est celle due à Csp^2 (réseau graphénique) à 1562 cm^{-1} , indiquant une réduction efficace de GO. Le spectre FTIR de rGO / PEI comprend les bandes caractéristiques de PEI à 3395, 2967-2855, 1515, 1097 cm^{-1} avec le mode d'étirement rGO (Csp^2) à 1617 cm^{-1} , confirmant le dépôt réussi du matériau composite rGO / PEI film avec la réduction GO concomitante au cours du processus EPD.

La Figure 57C montre des spectres Raman représentatifs d'une modification de la microélectrode de rGO / PEI d'or enregistré sur la partie extrême et sur la longueur de la microélectrode. Les spectres affichent les principales caractéristiques du graphène avec une bande D à 1350 cm^{-1} et une bande G à 1582 cm^{-1} avec ratio d'intensité I_D / I_G de 0,89 pour rGO / PEI, plus élevé que celui de GO avec $I_D/I_G = 0,71$ [9]. En outre, le spectre Raman enregistré à l'extérieur de la microélectrode d'or modifiée rGO / PEI ne montre aucun signal Raman dû à rGO. Cela indique que le processus de dépôt est très sélectif et adapté à la fonctionnalisation spécifique des microsystèmes.

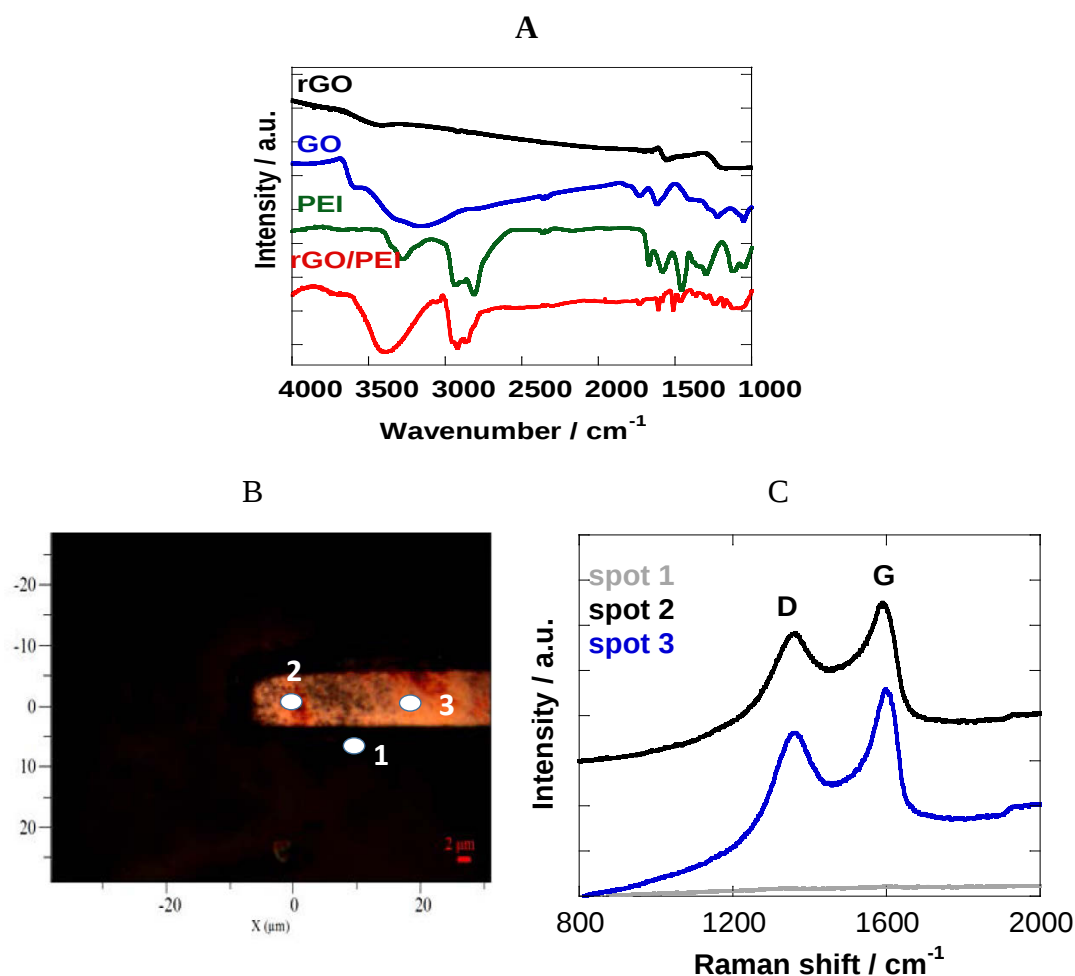


Figure 56 : (A) spectre de transmission FTIR de GO (bleu), rGO (noir), PEI (vert) et rGO/PEI (rouge); (B gauche) image photographique et (B droite) des spectres Raman correspondants aux trois zones différentes du microsystème (point 1, sur le substrat en verre, spots 2 et 3 sur la microbande d'or modifié par rGO / PEI).

3.5.2 La Détection de la Dopamine

Les capteurs électrochimiques représentent un concept éprouvé commercialement, capable de fournir une détection sensible, miniaturisée et rentable des analytes pertinents, même *in vivo* [12]. Au cours des dernières décennies, plusieurs concepts de détection basés sur l'électrochimie et des dispositifs associés ont été développés [12–14]. Cependant, en utilisant des matériaux d'électrode classiques, les problèmes de sensibilité et de sélectivité ont montré qu'ils limitaient leur utilisation pour des applications réelles.

Le but de la présente étude est de vérifier si l'EPD est bien adaptée à la fonctionnalisation d'une microélectrode dans un microsystème. Pour atteindre ce but, nous avons d'abord optimisé les paramètres de la déposition électrophorétique de l'oxyde de graphène réduit/polyéthylèneimine (rGO/PEI) sur une électrode plane ainsi que le seuil de

détection d'une telle modification pour la dopamine (DA). Puis, nous avons étudié l'EPD de rGO/PEI sur une microélectrode du microsystème que nous avons développé. La morphologie de l'interface modifiée a été caractérisée par différentes techniques. La microélectrode d'or (électrode de travail) fonctionnalisée avec rGO/PEI présente une réponse électrochimique bien définie. Pour démontrer l'intérêt de ce microsystème pour les applications de détection, nous avons étudié la détection par électrochimie des différents niveaux de dopamine dans les échantillons de viande. Le résultat a été comparé à celui obtenu à l'aide de la spectrophotométrie UV-Vis, étant l'une des approches actuelles pour la détection de la dopamine.

3.5.2.1 Les différentes techniques de mesures de la dopamine

La dopamine est un neuromédiateur bien connu mais qui possède une activité électrochimique intéressante pour tester notre microsystème. Elle est présente dans des concentrations nanomolaires à micromolaires (10 nM à 1 μ M) dans le liquide extracellulaire du système nerveux [15]. Elle a par ailleurs été très étudiée par d'autres méthodes ce qui sert de référence, comme la détection optique de la dopamine, comprend la colorimétrie, la fluorométrie, spectroscopie Raman à surface améliorée (SERS) [16], et électrochimiluminescence (ECL) [17] [18], la résonance plasmonique (SPR) [19], détection thermométrique [20]. En raison de l'importance physiologique de la dopamine, sa concentration a été mesurée régulièrement par les chercheurs médicaux en utilisant la chromatographie conventionnelle, électrophorèse capillaire, dosage enzymatique rapide par chromatographie liquide et spectrométrie de masse [21,22].

Cependant, la plupart de ces méthodes sont chronophages ; exigent des processus de prétraitement sophistiqués, instruments coûteux, et expertise pour l'opération ; et interférence de fond et faible reproductibilité. D'autres méthodes comme la fluorométrie, la colorimétrie, la spectrophotométrie, chimiluminescence, et l'électrochimie utilisent les propriétés exceptionnelles des nanomatériaux pour la détection [18,22–25]. Les nanomatériaux ont montré leur intérêt comme composants de détection en raison de leurs propriétés physiques et chimiques uniques. Ils ont été largement exploités dans des capteurs biologiques [26–28] [29].

3.5.2.2 Détection électrochimique de la dopamine

Les techniques électrochimiques se sont révélées prometteuses pour l'analyse des neurotransmetteurs en général, par rapport aux techniques fluorométriques,

radioenzyamiques, chromatographiques, spectrophotométriques et chimioluminescentes [16–18,29], puisqu'elles offraient une mesure directe des analytes. Les techniques non électrochimiques impliquent le prélèvement d'échantillons sur le sujet, suivi d'une séparation rigoureuse, d'un conditionnement et d'autres formes de prétraitement des échantillons avant l'analyse. Les autres avantages des méthodes électrochimiques comprennent une sélectivité élevée, une bonne sensibilité et des limites de détection très faibles, en particulier pour les microélectrodes. Cependant, les premiers efforts pour détecter la DA à l'aide d'électrodes métalliques ont rencontré plusieurs problèmes sérieux. Premièrement, la dopamine peut être électropolymérisée, conduisant à l'encrassement des électrodes et à la dégradation de la réponse. Deuxièmement, la dopamine est couramment trouvée en conjonction avec d'autres matériaux, y compris ses métabolites oxydables communs, et ceux-ci génèrent des interférences substantielles, tout comme l'acide ascorbique omniprésent (AA). Le troisième problème est que les concentrations physiologiques de dopamine sont très faibles, nécessitant une sélectivité et une sensibilité très élevées. Dans le liquide extracellulaire du système nerveux central, DA varie de 0,01 à 1 μM par rapport à 100-500 μM d'AA. DA et AA présentent également des plages de potentiel redox presque identiques et des sensibilités comparables. Ainsi, il n'a pas été possible de détecter sélectivement la DA sur des électrodes nues conventionnelles. D'autre part, les électrodes modifiées peuvent offrir une sélectivité, une sensibilité, une efficacité temporelle et une stabilité plus élevée. Par conséquent, plusieurs matériaux modificateurs tels que les nanotubes de carbone, les polymères, les nanoparticules-polymères, les oxydes métalliques, colorant (film polymère bleu Evans), le graphène, le nafion, le bore comme dopant ont été utilisés pour surmonter ce problème [30].

Le principe de détection voltampérométrique de la dopamine repose sur l'application d'un potentiel suffisant sur l'électrode. La dopamine est oxydée en dopamine-o-quinone, donnant deux électrons qui sont détectés comme courant. Lors du balayage retour, la dopamine-o-quinone restant à la surface de l'électrode est réduite à la dopamine en acceptant des électrons, produisant du courant dans la direction opposée.

3.5.3 La biodétection de la dopamine par notre microsystème

La modification de l'électrode de travail présente un défi pour les microsystèmes compacts. Dans ce travail, nous démontrons l'avantage du dépôt électrophorétique (EPD) d'oxyde de graphène réduit / Polyéthylèneimine (rGO / PEI) pour la modification sélective des microélectrodes d'or dans un microsystème comprenant une électrode auxiliaire en platine (Pt) et une électrode de référence en argent et en chlorure d'argent Ag/AgCl. Le microsystème

fonctionnalisé a été appliqué avec succès pour la détection sélective de la dopamine avec une limite de détection de 50 nM. En outre, le microsystème a montré de bonnes performances pour détecter les niveaux de dopamine dans les échantillons de viande.

3.5.3.1 Produits chimiques

La Polyéthylèneimine branchée (PEI, $M_w \sim 25,000$), la dopamine (DA), le chlorure de zinc ($ZnCl_2$), le tampon phosphate salin (PBS, 0.01 M, pH 7.4), le ferrocyanure de potassium ($[K_4Fe(CN)_6]$), et le chlorure d'hexaammineruthénium(III) $[Ru(NH_3)_6]Cl_3$ viennent de chez Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), l'oxyde de graphène (GO) provient de Graphenea, Espagne.

3.5.3.2 Caractérisation

Les équipements de caractérisation ont déjà été cités dans le chapitre 2, nous avons complété notre étude par l'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans des échantillons de viande, afin de valider nos mesures

L'analyse de la concentration de la DA dans les échantillons de viande est déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japon) équipée d'une colonne C4 QS Uptisphere® 300 Å, 250 mm x 4,6 mm (Interchim, Montluçon, France) chauffé à 40 ° C. La phase mobile consistait en un mélange d'éluant A (acide trifluoroacétique à 0,1% dans l'eau) et d'éluant B (acide trifluoroacétique 0,1 dans l'acétonitrile) à un débit de 1 ml / min. Les échantillons ont été injectés à un volume de 40 µL et la longueur d'onde de détection était de 280 nm.

3.5.3.3 La faisabilité de la Détection de la dopamine par le microsystème fonctionnalisé

Avant de commencer les essais, il faut d'abord s'assurer que le microsystème modifié par rGO/PEI peut être utilisé pour la détection de la dopamine dans les aliments. Pour cela nous avons d'abord testé la détection de la dopamine avec une électrode d'or et une électrode fonctionnalisée. La Figure 58 montre l'efficacité de la fonctionnalisation pour la détection de la dopamine.

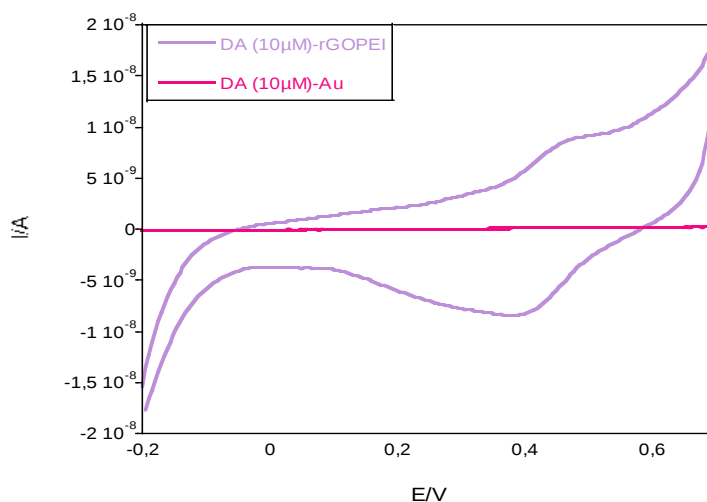


Figure 57 : CV de 10 μ M Dopamine dans 0.1mM PBS à une vitesse scan 0.050 V.s⁻¹d'un microsystème d'une microélectrode d'Or (50nm Au+10nm Ti)

3.5.3.4 Détection de dopamine dans des échantillons de viande préparés

La viande de bœuf et de poulet a été préparée suivant une approche similaire à celle rapportée par Yang J et al et L. Zhihua et al [31,32] reposant sur la précipitation des protéines avec ZnCl₂. En bref, 4 g d'échantillon de viande ont été découpés et homogénéisés avec mortier et pilon en une pâte fine après addition de 10 mL de solution PBS (0,01 M, pH 7,4). Ensuite, il a été mélangé avec 10 ml de ZnCl₂ 1 M et a été laissé pendant 10 minutes sous agitation modérée (100 tr / min). Le mélange a été centrifugé à 4 000 tr / min à 4°C pendant 15 min et filtré deux fois à travers un filtre Minisart RC 4 avec une taille de pores de 0,2 μ m. Les échantillons obtenus ont été utilisés pour la détection de la dopamine. Des voltammogrammes à impulsions différentielles (DPV) ont été enregistrés dans la plage de potentiel allant de 0,0 à 0,6 V avec une amplitude de modulation de 25 mV avec un potentiel de pas de 5 mV.

La Figure 59A montre que le changement du pic de courant lors de l'addition de dopamine a été mesuré par DPV. Cette dernière offre l'avantage que la mesure du courant faradique est effectuée après que le processus de chargement de la double couche a été atténué. Cela s'est traduit par un rapport signal/bruit favorable pour des faibles concentrations d'analyte.

Un pic maximum du courant est observé à $E = 0,26$ V vs Ag / AgCl qui évolue linéairement avec la concentration de la dopamine jusqu'à 1,0 μ M avec un coefficient de corrélation de $R = 0,999$ pour $i(\text{nA}) = 0,76 + 0,033 [\text{dopamine}] (\text{nM})$ (Figure 59B). La limite

de détection (LOD) pour la dopamine est 50 ± 5 nM (Figure 11B). À titre de comparaison, une macroélectrode d'or modifiée avec rGO / PEI dans les mêmes conditions permet d'obtenir une LOD de 80 ± 10 nM pour i (μA) = $-0,013 + 87,06 [\text{dopamine}]$ (μM). Cette différence de LOD est due à l'amélioration du rapport signal/bruit sur les microélectrodes par rapport aux macroélectrodes. Ce microsystème est également compétitif avec d'autres microsystèmes rapportés pour la détection de la dopamine (Tableau 14).

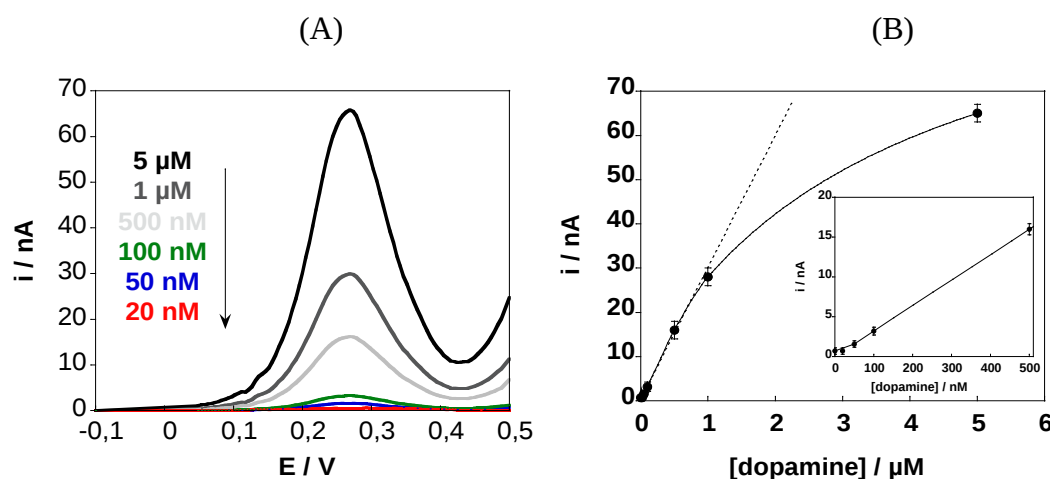


Figure 58: (A) voltammogrammes d'impulsions différentielles de microsystème modifié par rGO / PEI lors de l'addition de différentes concentrations de dopamine dans du PBS (10 mM); (B) le changement de courant en fonction de la concentration en dopamine.

La performance du capteur d'un analyte spécifique dans un milieu complexe est souvent entravée par des molécules d'interférence d'oxydes au même potentiel. Pour vérifier la sélectivité de la détection du microsystème fonctionnalisé rGO / PEI pour la dopamine, nous avons étudié la réponse électrochimique du capteur d'un mélange d'acide ascorbique (AA), d'acide urique (UA) et dopamine (5 μM). Comme on peut le voir sur la Figure 60, le capteur réagit sélectivement à la dopamine même en présence de concentrations plus élevées d'acide ascorbique et d'acide urique. En outre, l'acide urique et l'acide ascorbique ne peuvent être détectés même à 50 μM dans nos conditions expérimentales. Cela nous permet de conclure que le capteur est sélectif pour la dopamine.

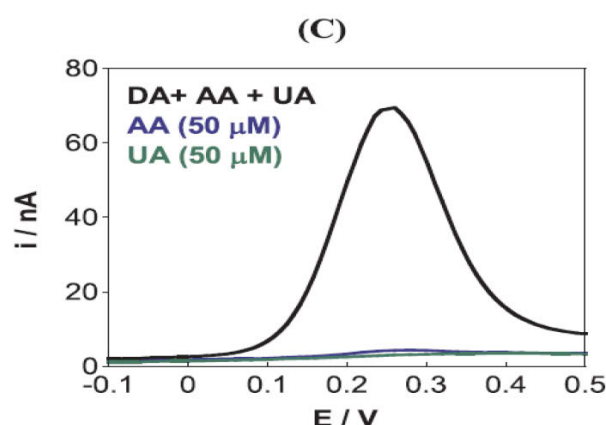


Figure 59: DVP de l'acide urique (50 µM, vert), de l'acide ascorbique (50 µM, bleu) et dopamine (5 µM, noir) en présence d'acide urique (50 µM) et d'acide ascorbique (50 µM).

Tableau 12 : comparaison des performances de notre microsystème pour l'analyse de la dopamine avec autres microsystèmes signalés.

Matière d'électrode	Méthode de détection	Gamme linéaire (µM)	Sensibilité	Limite de détection (µM)	Réf
OPPD-CFCMEs	SWV	0.05-10	-	0.01	[33]
mMEA	CV	-	0.096 nA mM ⁻¹	0.62	[34]
SPMA	LSV	5-50	-	3.24	[35]
Tyr-PEDOT-Au	I-t	10-150	0.045 nA µM ⁻¹	0.99	[36]
PEDOT-CNT	SWV	0.2-10	0.18 nA µM ⁻¹	1.00	[37]
3D carbon	Fast scan CV	0.1-10	80 nA µM ⁻¹	0.10	[38]
Nanofiber MEAs					
PEDOT:PSS	DPV	1-50	826 nA µM ⁻¹ cm ⁻²	6.84	[39]
rGO + CD/ CF	DPV	0.1-100	6.5 nA µM ⁻¹	0.02	[40]
Anneau Au	I-t	1-39	-	0.20	[41]
PPF	CV	25-500	5.8 pA µM ⁻¹	5.00	[42]
rGO/PEI/Au	DPV	0.05-1	-	0.05	Ce travail

OPPD-CFCMEs: fibre de carbone revêtue de poly-(1,2-phénylènediamine) (OPPD) suroxydée des microélectrodes (CFMEs)

mMEA: réseau de microélectrodes multifonctionnel

SPMA: réseaux de micro-électrodes sérigraphiées

Tyr-PEDOT-Au: bio-composite tyrosinase (Ty)-poly(3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDOT) microélectrode à disque d'or (Au) modifiée par film

PEDOT-CNT: poly (3,4-éthylènedioxythiophène) (PEDOT) et microélectrodes de nanotubes de carbone (CNT)

MEA en nanofibres de carbone 3D: réseaux de microélectrodes en nanofibres de carbone 3D

PEDOT: PSS: poly (3,4 éthylènedioxythiophène): polystyrène sulfonate

rGO + CD / CF: oxyde de graphène réduit + micro-électrodes en fibre de carbone revêtues de carbone

PPF: films de photorésist pyrolysés (PPF) pour électrophorèse capillaire à micropuce (CE)

De plus, le capteur a été utilisé pour détecter les niveaux de dopamine dans des échantillons de viande de poulet et de bœuf transformés. L'étude de viande de poulet et de bœuf transformée et diluée 100 fois a montré des bandes d'oxydation à la même position que celle de la dopamine (Figure 61A). La comparaison du signal électrochimique d'une solution de dopamine 1 μM avec celle d'échantillons dilués de boeuf et de poulet a abouti à des concentrations de dopamine de $1,06 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (boeuf) et $0,95 \pm 0,23 \mu\text{M}$ (poulet)) dans les échantillons dilués (Figure 61A).

Tableau 13 : analyse électrochimique et HPLC de la dopamine dans des échantillons de poulet et de viande.

Échantillon	Électrochimique		HPLC	
	i/nA	[dopamine]/ μM	Surface	[dopamine]/ μM
Dopamine	29.90	1.0	64	1
Bœuf 100× dilué	30.87±0.5	1.06±0.12	69±3	1.07±0.21
poulet 100× dilué	27.5±0.5	0.95±0.23	57.6±5	0.90±0.23

Afin de valider ces résultats, des mesures HPLC ont été effectuées sur des échantillons de viande de boeuf et de poulet transformés. La Figure 61B présente les résultats HPLC des différentes solutions. L'intégration de la surface du pic entre 5,5 et 6 min (Tableau 15) indique la présence de dopamine dans les deux échantillons de viande avec une concentration de $1,07 \pm 0,21 \mu\text{M}$ (boeuf) et $0,90 \pm 0,23 \mu\text{M}$ (poulet), en bon accord avec les résultats électrochimiques.

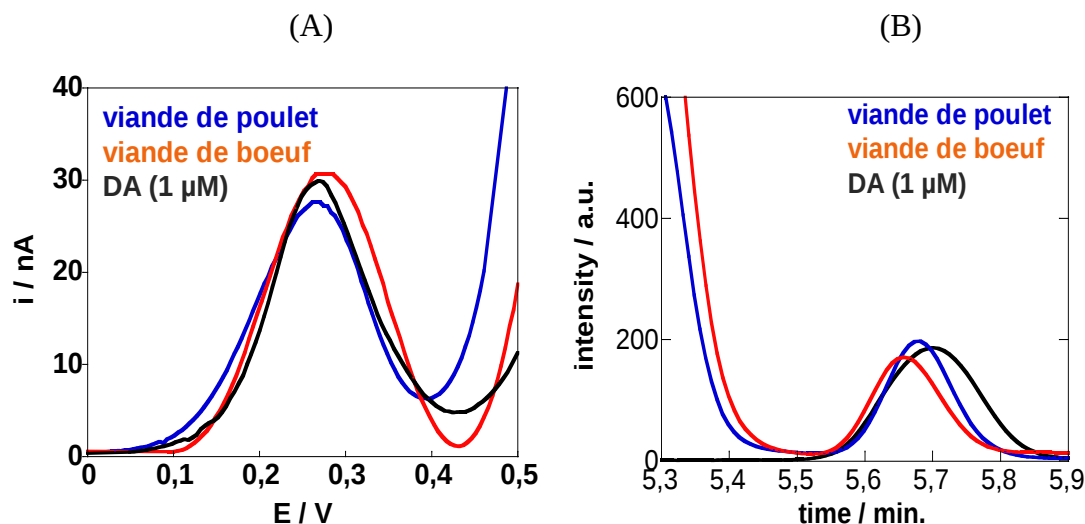


Figure 60: (A) voltamétrie impulsionnelle différentielle (DPV) de la viande de boeuf (bleu) et poulet (rouge) transformés (100 fois dilués) avec de la dopamine (1 μM); (B) Les mesures HPLC des échantillons de viande de dopamine (1 μM) et de boeuf (bleu) et de poulet (rouge) dilués 100 fois.

3.6 Conclusion

Nous avons montré que le dépôt électrophorétique (EPD) peut être appliqué avec succès pour la fonctionnalisation sélective d'une microélectrode d'or dans un microsystème. Dans cette étude, nous avons modifié la microélectrode en or avec une fine couche d'oxyde de graphène réduit / polyéthylèneimine pour amplifier le signal de la réponse électrochimique de l'électrode fonctionnalisée. Le microsystème modifié a été appliqué avec succès pour la détection de la dopamine avec une limite de détection de 50 nM. Le capteur était sélectif avec une faible influence des molécules d'interférence telles que l'acide ascorbique et l'acide urique même à des concentrations plus élevées dans nos conditions expérimentales. Enfin, le microsystème a été utilisé pour la détection précise des niveaux de dopamine dans les échantillons de viande de porc et de poulet. Cette première démonstration de l'utilisation de l'EPD pour la fonctionnalisation sélective d'une électrode unique dans un microsystème est très prometteuse. L'utilisation de cette technique est facile et contrôlable pour l'introduction de différents revêtements fonctionnels sur des électrodes actives pour diverses applications dans différents domaines.

Bibliographie

- [1] Lithography n.d. <https://www.memsnet.org/mems/processes/lithography.html> (accessed May 5, 2018).
- [2] Chen J, Yao B, Li C, Shi G. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. *Carbon* 2013;64:225–9. doi:10.1016/j.carbon.2013.07.055.
- [3] Dimiev AM, Tour JM. Mechanism of Graphene Oxide Formation. *ACS Nano* 2014;8:3060–8. doi:10.1021/nn500606a.
- [4] Park S-Y. Preparation of Solvent-Dispersible Graphene and its Application to Nanocomposites: Fort Belvoir, VA: Defense Technical Information Center; 2016. doi:10.21236/AD1017565.
- [5] Alam SN, Sharma N, Kumar L. Synthesis of Graphene Oxide (GO) by Modified Hummers Method and Its Thermal Reduction to Obtain Reduced Graphene Oxide (rGO)*. *Graphene* 2017;06:1–18. doi:10.4236/graphene.2017.61001.
- [6] Zaaba NI, Foo KL, Hashim U, Tan SJ, Liu W-W, Voon CH. Synthesis of Graphene Oxide using Modified Hummers Method: Solvent Influence. *Procedia Engineering* 2017;184:469–77. doi:10.1016/j.proeng.2017.04.118.
- [7] Ammar A, Al-Enizi AM, AlMaadeed MA, Karim A. Influence of graphene oxide on mechanical, morphological, barrier, and electrical properties of polymer membranes. *Arabian Journal of Chemistry* 2016;9:274–86. doi:10.1016/j.arabjc.2015.07.006.
- [8] Wang Q, Wang Q, Li M, Szunerits S, Boukherroub R. Preparation of reduced graphene oxide/Cu nanoparticle composites through electrophoretic deposition: application for nonenzymatic glucose sensing. *RSC Advances* 2015;5:15861–9. doi:10.1039/C4RA14132F.
- [9] Subramanian P, Niedziolka-Jonsson J, Lesniewski A, Wang Q, Li M, Boukherroub R, et al. Preparation of reduced graphene oxide–Ni(OH)₂ composites by electrophoretic deposition: application for non-enzymatic glucose sensing. *J Mater Chem A* 2014;2:5525–33. doi:10.1039/C4TA00123K.
- [10] Subramanian P, Lesniewski A, Kaminska I, Vlandas A, Vasilescu A, Niedziolka-Jonsson J, et al. Lysozyme detection on aptamer functionalized graphene-coated SPR interfaces. *Biosensors and Bioelectronics* 2013;50:239–43. doi:10.1016/j.bios.2013.06.026.
- [11] Maaoui H, Singh SK, Teodorescu F, Coffinier Y, Barras A, Chtourou R, et al. Copper oxide supported on three-dimensional ammonia-doped porous reduced graphene oxide prepared through electrophoretic deposition for non-enzymatic glucose sensing. *Electrochimica Acta* 2017;224:346–54. doi:10.1016/j.electacta.2016.12.078.
- [12] Xiao T, Wu F, Hao J, Zhang M, Yu P, Mao L. In Vivo Analysis with Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* 2017;89:300–13. doi:10.1021/acs.analchem.6b04308.
- [13] Wolfrum B, Kätelhön E, Yakushenko A, Krause KJ, Adly N, Hüske M, et al. Nanoscale Electrochemical Sensor Arrays: Redox Cycling Amplification in Dual-Electrode Systems. *Accounts of Chemical Research* 2016;49:2031–40. doi:10.1021/acs.accounts.6b00333.
- [14] Neethirajan S. Recent advances in wearable sensors for animal health management. *Sensing and Bio-Sensing Research* 2017;12:15–29. doi:10.1016/j.sbsr.2016.11.004.
- [15] Xiao Y, Guo C, Li CM, Li Y, Zhang J, Xue R, et al. Highly sensitive and selective method to detect dopamine in the presence of ascorbic acid by a new polymeric composite film. *Analytical Biochemistry* 2007;371:229–37. doi:10.1016/j.ab.2007.07.025.

- [16] An J-H, El-Said WA, Yea C-H, Kim T-H, Choi J-W. Surface-Enhanced Raman Scattering of Dopamine on Self-Assembled Gold Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2011;11:4424–9. doi:10.1166/jnn.2011.3688.
- [17] Stewart AJ, Hendry J, Dennany L. Whole Blood Electrochemiluminescent Detection of Dopamine. *Analytical Chemistry* 2015;87:11847–53. doi:10.1021/acs.analchem.5b03345.
- [18] Rasheed PA, Lee J-S. Recent advances in optical detection of dopamine using nanomaterials. *Microchimica Acta* 2017;184:1239–66. doi:10.1007/s00604-017-2183-6.
- [19] Matsui J, Akamatsu K, Hara N, Miyoshi D, Nawafune H, Tamaki K, et al. SPR Sensor Chip for Detection of Small Molecules Using Molecularly Imprinted Polymer with Embedded Gold Nanoparticles. *Analytical Chemistry* 2005;77:4282–5. doi:10.1021/ac050227i.
- [20] Peeters MM, van Grinsven B, Foster CW, Cleij TJ, Banks CE. Introducing Thermal Wave Transport Analysis (TWTA): A Thermal Technique for Dopamine Detection by Screen-Printed Electrodes Functionalized with Molecularly Imprinted Polymer (MIP) Particles. *Molecules* 2016;21:552. doi:10.3390/molecules21050552.
- [21] Jackowska K, Kryszinski P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. *Anal Bioanal Chem* 2013;405:3753–71. doi:10.1007/s00216-012-6578-2.
- [22] Pandikumar A, Soon How GT, See TP, Omar FS, Jayabal S, Kamali KZ, et al. Graphene and its nanocomposite material based electrochemical sensor platform for dopamine. *RSC Adv* 2014;4:63296–323. doi:10.1039/C4RA13777A.
- [23] Ganesh HVS, Chow AM, Kerman K. Recent advances in biosensors for neurodegenerative disease detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2016;79:363–70. doi:10.1016/j.trac.2016.02.012.
- [24] Liu J, Yuan L, Dong X. Recent advances in analytical techniques for the determination of dopamine. *International Journal of Chemical Studies* n.d.:7.
- [25] Sajid M, Nazal MK, Mansha M, Alsharaa A, Jillani SMS, Basheer C. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2016;76:15–29. doi:10.1016/j.trac.2015.09.006.
- [26] Asefa T, Duncan CT, Sharma KK. Recent advances in nanostructured chemosensors and biosensors. *Analyst* 2009;134:1980–90. doi:10.1039/B911965P.
- [27] Biju V. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. *Chem Soc Rev* 2014;43:744–64. doi:10.1039/C3CS60273G.
- [28] Holzinger M, Le Goff A, Cosnier S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Front Chem* 2014;2. doi:10.3389/fchem.2014.00063.
- [29] Wen D, Liu W, Herrmann A-K, Haubold D, Holzschuh M, Simon F, et al. Simple and Sensitive Colorimetric Detection of Dopamine Based on Assembly of Cyclodextrin-Modified Au Nanoparticles. *Small* 2016;12:2439–42. doi:10.1002/smll.201503874.
- [30] Saha S, Sarkar P, Turner APF. Interference-Free Electrochemical Detection of Nanomolar Dopamine Using Doped Polypyrrole and Silver Nanoparticles. *Electroanalysis* 2014;26:2197–206. doi:10.1002/elan.201400332.
- [31] Yang J, Strickler JR, Gunasekaran S. Indium tin oxide-coated glass modified with reduced graphene oxide sheets and gold nanoparticles as disposable working electrodes for dopamine sensing in meat samples. *Nanoscale* 2012;4:4594–602. doi:10.1039/C2NR30618B.
- [32] Zhihua L, Xucheng Z, Kun W, Xiaobo Z, Jiyong S, Xiaowei H, et al. A novel sensor for determination of dopamine in meat based on ZnO-decorated reduced graphene

- oxide composites. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2015;31:196–203. doi:10.1016/j.ifset.2015.06.011.
- [33] Mo J-W, Ogorevc B. Simultaneous Measurement of Dopamine and Ascorbate at Their Physiological Levels Using Voltammetric Microprobe Based on Overoxidized Poly(1,2-phenylenediamine)-Coated Carbon Fiber. *Analytical Chemistry* 2001;73:1196–202. doi:10.1021/ac0010882.
- [34] Chuang M-C, Lai H-Y, Annie Ho J, Chen Y-Y. Multifunctional microelectrode array (mMEA) chip for neural-electrical and neural-chemical interfaces: Characterization of comb interdigitated electrode towards dopamine detection. *Biosensors and Bioelectronics* 2013;41:602–7. doi:10.1016/j.bios.2012.09.030.
- [35] Tan F, Metters JP, Banks CE. Electroanalytical applications of screen printed microelectrode arrays. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2013;181:454–62. doi:10.1016/j.snb.2013.02.034.
- [36] Lupu S, Lete C, Balaure PC, Campo FJ del, Muñoz FX, Lakard B, et al. In situ electrodeposition of biocomposite materials by sinusoidal voltages on microelectrodes array for tyrosinase based amperometric biosensor development. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2013;181:136–43. doi:10.1016/j.snb.2013.01.060.
- [37] Samba R, Fuchsberger K, Matychyn I, Epple S, Kiesel L, Stett A, et al. Application of PEDOT-CNT Microelectrodes for Neurotransmitter Sensing. *Electroanalysis* 2014;26:548–55. doi:10.1002/elan.201300547.
- [38] Yi W, Yang Y, Hashemi P, Cheng MM-C. 3D carbon nanofiber microelectrode arrays fabricated by plasma-assisted pyrolysis to enhance sensitivity and stability of real-time dopamine detection. *Biomedical Microdevices* 2016;18. doi:10.1007/s10544-016-0136-1.
- [39] Pal RK, Kundu SC, Yadavalli VK. Biosensing using photolithographically micropatterned electrodes of PEDOT:PSS on ITO substrates. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2017;242:140–7. doi:10.1016/j.snb.2016.11.049.
- [40] Fang J, Xie Z, Wallace G, Wang X. Co-deposition of carbon dots and reduced graphene oxide nanosheets on carbon-fiber microelectrode surface for selective detection of dopamine. *Applied Surface Science* 2017;412:131–7. doi:10.1016/j.apsusc.2017.03.257.
- [41] Wang K, Zhao X, Li B, Wang K, Zhang X, Mao L, et al. Ultrasonic-Aided Fabrication of Nanostructured Au-Ring Microelectrodes for Monitoring Transmitters Released from Single Cells. *Analytical Chemistry* 2017;89:8683–8. doi:10.1021/acs.analchem.7b02814.
- [42] Fischer DJ, Vandaveer WR, Grigsby RJ, Lunte SM. Pyrolyzed Photoresist Carbon Electrodes for Microchip Electrophoresis with Dual-Electrode Amperometric Detection. *Electroanalysis* 2005;17:1153–9. doi:10.1002/elan.200503239.

Conclusions générales

Le travail effectué sur la biodétection par microsystème se devise en quatre volets, d'abord notre stratégie été d'élaborer un biocapteur électrochimique qui prends en considération le rapport coût / qualité et qui pourra être fonctionnalisé pour divers analytes. Au début nous avons commencé par un état de l'art sur le recensement des bactéries responsables des maladies nosocomiales, la bactérie qui revient toujours avec le pourcentage le plus élevé c'est l'E. Coli et spécialement l'E. Coli Uropathogène, nous avons donc pris cette bactérie comme exemple pour notre étude. Nous avons commencé par la réalisation de notre microsystème sur la base d'une cellule électrochimiques classique a trois électrodes (travail, référence, auxiliaire), mais à l'échelle micrométrique, ce travail nous a pris beaucoup de temps bien qu'il n'a pas été ressorti dans le manuscrit, vu que ça nous a pris plus de six mois en salle blanche (MIMENTO femto.st) pour valider les paramètres de notre process de microfabrication.

Bien évidemment la pièce maitresse de tout biocapteur c'est le biorécepteur, qui doit être choisi sur la base de deux critères important, primo l'amplification du signal qui est dans notre cas électrique pour permettre le transfert des électrons, puisque c'est un capteur électrochimique, secundo qu'il soit biocompatible et prédisposé au greffage. En collaboration avec l'équipe NanoBioInterfaces de l'IEMN de Lille, nous avons choisi une technique facile, contrôlable et économique qui consiste à la fonctionnalisation par déposition électrophorétique de l'oxyde de graphène qui répond parfaitement à nos besoins. Malgré son rôle remarquable dans l'amplification du signal nous avons été confrontés au problème de stabilité et reproductibilité. En revanche l'ajout du polyéthylèneimine a donné un mélange polyéthylèneimine modifié avec des nanofeuillets d'oxyde de graphène réduit (rGO/PEI) sur l'or, l'électrode modifiée est plus stable même si l'amplification a légèrement diminué.

Afin de valider cette plateforme nous avons choisis la détection d'une bactérie très connue dans les infections nosocomiales qui est la bactérie E. Coli UTI89. La fonctionnalisation covalente de l'électrode d'or avec des anticorps anti-fimbriae E. Coli a abouti à un dispositif de détection hautement sensible à E. Coli UTI89. Nous avons obtenu un seuil limite de détection de 10 ufc mL^{-1} , cette faible limite de détection nous permet de diagnostiquer les

infections urinaires dans des échantillons de sérum et d'urine humains ainsi qu'en présence d'autres espèces de bactéries à un stade primitive. L'électrode modifiée peut même différencier entre deux souches de la même espèce E. Coli UTI89 et Coli UTI89 sur $\Delta fimA$. Cette approche est générale et peut être utilisée pour la détection d'autres bactéries pathogènes. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal « Sensors and Actuators B: Chemical » Ji Ji R, Kahlouche K, et al. Reduced graphene oxide/polyethylenimine based immunosensor for the selective and sensitive electrochemical detection of uropathogenic Escherichia coli. mai 2018;260:255-63 ».

Nous avons aussi travaillé sur la détection des bactéries avec une électrode d'or modifiée par sel de diazonium, cette fois-ci la modification a été faite par électrochimie. Nous nous sommes basés sur un protocole publié et cité dans les références, les tests préliminaires sont concluants, mais il reste la validation et la transposition vers notre microsystème.

Après la validation de l'électrode modifiée pour la détection sensible et sélective de la bactérie pathogène, nous avons transposé le protocole de modification de rGO/PEI par EDP sur notre microsystème. Le défi a été de fonctionnaliser juste l'électrode de travail sans affecter le signal du microsystème, après plusieurs essais, nous avons pu optimiser les paramètres de fonctionnalisation pour notre microsystème et obtenir un signal amplifié.

Nous avons choisi la dopamine, une hormone neurotransmetteur comme analyte. Après des essais concluants sur des électrodes en or, nous avons transposé le protocole sur le capteur réalisé, qui s'est avéré sensible et sélective pour la détection de la dopamine avec une limite de détection de 50 nM, la sélectivité a été testée en présence des molécules d'interférence telles que l'acide ascorbique et l'acide urique même à des concentrations plus élevées. Nous avons même testé le capteur pour la détection précise des niveaux de dopamine dans les échantillons de viande de porc et de poulet. Ce capteur mis en œuvre, ouvre le portail vers l'utilisation de l'EPD pour la fonctionnalisation sélective d'une électrode dans un microsystème, ainsi que l'introduction de différents revêtements fonctionnels sur des électrodes actives pour diverses applications dans différents domaines.

Les résultats sont tout à fait concluants avec la détection de la dopamine. Cependant, il reste l'exploitation de ce capteur pour la détection des bactéries. Le travail a déjà été entamé sur des électrodes modifiées, comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 où il a fait l'objet d'une publication dans le journal Talanta « Kahlouche K, et al. Controlled modification of

electrochemical microsystems with polyethylenimine/reduced graphene oxide using electrophoretic deposition: Sensing of dopamine levels in meat samples. *Talanta*. 1 févr 2018;178:432-40 », donc le protocole est validé pour la détection de la dopamine, reste la partie transposition du protocole de détection de la bactérie par le microsystème.

ANNEXE A :

(Chapitre 2)

1 CARACTÉRISATION DE L'OXYDE DE GRAPHÈNE

L'analyse par microscopie électronique de transmission (TEM) des échantillons a été effectuée en dispersant 1 mg de matière dans 5 mL d'alcool isopropylique (IPA) et en plongeant une grille de Cu 200 mesh dans 5 μ L de la solution résultante. Le grille de Cu revêtu de matériau a été séché dans des conditions ambiantes et observé en utilisant un instrument FEI-TECNAI G2 F20 TEM fonctionnant à une tension accélérée de 200 kV (Cs = 0,6 mm, résolution 1,7 Å). L'analyse Raman a été effectuée sur un spectromètre Raman HR 800 (Jobin Yvon, Horiba, France) en utilisant un laser rouge 632 nm (NRS 1500 W) comme source d'excitation. La spectroscopie de photoélectrons aux rayons X (XPS) a été réalisée dans un instrument à microsonde ESCA à balayage VersaProbe-Scanning PHI 5000 (ULVAC-PHI, Japon / USA) à une pression inférieure à 5×10^{-9} mbar. Les spectres ont été obtenus à une énergie de passage de 23,5 eV. Tous les spectres ont été acquis à 90° entre la source de rayons X et l'analyseur et avec l'utilisation d'électrons de faible énergie et d'ions d'argon de faible énergie pour la neutralisation de charge. Après la soustraction de l'arrière-plan linéaire, les spectres au niveau du noyau ont été décomposés en leurs composantes avec des lignes gaussiennes-lorentziennes mixtes (30/70) à l'aide du logiciel CasaXPS. Les calculs de quantification ont été effectués à l'aide des facteurs de sensibilité fournis par le PHI.

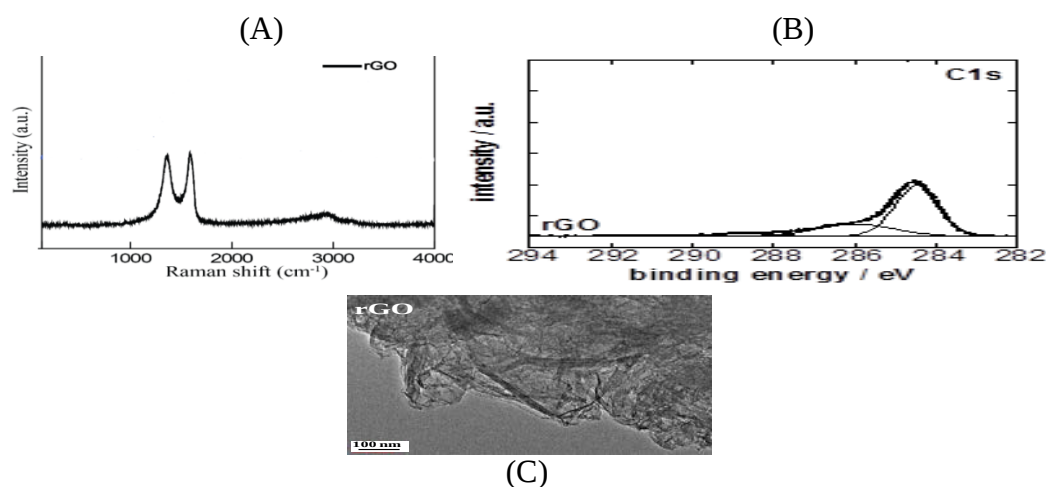


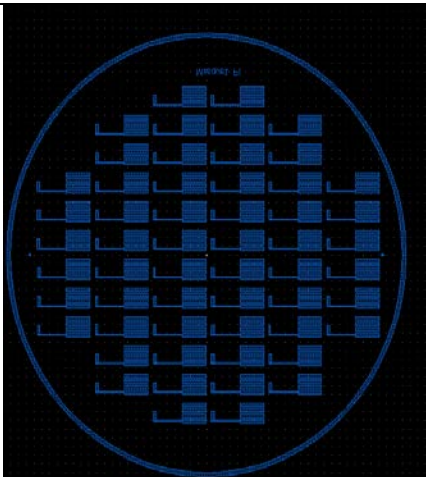
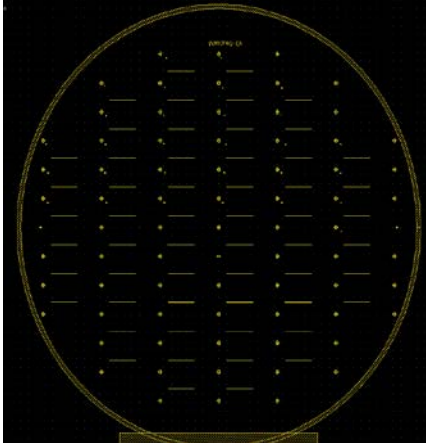
Figure N°01 : (A) spectre Raman de rGO (B) spectre XPS du rGO (C_{1s}), (C) image de microscopie électronique de transmission (TEM) de l'oxyde de graphène réduit

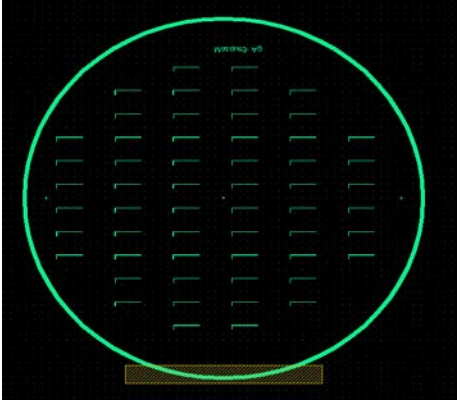
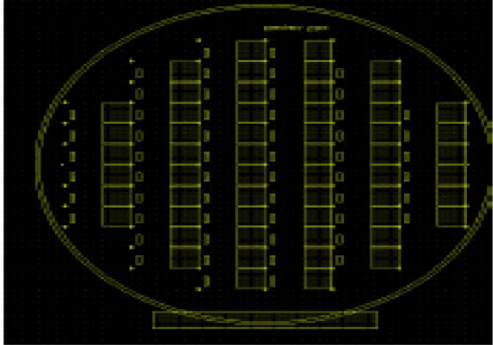
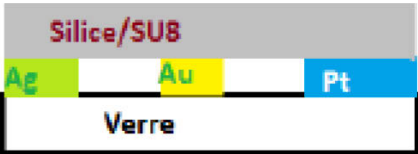
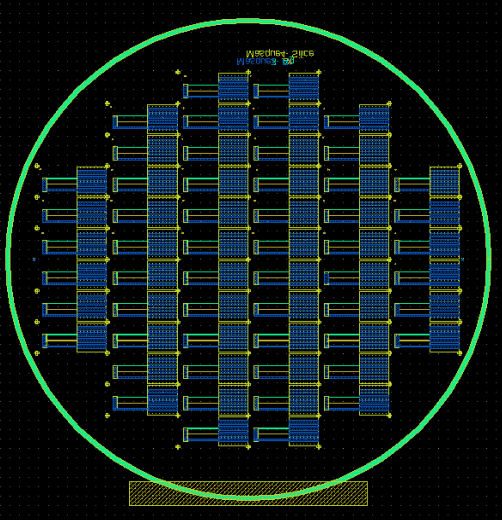
ANNEXE B

(Chapitre 3)

1 PROCESS TECHNOLOGIQUE POUR LA FABRICATION DES MICROÉLECTRODES :

Flow chart pour la réalisation des micro-électrodes , Substrat : wafer en verre 500µm ±25

Etape	Process	Masque
Electrode platine	Lift off Résine : AZ5214 Epaisseur : 1.2 µm	
	Dépôt du platine Pulvérisation cathodique/ MP500 Epaisseur Cr: 10nm Epaisseur Pt: 150nm	
Electrode Or	Lift off Résine : AZ5214 Epaisseur : 1.2 µm	
	Dépôt d'Or Pulvérisation cathodique/ MP500 Epaisseur Cr: 10nm Epaisseur Au: 150nm	

Electrode Argent	Lift off Résine : AZ5214 Epaisseur : 1.2 μm Dépôt d'Ag Evaporation : Eva 450 Epaisseur Cr: 10nm Epaisseur Ag: 150nm .0		
Passivation (silice ou SU8)	Silice Lift off Résine : AZ5214	Résine SU8 ;: Photolithographie Résine : SU8 NB : le masque sera inversé	 
	ICPECVD Epaisseur Ag : 250nm		
Produit finale			

1.1. Process Liftoff

Plusieurs recettes de lift off sont utilisées en salle blanche MIMENTO, après le développement de la résine, nous avons fait un dépôt Cr/Au: 10/150 nm avec l'équipement

dédié Evap450 vitesse du dépôt est de 10Å/s, suivi par un nettoyage dans l'acétone et séchage à l'Azote. L'épaisseur des électrodes est 140nm.

Nous avons utilisé le process lift off pour la microfabrication de microsystèmes en Platine, Or et Argent sur un substrat en verre, ci-dessus la procédure suivante :

1.1.1 Promoteur d'adhérence HMDS

Opération	HMDS
Temps d'Attente	1 min
Durée de la rotation	30 sec
Vitesse de rotation	4000 tr/min
Accélération	4000 Min/s

1.1.2. La résine négative AZ 5214

C'est une résine inversible (cette résine est destinée principalement au lift-off car elle possède des flancs inversés)

Résine	négatif
durée de la rotation	30 sec
Vitesse de rotation	4000 tr/min
Accélération	4000 tr/min.s
Recuit :	2min, 120°C
1 ^{er} insolation	36 mJ/cm ²
2 ^{ème} recuit (inversion)	1 min 30s ; 120°C
2 ^{ème} insolation (sans masque)	210 Mj/cm ² au moins
Révélateurs	AZ 726 ; non dilué
Révélation	20 à 45 sec
Recuit (pour bain humide)	1min, 120°C

Remarques : le temps du deuxième recuit (Reversal bake) est un paramètre critique, il dépend de l'épaisseur du substrat, de sa conductivité thermique, de sa chaleur massique.

1.1.3 Remarques générales

Après le recuit, laisser revenir à température ambiante avant d'insoler.

Le temps de révélation dépend de la surface insolée, ce temps ne devient critique que pour les dimensions faibles (de l'ordre du micron), il faut prendre en considération que le révélateur attaque l'Aluminium.

En cas de problème de résolution, commencer par incriminer le plaquage masque/substrat lors de l'insolation, avant les autres paramètres.

Lorsque le wafer est trempé dans un bain humide (etch Cr, Au ou BHF), ne pas oublier de faire le dernier recuit.

Pour protéger la face arrière, on peut utiliser de la résine périmée

1.1.4 Les masques

Pour la réalisation des microélectrodes nous avons utilisé quatre masques en chrome, le premier masque pour la réalisation des microélectrodes en platine et les connecteurs, le deuxième pour la réalisation des microélectrodes en or et le troisième masque pour la réalisation des microélectrodes en argent, et enfin le dernier masque pour la fenêtre d'ouverture qui va servir à la détection en oxyde de silicium. Nous avons utilisé aussi un masque pour la résine SU8, après avoir rencontré quelques problèmes avec l'oxyde de silicium. La conception des masques a été faite par le logiciel LAYOUT (figure N°01 (a.b)), par la suite nous avons commandé les quatre masques en chrome (figure N°02 (a.b)), afin d'entamer le process de microfabrication, pour obtenir une plaquette en verre avec les microsystèmes désirés (figure N°02 (c)).

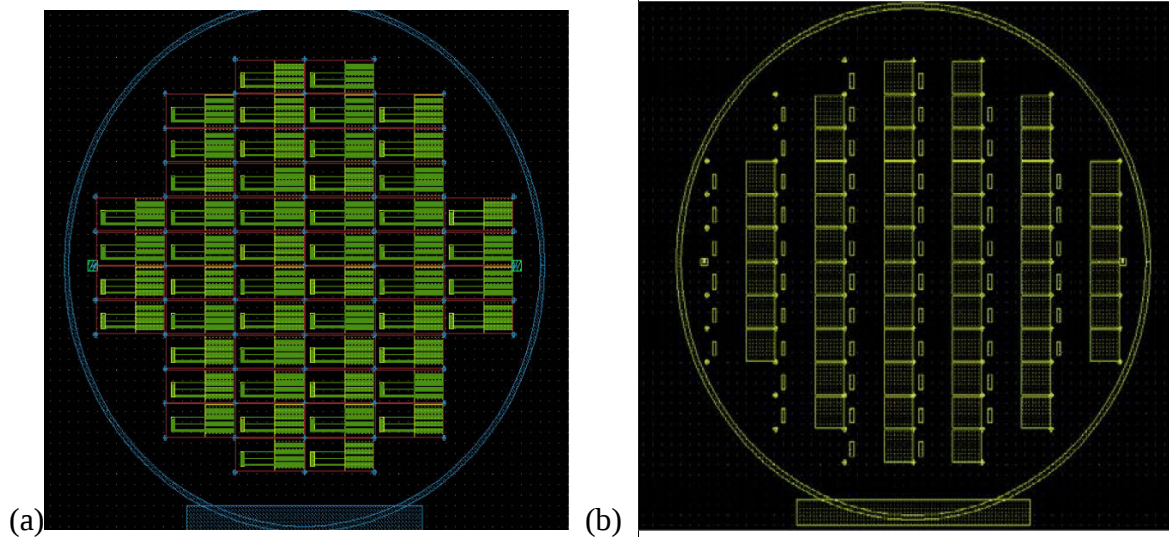


Figure N°01 : masque en format GDS réalisé par le logiciel layout pour la conception des électrodes (a), couche de silice (b)

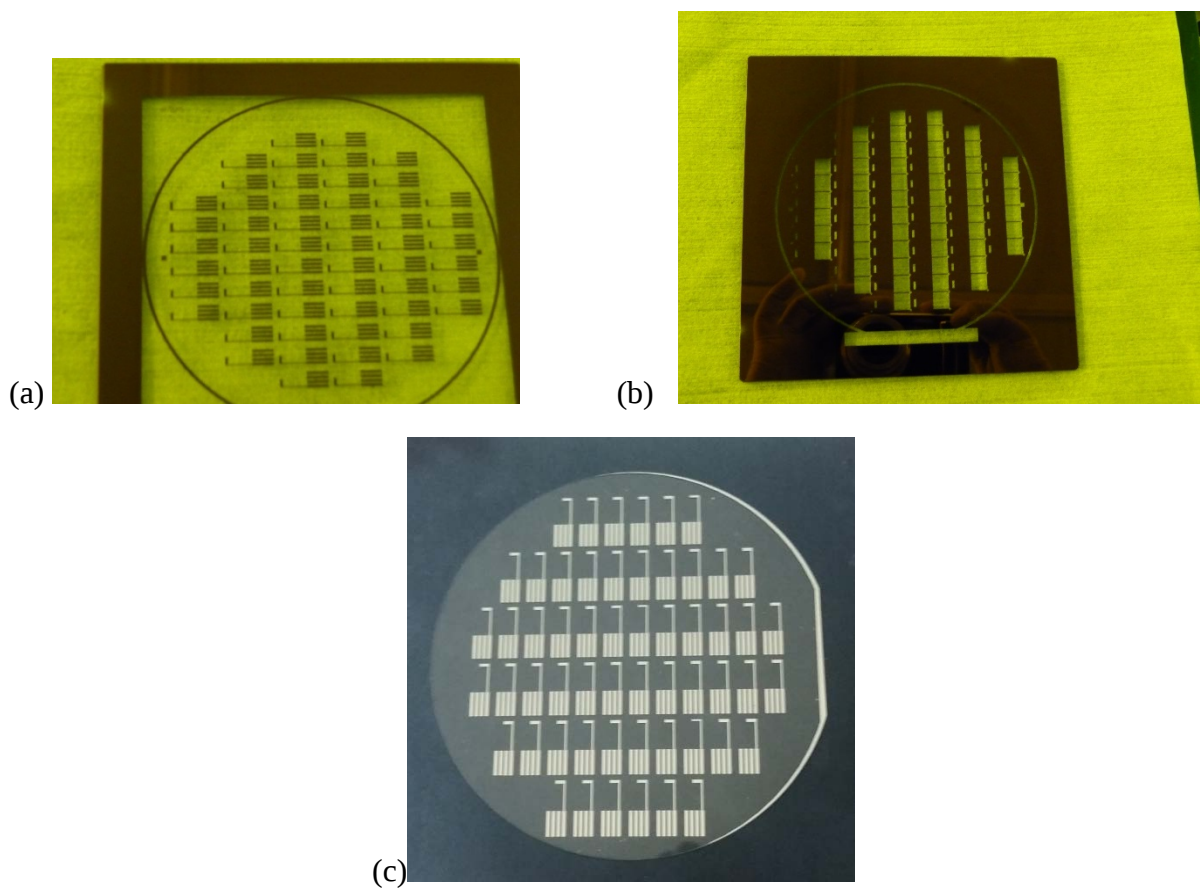


Figure N°02 : masques N°01 en chrome utilisé pour la réalisation des microélectrodes en platine (a) masque en chrome utilisé l'ouverture de la fenêtre en silice d'électrodes en Or (b) la plaquette en verre après la fin du process (c)

1.1.5 La passivation (l'oxyde de silicium)

Après un bon nettoyage on fait une deuxième photolithographie avec le masque de la silice avec la recette top side –flood, on utilise la résine AZ5214 avec une épaisseur 1.3µm.

Nous avons fait un dépôt ICPECVD (inductive couple PECVD) (SENTECH) à 120° C, les gaz utilisés sont oxygène, Argon et le Silane, une fois le process finit (Figure N°03), on passe au découpage.

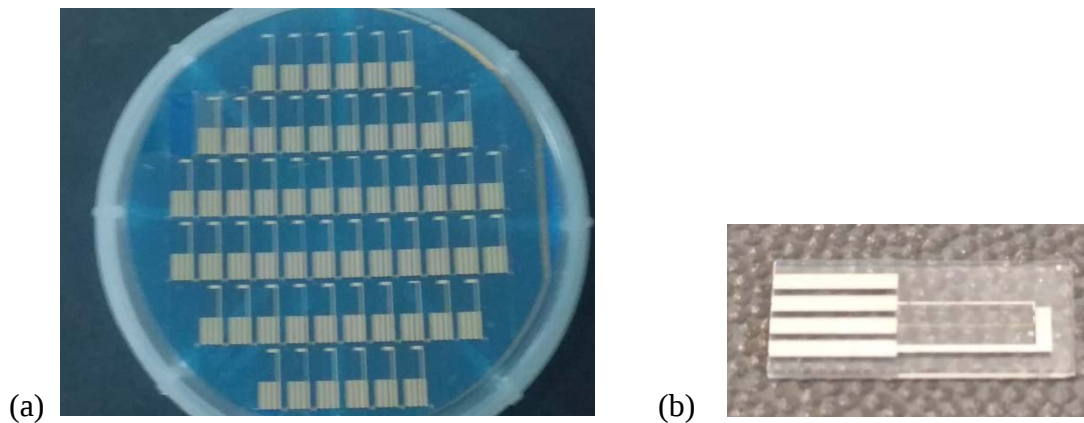


Figure N°04 : la plaquette des microélectrodes avant le découpage (a), un microsystème découpé (b)

1.1.6 Le découpage

La scie de précision permet de découper et de structurer de nombreux matériaux tels que le silicium, le verre, le quartz, le niobate de lithium ..., mais également d'effectuer des polissages (des bords) simultanément aux découpes sur le silicium et le niobate de lithium. Lors de la découpe à la scie DISCO DAD 321, les dispositifs sont collés sur un film adhésif, maintenus par le vide et découpés avec une lame annulaire refroidie par eau. L'enceinte n'est pas hermétique.

Profondeur de découpe : 3,2 mm max

Épaisseur lame : 15 à 450 microns environ

Diamètre des substrats : jusqu'à 6'' (rond)

Précision de la découpe : micrométrique

Précision de la rotation : 1.0'' (angle)

Refroidissement de l'échantillon : à l'eau

Maintien de l'échantillon : par collage sur film adhésif (qui se décolle après insolation aux UV).

La scie de précision permet de séparer des dispositifs mais également d'en créer, c par des découpes partielles (La lame descend à un endroit précis du wafer et coupe sur la longueur désirée (qui peut être nulle !) puis remonte, aussi création d'un réseau de Sillons de 100 microns de profondeur et de largeur 25 microns dans du silicium, ou la création d'un biseau avec un angle de 45° sur des plots en silicium de 300 microns de hauteur et de 150 microns de diamètre.

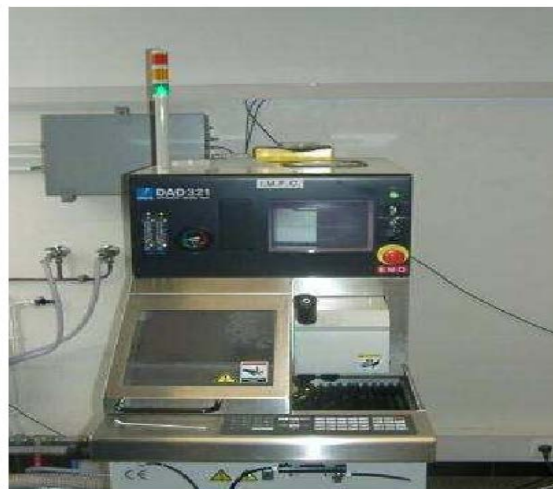


Figure N° 04 : Scie circulaire DISCO DAD 321

1.2 Caractérisation des microélectrodes

Avec le microscope optique nous avons mesuré les dimensions de quelques microélectrodes pour s'assurer de la fiabilité du process



Figure N° 05 : caractérisation des électrodes par microscope optique

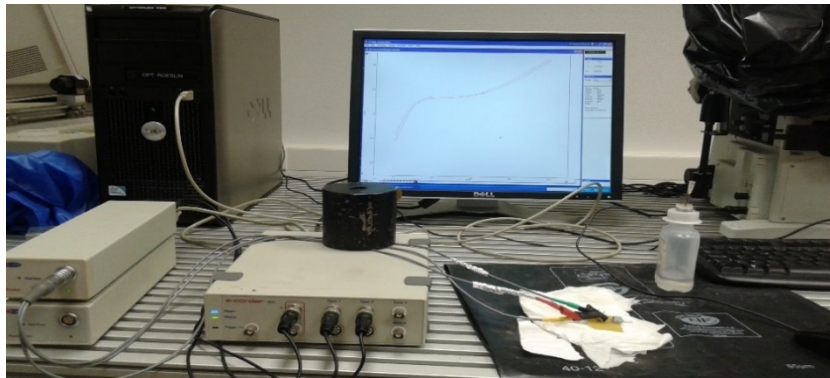
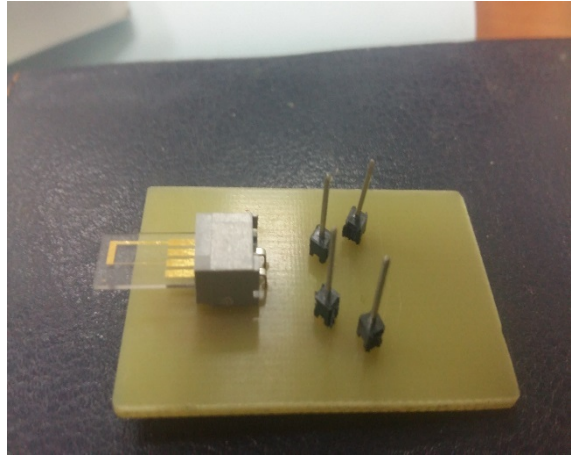
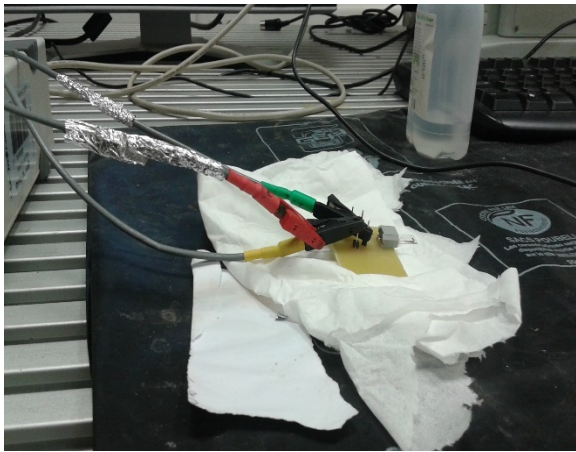


Figure N°06 : schéma l'installation de l'essai de détection d'une Microélectrode

Liste des abréviations et anglicismes

AFM : microscopie à force atomique

BSA : Albumine de Sérum de Bovin

ufc : Pour Unité Formant Colonie (CFU, Colony Forming Unit). Il s'agit de l'unité permettant de dénombrer les bactéries vivantes.

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (dosage avec un immuno adsorbant lié à un enzyme)

ESI-MS : Electrospray Ionization Mass Spectrometry (Spectrométrie de masse par Ionisation par Electro Spray)

FEMTO-ST : Franche-Comté Electronique, Mécanique, Thermique et Optique - Sciences et Technologies

IgG : Immunoglobuline de type G

IR : spectroscopie d'absorption infrarouge

LC-ESI-MS : Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry

LOD : limite de détection (Limite Of Detection)

MIMENTO : Microfabrication pour la Mécanique, les Nanosciences, la Thermique et l'Optique

MS : Spectrométrie de Masse

MS-MS : Spectrométrie de masse en tandem

NHS : N-hydroxysuccinimide

On chip : Sur puce

Opéron : chez les bactéries, c'est l'ensemble de gènes qui sert un promoteur d'une série de gènes groupés.

PBS: Phosphate Buffered Saline

PEG : Polyéthylène glycol

PM-IRRAS : spectroscopie infrarouge par réflexionabsorption par modulation de polarisation

Pyélonéphrite : Inflammation du bassinet et du rein.

SAM: Self Assembled Monolayers (monocouche auto assemblée)

SPR : Surface Plasmon Resonance (Résonance des Plasmon de Surface)

Sulfo-NHS : N-hydroxysulfosuccinimide

STM : microscopie à effet tunnel

UPEC : Escherichia Coli UroPathogène

TOF-SIMS : Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol)