HAL
open science

Conception et réalisation d'un " lab on chip " pour la mesure de polluants organiques dans les eaux de rejet

Amani Migaou

To cite this version:

Amani Migaou. Conception et réalisation d'un " lab on chip " pour la mesure de polluants organiques dans les eaux de rejet. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2019. Français. NNT : 2019TOU30193 . tel-02414002v2

HAL Id: tel-02414002

https://laas.hal.science/tel-02414002v2

Submitted on 2 Jun 2020

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Amani MIGAOU

Le 28 Mai 2019

Conception et réalisation d'un « lab on chip » pour la mesure de polluants organiques dans les eaux de rejet

---

Ecole doctorale : **GEET - Génie Electrique Electronique et Télécommunications : du système au nanosystème**

Spécialité : **MicroNano Systèmes**

Unité de recherche :
LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Thèse dirigée par
Anne-Marie GUE et Ali BOUKABACHE

Jury

Mme Corinne DEJOUS – Professeur d'Université – Rapporteur
M. Fabien PASCAL - Professeur d'Université – Rapporteur
M. Sulivan JOUANNEAU - Maître de Conférence – Examinateur
M. Philippe ARGUEL - Professeur d'Université – Examinateur
M. Ali BOUKABACHE - Maître de Conférence – Co-directeur de thèse
Mme Anne-Marie GUE - Directrice de recherche – Directrice de thèse

Je dédie ce travail

A mes parents sans qui je ne serais pas où j'en suis
A mon amour AYMOUN qui m'a supporté durant ces trois années pleines de tout type d'émotions ☺, merci pour ta patience, ton aide, ta présence…
A mon petit ange MAYA d'amour qui m'a comblé d'amour et qui me ressource à chaque période difficile, Merci pour les moments joyeux, pour ta bonne humeur, Maman t'aimes fort …
A mes sœurs Wiem, Asma et Imen qui étaient toujours là pour moi …
A mes frères Amine, Achraf et Aymen qui m'encourageaient tout le temps…
A tous les membres de ma FAMILLE !

Je vous AIME ENORMEMENT
MERCI

« Le plus dur ce n’est pas de sortir de Polytechnique, c’est de sortir de l’ordinaire »

Charles De Gaulle

Remerciement

Je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ma thèse.

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein du Département Technologie et instrumentation pour le monitoring de systèmes complexes (TICS) dans l'équipe Micro-Nanofluidique pour les sciences de la vie et de l'environnement (MILE) au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes du Centre National de la Recherche Scientifique (LAAS-CNRS).

Un immense merci aux membres de mon jury qui ont accepté de juger mon travail. Merci à Mme Corinne Dejous et à Mr Fabien Pascal qui ont accepté la lourde tâche de rapporteur. Vos remarques, vos questions ont contribué à rendre cette thèse de meilleure qualité. Merci aux examinateurs Mr Sulivan Jouanneau et Mr Philippe Arguel vous avez largement contribué grâce à votre intérêt à travers toutes ces questions. Merci encore pour tous vos compliments.

Anne-Marie, merci pour TOUT ! Tout ce que j'ai réalisé au cours de cette thèse j'ai pu le réaliser grâce à TOI. Ton soutien, tes conseils et ta confiance m'ont permis d'avancer professionnellement mais aussi personnellement. Merci pour ta présence aux moments difficiles, j'en suis reconnaissante, MERCI!

ANNE, Tu as suivi mes travaux de loin mais tu as toujours été présente. Dans les coups durs comme dans les bons moments, j'ai apprécié ta présence et ton soutien. MERCI pour TOUT!

Je tiens à remercier aussi les permanents de mon équipe Aurélien, Pierre et Morgan. Merci pour votre écoute et vos encouragements.

Cette thèse n'aurait jamais pu bien se dérouler sans votre présence. Un grand MERCI à mes amis/collègues :

Marion, merci beauté pour ta présence, pour tes encouragements, pour tes corrections ;) pour tes moelleux aux chocolat mmm :D Andréa, merci coach sportif pour tous les entrainements, merci pour ton soutien ☺ MERCI Fadhila, Bayan, Lyne, Mathilde, Ségo, Ruth, Benjamin, Benatou, Firdaous, Yassine, Chayma, Dany, Guillaume, Jeffrey, Inga, Ali Maaziz ;), Asma, Charline, Sandrine, Julien, Yassine, Lorena, Clara, Luca, Hajar, Myriam, Marie, Anaïs, Fabien, Amel, Amr, Rémi, Véro, Nicolas, Nabil, Sabeha, Yousra, Hedhoud, Omar, Sophie….

Merci à vous TOUS !!

Résumé : Le principal objectif de la thèse est d'étudier et de développer un biocapteur dédié au contrôle de la qualité de l'eau. Son mode de fonctionnement sera basé sur l'utilisation de certaines bactéries spécialisées sélectionnées pour leur sensibilité particulière aux molécules organiques. Elles seront immobilisées dans des puits instrumentés conçus pour optimiser les réponses électro-optiques à des stimuli causés par des réactions chimiques et biologiques. Un suivi sera mis en place pour contrôler les paramètres des échanges entre ces bactéries et l'échantillon des eaux usées dans lequel ils sont plongés.

Le matériau utilisé pour développer ces bioMEMS sera choisi afin d'assurer la biocompatibilité et aussi le processus de miniaturisation de la fabrication du dispositif. Ensuite, leur insertion dans une configuration instrumentale sera étudiée pour atteindre les conditions optimales afin de mesurer la demande biochimique en oxygène (DBO) des échantillons d'eau.

En complément, une approche de modélisation des interactions bactéries-oxygène sera entreprise afin de comparer les résultats théoriques et expérimentaux de sorte que la valeur de DBO soit obtenue dans le temps le plus court possible.

Mots clés : Eaux de rejet, BioMEMS, DBO, Bactéries

Abstract : The main objective of the thesis is to study and develop a biosensor dedicated to the water quality control. Its operating mode will be based on the use of some specialized bacteria chosen for their particular sensitivity to organic molecules.

They will be immobilized in instrumented wells designed to optimize their electro-optical responses to stimuli caused by chemical and biological reactions. A monitoring will be set up to control the parameters of exchanges between these bacteria and the wastewater sample in which they are immersed.

The material used to develop these bioMEMS will be chosen in order to ensure biocompatibility and also the miniaturization process of device fabrication. Afterwards, their insertion in an instrumental setup will be studied to achieve the optimal conditions to measure the BOD parameters of the water samples.

In addition to this part, a modeling approach of bacteria-oxygen interactions will be undertaken to compare the theoretical and experimental results so that the BOD value will be obtained in the shortest time possible.

Keywords : Wastewater, BioMEMS, BOD, Bacteria

Table des matières

chapitre1 **1**

1 Mesure de la concentration en polluants organiques dans l'eau : Etat de l'art et problématique **3**
1.1 Problématique générale 4
1.2 Etat de l'art 4
1.2.1 Méthodes conventionnelles de mesure de l'oxygène dissous 5
1.2.2 Méthodes alternatives 8
1.2.3 Dispositifs miniaturisés de mesure de polluants organiques (biodégradables) 12
1.2.4 Conclusions sur l'état de l'art 19
1.3 Objectifs de la thèse 19

2 Développement du capteur à Optode **23**
2.1 Macrosystème à optode 25
2.1.1 Optimisation du système de mesure avec du milieu LB et du glucose . . . 26
2.1.2 Mesure de la concentration en matière organique à l'aide d'un capteur à optode 29
2.2 Microsystème à optode 33
2.2.1 Réalisation du système microfluidique 33
2.2.2 Mesure de la concentration en matière organique à l'aide d'un capteur miniaturisé à optode 37
2.3 Conclusion 40

3 Développement du capteur à résazurine **43**
3.1 Introduction 44
3.2 Qu'est ce que la résazurine? 44
3.3 Préparation de l'échantillon 45
3.4 Mise en place d'une expérience de référence 46
3.4.1 Optimisation du protocole expérimental 47
3.4.2 Etalonnage de la mesure de la concentration en matière organique 49
3.4.3 Conclusion 52
3.5 Ingénierie du microsystème à résazurine 53
3.5.1 Amélioration de la chaîne instrumentale 54
3.6 Conception et réalisation des biopuces 58
3.6.1 Design des biopuces 58
3.6.2 Première génération de biopuce : Biopuces PDMS 59
3.6.3 Deuxième génération de biopuces : Biopuces SU8 63

3.6.4 Troisième génération de biopuces : Biopuces en film DF 70
3.7 Conclusion 80

4 Cas d'étude d'une application toxicologique 83
4.1 Introduction 84
4.2 Application toxicologique 84
4.2.1 Protocole expérimental 84
4.2.2 Souche *E.coli* 86
4.2.3 Souche *Pseudomonas aeroginosa* 89
4.2.4 Souche *Rhizobium radiobacter* 89
4.2.5 Conclusion 92
4.3 Vers une application sur le terrain 93
4.3.1 Protocole expérimental 93
4.3.2 Mélangeur fluidique 97
4.4 Conclusion 101

Conclusion 102

Glossaire 106
A Milieux de culture et produits chimiques 109
A.1 Stérilisation du matériel 109
A.2 Milieux de culture 109
B Préparation de la souche bactérienne 110
B.1 Conservation des souches bactériennes 110
B.2 Cinétique et suivi de la croissance bactérienne 111
C Protocole bactérien de préparation de l'échantillon 113
C.1 Etape de pré-culture 113
C.2 Etape de culture 113
C.3 Etape de lavage des bactéries 114
C.4 Préparation de l'échantillon 114
D Chaîne instrumentale du capteur à Résazurine 114
D.1 Etage d'excitation 114
D.2 Etage de détection 115
E Procédé de fabrication des biopuces Verre/PDMS 115

Annexes 109
Bibliographie 117

Table des figures

1.1 Représentation schématique de l'électrode de Clark (invention 1962) [1]. 6
1.2 Méthode de dosage iodométrique (winkler) [2]. 7
1.3 Schéma du système de mesure de l'optrode [3]. 9
1.4 Sonde Optique du capteur développée par [4]. 9
1.5 Capteur optique d'oxygène dissous [5]. 10
1.6 Système photométrique Nanocolor de la société Marcherey-Nagel [6]. 10
1.7 Pile à combustible microbienne [7]. 12
1.8 Electrode à Oxygène à film épais. [8]. 13
1.9 (A) La plate-forme de mesure comprend un joint en plexiglas, un moulage PDMS micro-fluidique et une micropuce électrochimique. (B) Le système de puce électrochimique micro-fluidique. [9]. 14
1.10 Biocapteur à base de bioréacteur développé par Liu [10, 11]. 15
1.11 (a) une électrode de type Clark classique placée à l'intérieur d'un bioréacteur; (b) une électrode de type Clark modifiée avec de la biomasse concentrée autour de l'électrode; (c) un canal d'électrolyte et une chambre de bioréacteur séparés par une membrane perméable à l'oxygène: 1 - capteur d'oxygène; 2 - protection de type téflon contre la passivation de l'électrode; 3 - échantillon plus biomasse bactérienne; 4 - agitation; 5 - apport d'oxygène; 6 - membrane sandwich ou gel de biomasse bactérienne immobilisée; 7 - échantillon sans biomasse bactérienne; 8 - entrée d'électrolyte saturé d'oxygène; 9 - membrane perméable à l'oxygène; 10 - sortie [12]. 15
1.12 Principe de mesure de la DBO par chimioluminescence [13]. 18
1.13 Courbes de fluorescence au cours du temps de plusieurs échantillons à différentes concentrations en carbone organique [14] 21

2.1 Principe de fonctionnement de l'optode [15]. 24
2.2 Système de mesure FirestingO2 [15]. 25
2.3 a) Prototype du macrosystème, b) Représentation 3D du système à 4 puits à optode, c) 1- Optode collée à l'intérieur du puits et 2- Fibre optique et d) Photo du macrosystème à optode [14] 26
2.4 Reproductibilité des mesures en milieu M9, pour une concentration de 80 mg-Gluc/L et une population bactérienne (*E.coli*) de $0{,}8.10^8$ cell/mL 27
2.5 Erreur de mesure des chaînes de mesure du système FirestingO2 28
2.6 Effet de la concentration bactérienne sur la consommation de l'oxygène dissous . 28
2.7 Effet de la concentration en Glucose sur la consommation de l'oxygène dissous (2.10^8 cell/mL) 30
2.8 Influence de la concentration cellulaire sur la réponse du capteur 31

2.9 Courbes de calibration du macrosystème à optode pour plusieurs concentrations bactériennes . . . 32
2.10 Design des masques des biopuces à optode avec Clewin . . . 33
2.11 Procédé de fabrication de la biopuce Verre/PDMS à optode : Fabrication du moule Si/SU8 (a-d), de la fluidique en PDMS (e-f), du collage de l'optode et du scellement du capot (g-h) . . . 34
2.12 Moule Si/SU8 des biopuces à optode . . . 35
2.13 Biopuce Verre/PDMS à optode . . . 36
2.14 Support biopuce . . . 37
2.15 Influence de la concentration bactérienne pour une concentration en glucose de 80 mg/L . . . 38
2.16 Influence de la concentration en glucose pour une concentration bactérienne de 2.10^8 cell/mL . . . 38
2.17 Influence de la concentration bactérienne sur la consommation en oxygène . . . 39
2.18 Influence de la concentration en matière organique pour une concentration bacétrienne de 2.10^8 cell/mL : à gauche pour le microsystème et à droite pour le macrosystème . . . 40

3.1 Schéma simplifié de la chaîne respiratoire des bactéries . . . 44
3.2 Réaction de la réduction de la résazurine . . . 45
3.3 Spectre d'absorbance (gauche) et spectre d'émission en fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation de 560nm (droite) du couple résazurine/résorufine . 45
3.4 Photo lecture multimodal : varioskan [16] . . . 46
3.5 Modules d'excitation et de détection optique du Varioskan . . . 46
3.6 a) Evolution dans le temps du signal de fluorescence pour différentes concentrations en résazurine, pour une concentration en carbone de 9,6 mg/L et une population d'*E.coli* de $2.10^8 cell/ml$ b) Variation du signal de fluorescence en fonction de la concentration en résazurine dans les mêmes conditions . . . 47
3.7 Influence de l'âge de la boîte de pétri sur le niveau d'émission de fluorescence . . 48
3.8 Ecart du niveau de fluorescence induite entre boîtes de pétri . . . 49
3.9 Effet de la concentration bactérienne sur le signal de fluorescence émis, en fonction de la concentration en glucose . . . 50
3.10 Effet de la concentration bactérienne sur la corrélation entre activité respiratoire et concentration en carbone . . . 51
3.11 Récapitulatif des gammes de détection de la matière organique en fonction des densités bactériennes . . . 52
3.12 Courbe de l'activité bactérienne en fonction de la concentration en matière organique pour une densité bactérienne de $2.10^8 cell/mL$ . . . 52
3.13 Organigramme de la chaîne instrumentale du système de détection à résazurine . 53
3.14 Signal à vide détecté par les photodiodes . . . 54
3.15 Moyenne de la puissance lumineuse émise par les leds pour différents courants de polarisation (de 0 à 20 mA) . . . 55
3.16 Spectre de transmission des deux filtres d'excitation et du filtre d'émission . . . 56
3.17 Spectre de la densité optique des deux filtres d'excitation et du filtre d'émission 56
3.18 Signal à vide avec les anciens filtres d'excitation et les nouveaux filtres d'excitation 57
3.19 Supports des filtres d'excitation et d'émission permettant une bonne étanchéité optique . . . 57

3.20 Signal à vide de la chaîne instrumentale après étanchéité optique 58
3.21 Design de la biopuce à 8 puits [14] 58
3.22 Masque de la biopuce à résazurine 59
3.23 Photo de la biopuce en verre/PDMS (vue de dessus et vue de côté) 59
3.24 Signal d'émission de fluorescence de la résorufine mesurée dans les biopuces en Verre/PDMS pour une gamme de glucose 0 à 400 mg/L avec une concentration bactérienne de 2.10^8cell/mL 60
3.25 Courbe étalon avec les biopuces Verre/PDMS pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose 61
3.26 Réduction de la résorufine dans le temps en fonction de la concentration en glucose 61
3.27 Rapport signal/bruit en fonction de la concentration en glucose pour les biopuces Verre/PDMS 62
3.28 Signal de réduction de la résorufine avec des puces en Verre/PDMS à l'air libre et en enceinte sous Argon (40mgGluc/L) 62
3.29 Biocompatibilité de la SU8 avec l'*E.coli* : à gauche le signal de fluorescence des bactéries mortes et vivantes à t=0 et à t=20 heures et à droite une image de microscope optique à t=20 heures. 63
3.30 Procédé de fabrication de la biopuce Verre/SU8 64
3.31 Photo d'une biopuce SU8/Verre 66
3.32 Images MEB des biopuces SU8/Verre 67
3.33 Signal de fluorescence de la résorufine pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose avec des biopuces en Verre/SU8 avec une concentration bactérienne de 2.10^8cell/mL 68
3.34 Courbe d'étalonnage avec les biopuces Verre/SU8 pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose 68
3.35 Signal de fluorescence par heure en fonction de la concentration en glucose . . . 69
3.36 Rapport signal/bruit en fonction de la concentration en glucose pour les biopuces Verre/SU8 69
3.37 Biocompatibilité du film DF avec l'*E.coli* 70
3.38 Problème de décollage de la fluidique en DF sur un substrat verre B33 71
3.39 Procédé de fabrication de la fluidique Verre/Film DF 72
3.40 Contrainte mécanique suite à l'empilement de films DF pour nos biopuces 73
3.41 Images MEB des biopuces DF/Verre 74
3.42 Epaisseur du film DF des réservoirs des fluidiques avant recuit et après recuit . . 74
3.43 Problème de collage au fond des puits du capot en DF 75
3.44 Procédé de capotage en verre de la fluidique Verre/Film DF 76
3.45 Puces DF avec la première génération de connectiques fluidiques intégrées dans la chaîne instrumentale 77
3.46 Connectiques fluidiques finaux permettant une garantie de remplissage sans fuites 78
3.47 Signal de fluorescence de la résorufine pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose avec des biopuces en Verre/film DF 78
3.48 Courbe d'étalonnage avec les biopuces Verre/film DF pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose 79
3.49 Signal de fluorescence en mV par heure en fonction de la concentration en glucose avec les biopuces Verre/DF 79
3.50 Rapport signal/bruit en fonction de la concentration en glucose pour les biopuces Verre/DF 80

3.51 Comparaison des courbes étalon des trois générations de biopuces 81
3.52 Spectre d'autofluorescence des différents matériaux à travers les puits des puces PDMS/Verre, SU8/Verre et DF/Verre. L'excitation a été faite à 545nm et la détection a été enregistrée entre 500 et 900nm 82

4.1 Les cinétiques de la respiration d'*E.coli* en fonction de la concentration en PCP : à gauche pour le minisystème et à droite pour le microsystème 86
4.2 Taux d'inhibition du PCP pour l'*E.coli* en fonction de la concentration en PCP pour les mini et microsystèmes 87
4.3 Courbe de corrélation entre mini et micro systèmes 88
4.4 Courbe d'étalonnage entre les deux systèmes de mesure utilisés 88
4.5 Cinétique de la respiration de *R.Radiobacter* en fonction de la concentration en PCP : à gauche minisystème et à droite microsystème 89
4.6 Cinétique de la respiration de *R.Radiobacter* en fonction de la concentration en PCP : à gauche minisystème et à droite microsystème 90
4.7 Taux d'inhibition du PCP pour *R.Radiobacter* en fonction de la concentration en PCP pour les mini et microsystèmes 91
4.8 Courbe de corrélation entre mini et micro système pour *R. radiobacter* 91
4.9 Taux d'inhibition (%) pour les souches bactérienne *E.coli* et *R.radiobacter* : à droite pour le microsystème et à gauche pour le minisystème 92
4.10 Courbe de corrélation entre mini et micro systèmes pour les souches R. radiobacter et E.coli 92
4.11 Bactéries *E.coli* lyophilisées stockées dans des récipients en verre à -20°C 94
4.12 Cinétique de la respiration d'*E.coli* lyophilisés en fonction de la concentration en PCP : à gauche minisystème et à droite microsystème 94
4.13 Taux d'inhibition du PCP pour l'E.coli lyophilisés en fonction de la concentration en PCP pour les mini et microsystèmes 95
4.14 Courbe de corrélation entre mini et micro systèmes pour E.coli lyophilisés 96
4.15 Taux d'inhibition du PCP : en haut souches lyophilisées et fraîches à droite pour le minisystème et à gauche pour le microsystème, en bas mini et microsystème à droite pour souches fraîches et à gauche pour souches lyophilisées 96
4.16 A gauche le circuit complet et à droite le boitier du mélangeur ouvert 97
4.17 Schéma simplifié du mélangeur 98
4.18 Schéma de la puce microfluidique de mélange 98
4.19 Á gauche le boitier du mélangeur fluidique développé et à droite la puce de mélange 99
4.20 Puce microfluidique de mélange 99
4.21 Cinétique de la respiration de l'*E.coli* lyophilisés avec et sans mélangeur en fonction de la concentration en PCP : à gauche minisystème et à droite le microsystème 100
22 Boîte de petri à LB gélosé 110
23 Boîte de petri d'E. coli strillée avec une anse en plastique 110
24 E. coli isolées sur boîte de pétri après 24 heures d'incubation 111
25 Congélation en billes de l'E.coli 111
26 Corrélation entre la densité optique mesurée à 590nm et le nombre de colonies par ml. 112
27 Suivi de croissance de l'E.coli 113
28 Etage d'excitation du capteur à résazurine [14] 114
29 Etage d'émission du capteur à résazurine [14] 115

30 Procédé de fabrication de la biopuce Verre/PDMS à résazurine : Fabrication du moule Si/SU8 (a-d), de la fluidique en PDMS (e-f), du scellement du capot et de la fluidique (g) 116

Liste des tableaux

1.1 Comparaison des méthodes de référence [17] [18] 8
1.2 Biocapteurs électrochimiques 17

2.1 Oxygène consommé par heure (mg/L/h) et temps de mesure (h) en fonction de la concentration bactérienne pour du milieu LB sans dilution 29
2.2 Vitesse de consommation de l'oxygène dissous par les bactéries (mg/L/h) et la sensibilité ($[O_2]$/[Glucose]) 31
2.3 Oxygène consommé (mg/L) et temps de mesure (h) en fonction de la concentration bactérienne et du taux de la matière organique 32
2.4 Protocole de réalisation de biopuces à optode 35

3.1 Procédé de fabrication de la fluidique Verre/SU8 66
3.2 Protocole de réalisation de la fluidique Film DF/Verre 73
3.3 Procédé de capotage de la fluidique Verre/DF avec du Verre 76
3.4 Sensibilité en mV/[mgGluc/L] pour les trois générations de biopuces 81

4.1 Respiration de l'*E.coli* en mg/L/h pour le microsystème et RFU/h pour le minisystème pour chaque concentration en PCP (de 0 à 200 mg/L) 86
4.2 Taux d'inhibition (%) du PCP sur la respiration bactérienne de l'*E.coli* mesuré par les micro et mini systèmes 87
4.3 Respiration de l'*R.radiobacter* en mg/L/h pour le microsystème et RFU/V pour le minisystème pour chaque concentration en PCP (de 0 à 200 mg/L) 90
4.4 Taux d'inhibition (%) du PCP sur la respiration bactérienne de la souche *R.radiobacter* pour les micro et mini systèmes 91
4.5 Respiration de l'E.coli lyophilisés en mg/L/h pour le microsystème et en RFU/h pour le minisystème pour chaque concentration en PCP (de 0 à 200 mg/L) . . . 95
4.6 Taux d'inhibition (%) du PCP sur la respiration bactérienne de l'E.coli lyophilisés pour les micro et mini systèmes 95
4.7 Longueurs des différents canaux de la puce microfluidique 98
4.8 Taux d'inhibition du PCP en (%) avec et sans mélangeur pour les deux systèmes de mesure 100
4.9 Comparaison de notre capteur avec deux capteurs miniaturisés dans la littérature 104
10 Protocole de réalisation de biopuces Verre/PDMS à résazurine 116

Introduction générale

Les normes environnementales européennes imposent de plus en plus un contrôle efficace de la qualité des eaux. Ceci implique le développement d'une instrumentation appropriée en termes techniques et économiques. Les besoins sont de pouvoir disposer de systèmes rapides, portables et fiables pour la détection des polluants. Ces capteurs ont pour objectif de fournir une information précoce sur le respect des valeurs autorisées par les règlementations européennes et aussi d'identifier d'éventuelles menaces.

Les méthodes conventionnelles pour la détection des polluants dans les eaux sont très sensibles, performantes et fiables. Néanmoins, elles présentent des contraintes d'espace de travail, de portabilité et de mesure en ligne. Ce problème constitue un défi considérable pour les chercheurs. En effet, plusieurs équipes de recherche ont travaillé sur le développement de méthodes alternatives permettant d'apporter des réponses aux questions. Une approche pertinente repose sur le développement de biocapteurs miniaturisés optiques ou électrochimiques basés sur des bioéléments bactériens.

Cette thèse vise à développer un système miniaturisé portable à base de bioéléments bactériens pour mesurer l'effet des polluants organiques. Une plate-forme complète, composée d'un système de détection optique et d'une puce microfluidique, a été réalisée. Le principe de détection repose sur le suivi de la réponse métabolique du bioélément bactérien en présence de polluants organiques biodégradables ou de substances toxiques dans l'échantillon à analyser. La réponse du capteur est par conséquent représentative de la pollution de l'échantillon.

Etant donné la multidisciplinarité de ce projet (biologie, ingénierie système et microtechnologies), le travail a été effectué en collaboration avec le laboratoire GEPEA (Génie des procédés pour les écotechnologies et les bioressources) de la Roche sur Yon.

Ce manuscrit présente l'ensemble des travaux réalisés en quatre chapitres. Dans un premier chapitre, nous mettons en avant la problématique tout en détaillant l'état de l'art des technologies et méthodes de mesure de la qualité de l'eau, les systèmes de détection présents ainsi que leurs limitations, nous identifions les verrous scientifiques. Dans un deuxième chapitre, nous présentons l'approche macrosystème/microsystème à optode choisie. Un premier système millifluidique a été conçu permettant de donner une lecture directe du taux d'oxygène dissous consommé. Sur le même principe de transduction, une biopuce fluidique a été conçue pour tester la miniaturisation de ce dernier. Le troisième chapitre propose une approche alternative permettant de résoudre les limitations du premier système. Il s'agit d'un système optique à base de fluorophore (Résazu-

rine) traduisant le métabolisme respiratoire des souches bactériennes en présence de polluants. Le dernier chapitre présente la mise en oeuvre de la plateforme complète pour la détection de pesticides. La réponse du système avec différentes souches bactériennes est présentée. Ce dernier chapitre illustre une première version de la plateforme finalisée permettant de faire des mesures sur site, avec des protocoles simples, un système de mélange fluidique et un système de transduction.

Nous finirons ce manuscrit par une synthèse des résultats majeurs obtenus et par une présentation des perspectives nombreuses que ces travaux ont permis de dégager.

Chapitre 1

Mesure de la concentration en polluants organiques dans l'eau : Etat de l'art et problématique

Sommaire

1.1 Problématique générale **4**

1.2 Etat de l'art **4**

1.2.1 Méthodes conventionnelles de mesure de l'oxygène dissous 5

1.2.1.1 Méthode électrochimique 5

1.2.1.2 Dosage iodométrique de Winkler 6

1.2.2 Méthodes alternatives 8

1.2.2.1 Mesure optique de l'oxygène dissous 8

1.2.2.2 Mesure par médiateur rédox de la matière organique biodégradable 11

1.2.2.3 Mesure du potentiel électrique 11

1.2.3 Dispositifs miniaturisés de mesure de polluants organiques (biodégradables) 12

1.2.3.1 Biocapteurs électrochimiques à bactéries 13

1.2.3.2 Méthode optique 16

1.2.3.3 Bilan partiel sur les systèmes miniaturisés 18

1.2.4 Conclusions sur l'état de l'art 19

1.3 Objectifs de la thèse **19**

1.1 Problématique générale

Le traitement et le suivi de la qualité des eaux usées suscitent un intérêt majeur depuis quelques années. En effet, la contamination de l'eau peut affecter la santé humaine et peut avoir des conséquences importantes sur l'environnement. La détection de polluants dans l'eau est ainsi devenue un enjeu de santé publique et économique de premier ordre. Des stratégies de suivi et de surveillance de la qualité de l'eau ont été développées aux échelles nationales et internationales. Ainsi, plusieurs organismes et agences internationales : le Bureau de Recherche Géologique et Minière (BRGM) [19], l'"Europe Water Framework Directive" (EU WFD) [20], la "United States Environmental Protection Agency" [21], l'association américaine de santé publique (APHA) [22],..., ont mis en place des normes pour la surveillance des eaux.
Ces diverses règlementations ont engendré un effort de recherche important afin de développer des systèmes de détection sensibles et fiables avec des dispositifs d'alerte en ligne soit en sortie des sites industriels soit pour la surveillance des cours d'eau. Comme tout domaine de recherche en pleine expansion, le suivi de la qualité des eaux mobilise la communauté scientifique et on peut dénombrer envion 200000 publications par an dans le domaine depuis 2014 [1].

1.2 Etat de l'art

Selon ses caractéristiques, l'eau répond à plusieurs usages tels que l'irrigation, les besoins domestiques humains, l'industrie...[23].
La liste des subtances prioritaires à détecter est publiée par le journal officiel de l'Union Européenne. Les principaux indicateurs de la qualité des eaux sont résumés ci-dessous :

- **les Matières en Suspension Totale (MEST) :** Elles représentent la quantité de matière organique et minérale non dissoute dans l'eau. Ces matières en suspension peuvent engendrer la turbidité de l'eau, diminuer l'oxygène dissous et perturber la respiration des organismes [24].
- **Les caractéristiques physicochimiques :** Le potentiel d'hydrogène, la température, la conductivité, la concentration en oxygène dissous, la turbidité des hydrocarbures, l'indice UV, la transparence ... [25].
- **Les métaux lourds :** Le cuivre, le zinc, le mercure,... peuvent être très toxiques et causer de graves problèmes de santé. Ainsi, la surveillance de la concentration de ces derniers est une partie essentielle du traitement des eaux [26].
- **Les intrants et les rejets ménagers :** Les activités agricoles et les déchets ménagers sont principalement l'origine de la présence des nutriments tels que l'azote, le phosphore, le nitrite, le nitrate, le calcium, le potassium et l'ammoniac. Une forte concentration de ces derniers contribue à la prolifération de la biomasse [27].

1. Publications comportant le terme « WATER MONITORING* »à Google Scholar

- **Les pesticides :** ce sont des contaminants organiques utilisés principalement en agriculture afin de protéger les cultures et améliorer le rendement de la production. Le contrôle de la concentration de ces derniers dans les eaux est primordial. Ils représentent une menace pour la faune et la flore [28].

- **La concentration en oxygène dissous :** elle est un marqueur de la respiration bactérienne dans les eaux de rejet et donc des processus de la dégradation de la matière organique ou inversement de la présence de matières toxiques qui inhibent l'activité respiratoire des bactéries.

C'est sur ce dernier point que nous positionnons cette thèse, en raison de la dualité de cette approche c'est à dire sa capacité à suivre la dégradation de la matière organique bio-dégradable ou à détecter la présence d'espèces toxiques.
Le but de ce premier chapitre est de dresser l'état de l'art dans ce domaine et de motiver l'utilisation des microtechnologies pour la conception et la réalisation d'un capteur miniaturisé.
Nous distinguerons trois types de méthodes notamment les méthodes conventionnelles (méthodes décrites par des normes internationales ISO), les méthodes dites alternatives (qui viennent améliorer les méthodes conventionnelles) et les biocapteurs (dispositifs miniaturisés).

1.2.1 Méthodes conventionnelles de mesure de l'oxygène dissous

1.2.1.1 Méthode électrochimique

L'électrochimie est une discipline régissant les transferts de charge entre deux conducteurs : une solution électrolytique (conducteur ionique) permettant le transport de charges par déplacement d'ions et un métal ou un semi-conducteur (conducteur électronique) assurant le transport de charges par déplacement d'électrons [29]. Une différence de potentiel apparait lors de la mise en contact des deux conducteurs : il s'agit d'un potentiel électrique non mesurable dans l'absolu mais repérable par rapport à une électrode de référence.
La méthode standard se base sur l'utilisation d'une électrode de Clark [1] présentée sur la figure 1.1.
Il s'agit d'une électrode qui mesure la concentration en oxygène dissous en milieu liquide selon la réaction suivante [30] :

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O \tag{1.1}$$

Le système complet est composé d'une cathode en platine et d'une anode en argent qui sont plongées dans un électrolyte et isolées de la chambre de réaction par une membrane mince en teflon. Cette dernière est perméable à l'oxygène moléculaire et imperméable à l'eau et aux ions. Une tension appliquée entre l'anode et la cathode induit une réduction électrolytique du dioxygène diffusant à travers la membrane selon l'équation 1.1.

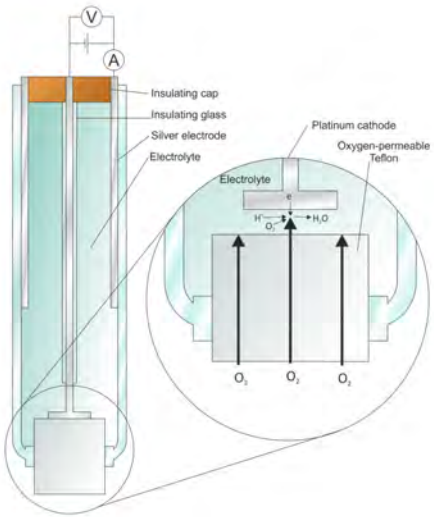

FIGURE 1.1 – Représentation schématique de l'électrode de Clark (invention 1962) [1].

Le courant qui s'établit entre les deux électrodes est proportionnel à la concentration en oxygène dissous présent dans l'échantillon. L'expression de Butler-Volmer (équation 1.2) nous permet de remonter à la concentration exacte en oxygène dissous[31].

$$I_{lim} = \frac{zFD_{eff}}{\delta}C^* \tag{1.2}$$

Où I_{lim} est le courant limitant, z est le nombre d'électrons impliqués dans la réaction à l'électrode, D_{eff} est le coefficient de diffusion effectif, δ l'épaisseur de la couche de diffusion, F la constante de Faraday ($96500 C.mol^{-1}$), C^* est la concentration de l'espèce électroactive (l'oxygène). L'électrode de Clark nécessite un entretien spécifique de rinçage, de fonctionnalisation et d'étalonnage. Une maintenance importante est nécessaire ainsi qu'un grand espace de travail.

1.2.1.2 Dosage iodométrique de Winkler

Il s'agit d'un dosage indirect de l'oxygène dissous dans une solution. Cette méthode utilise deux états d'oxydation de l'iode. Le chlorure de manganèse ($MnCl_2$) est dissout dans l'échantillon à doser. Un précipité d'hydroxyde de manganèse ($Mn(OH)_2$) est formé selon l'équation 1.3. Après oxydation, Mn^{2+} et Mn^{3+} forment un précipité de couleur brune ($Mn(OH)_3$) (équation 1.4).
A ce stade, de l'acide sulfurique concentré est rajouté pour arrêter l'oxydation du manganèse : les précipités de manganèse retrouvent leurs formes ioniques (Mn^{2+} et Mn^{3+}).

$$Mn^{2+} + 2OH^- \rightarrow Mn(OH)_2 \tag{1.3}$$

$$Mn(OH)_2 + 1/4O_2 + 1/2H_2O \rightarrow Mn(OH)_3 \tag{1.4}$$

Avec l'ajout de l'iodure de potassium (KI) (en excès), l'ion iodure est oxydé par les ions Mn^{3+} uniquement.

La concentration de dioxygène est donc strictement stoechiométrique à la quantité de Mn^{3+} qui va intégralement réagir avec l'iode en l'oxydant en diiode (équation 1.5).

$$Mn(OH)_3 + I^- + 3H^+ \rightarrow Mn^2 + +3H_2O + 1/2I_2 \tag{1.5}$$

La dernière étape sera le dosage du diiode par du thiosulfate de sodium en présence d'un indicateur coloré (équation 1.6) [2, 18].

$$2S_2O_3^{2-} + I_2 \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2I^- \tag{1.6}$$

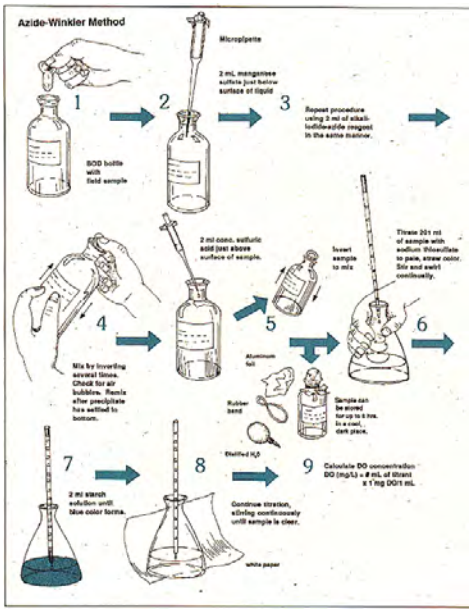

FIGURE 1.2 – Méthode de dosage iodométrique (winkler) [2].

Les deux méthodes standards (électrochimique et iodométrique) ont une grande sensibilité. Ces méthodes ont été testées sur des échantillons réels dans lesquels plusieurs souches bactériennes récoltées dans des boues actives étaient présentes. Plusieurs versions commercialisées, appliquant ces deux méthodes, ont vu le jour.
Cependant, l'utilisation de ces méthodes présente des limites considérables car elles impliquent des procédures complexes, des équipements coûteux et des opérateurs qualifiés pour obtenir des résultats reproductibles [32, 33].
La durée de mesure est un facteur contraignant pour des mesures fréquentes. Aussi, l'utilisation de la méthode de dillution, l'impossibilité de lire les mesures avant la fin de l'incubation et l'impossibilité de faire des mesures sur site représentent des inconvénients majeurs [34].
Le tableau récapitulatif ci-dessous présente les avantages et les limites des méthodes conventionnelles citées précédemment (tableau 1.1). Ces deux méthodes seront nommées par « Méthodes standards »dans la suite du document.

Méthode	Avantages	Inconvénients
Iodométrie (Winkler)	Méthode normalisée Robustesse et fiabilité Bonne sensibilité	Mesure indirecte Durée de mesure Coût Dosage manuel
Electrochimie (Electrode Clark)	Mesure directe Méthode commercialisée Méthode normalisée	Entretien des électrodes Durée de mesure Variabilité de mesure

TABLE 1.1 – Comparaison des méthodes de référence [17] [18]

1.2.2 Méthodes alternatives

Compte tenu de toutes les limites des méthodes standards, des méthodes alternatives ont été développées afin de remédier à quelques inconvénients exposés ci-dessus.
Elle apportent des améliorations principalement au niveau de la sensibilité, la sélectivité, la gamme de mesure, la simplicité de mesure, le coût de la mesure et la maintenance [35]. Ces méthodes ne résolvent cependant pas le problème de la durée de la mesure importante, en particulier dans le suivi de la biodégradation organique [36].
Ce paragraphe rapporte quelques-uns des developpements les plus remarquables.

1.2.2.1 Mesure optique de l'oxygène dissous

La détection est généralement basée sur l'intéraction entre un fluorophore et l'oxygène qui provoque la désactivation de la fluorescence. Ce processus de désactivation de la fluorescence dynamique liée à l'oxygène est représenté par les équations de Stern-Volmer (équations 1.7, 1.8 et 1.9) :

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv} pO_2 \tag{1.7}$$

$$K_{sv} = k\tau_0 \tag{1.8}$$

$$k = \alpha D \tag{1.9}$$

Où I est le signal de fluorescence, I_0 et τ_0 sont respectivement le signal de fluorescence et la durée de vie à l'état excité du fluorophore à l'absence d'oxygène, K_{sv} est la constante de Stern-Volmer, k est la constante biomoléculaire de la diffusion dépendante de la désactivation, D est le coefficient de la diffusion du fluorophore, pO_2 est la pression partielle de l'oxygène et α est le coefficient de solubilité.
L'équipe de Xu a mis au point [37] une sonde optique d'oxygène à base d'un complexe solide de $Ru(4,7\text{-}Ph-2phen)-3Cl-2,6H_{20}$. Il s'agit d'un désactivateur chimique de la fluorescence dynamique : son intéraction avec l'oxygène provoque une diminution de l'émission de la fluorescence. Cette diminution est proportionnelle à la concentration en oxygène dissous dans l'échantillon.
L'équipe allemande de Klimant [3] a développé un capteur d'oxygène à fibre optique nommé

« optrode »destiné à mesurer le taux d'oxygène en milieu marin riche en bactéries. Sur le même principe que la sonde optique développée par Xu [37], un fluorophore (pouvant être désactivé par l'oxygène) est immobilisé sur la sonde et le tout est relié à une fibre optique. L'oxygène dissous est mesuré à travers un système optoélectronique représenté par la figure 1.3.

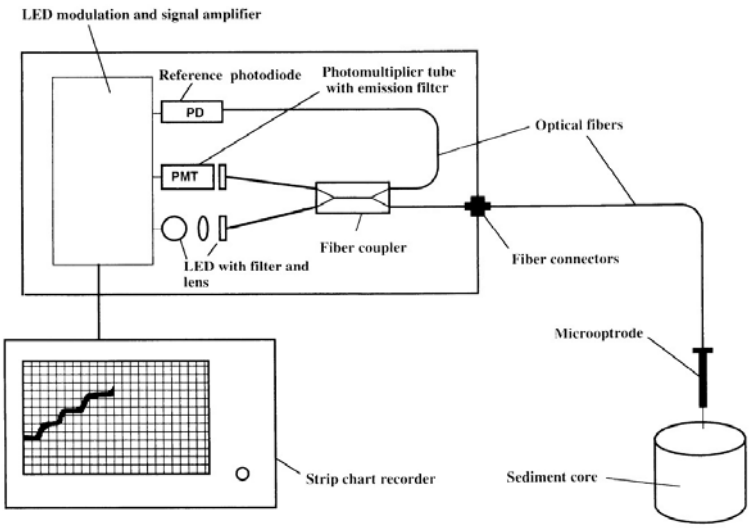

FIGURE 1.3 – Schéma du système de mesure de l'optrode [3].

Une sonde optique a été conçue par la suite par Mcdonagh et Mcevoy [38, 4] en utilisant une technique sol-gel. La sonde est présentée par la figure 1.4. La réponse de ce capteur montre une haute performance avec un bon rapport signal sur bruit et une très bonne répétabilité, une limite de détection inférieure à 10 ppm avec une bonne stabilité de fonctionnement sur plusieurs mois.

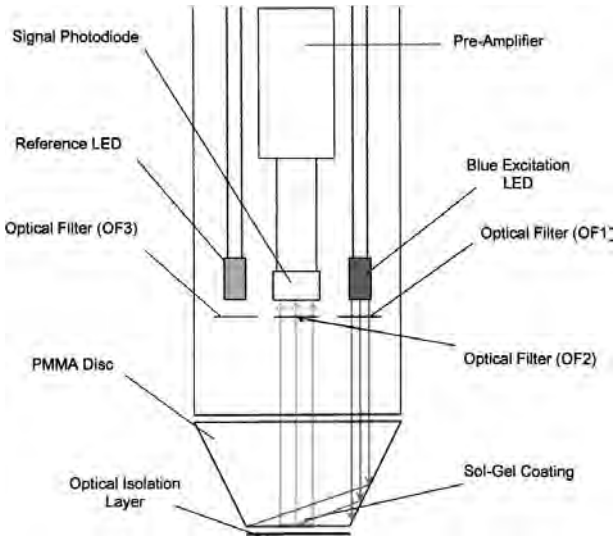

FIGURE 1.4 – Sonde Optique du capteur développée par [4].

Plus tard, Xiong et Noor [5, 39] ont développé d'autres sondes optiques sensibles à l'oxygène. La première [39] est composée de $Ru(bpy)3Cl_2$ adsorbé sur un revêtement de silice-Ni-P. A

travers une fibre optique, une mesure directe de la quantité d'oxygène dissous est faite. Une fibre optique à base de Ruthénium complexe a été conçue par Noor [5] pour suivre et mesurer les cultures aquatiques (figure 1.5).

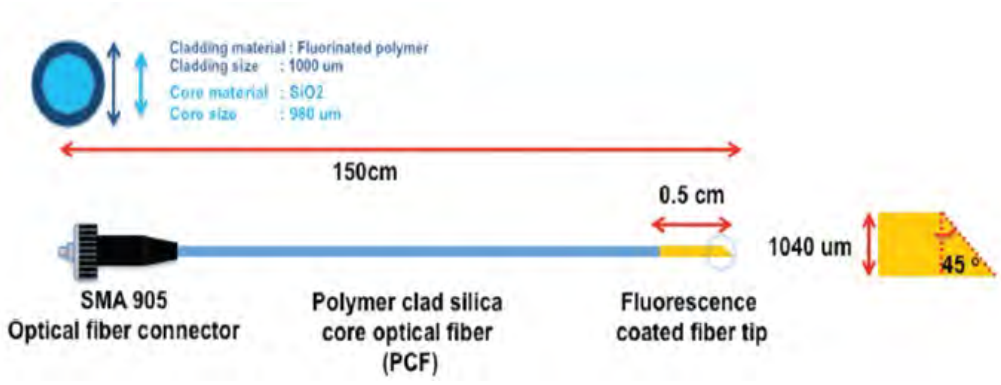

FIGURE 1.5 – Capteur optique d'oxygène dissous [5].

Les principaux avantages de cette méthode sont l'entretien moins conséquent par rapport aux méthodes conventionnelles et pas de consommation de l'oxygène dissous par le capteur [3]. Le problème de la durée de la mesure reste néanmoins non résolu.
Des systèmes commercialisés ont vu le jour sous forme de kits prêts à l'emploi. Le kit LCK de la société Hach se base sur l'ajout de réactifs aux échantillons. Après incubation de 5 jours, un colorant rouge se forme dont la nuance traduit la concentration en oxygène dissous [40]. Une mesure par spectrophotométrie de cette nuance permet l'estimation de la consommation de l'oxygène par les microorganismes et permet par exemple de déduire la valeur de la demande biochimique en oxygène (DBO) à travers différents modèles prédictifs.
Le système Nanocolor de la société allemande Marcherey-Nagel utilise une méthode de mesure photométrique [6]. Il reproduit les mêmes étapes que la méthode iodométrique de Winkler (dilution des échantillons à analyser, incubation à 20°C dans une pièce sombre, temps de mesure). Il s'agit d'un système à cuvettes et la concentration en oxygène est mesurée avant et après la période d'analyse. La dernière version du spectrophotomètre Nanocolor (figure 1.6) est une version numérisée avec un affichage des résultats de l'analyse de l'échantillon.

FIGURE 1.6 – Système photométrique Nanocolor de la société Marcherey-Nagel [6].

Ces systèmes industriels ont le même principe que les méthodes standards [17, 41].

Ils ont permis d'élargir la gamme de détection jusqu'à 1650 mgO_2/L mais le temps de mesure reste du même ordre de grandeur que les méthodes conventionnelles (5 jours).

1.2.2.2 Mesure par médiateur rédox de la matière organique biodégradable

Plusieurs capteurs ont été développés dans la littérature se basant sur des médiateurs rédox. Habituellement, les micro-organismes oxydent la matière organique en condition aérobique. Cependant, en présence d'un médiateur rédox, ce dernier agit comme un accepteur d'électrons à la place de l'oxygène [42, 43, 44, 45, 46].
La quantité du médiateur rédox réduit par la réaction de biodégradation est directement proportionnelle à l'activité métabolique des microorganismes et donc à la quantité de matière organique biodégradable.
L'ajout d'un substrat à un milieu contenant un excès d'un médiateur rédox entraîne une augmentation de l'activité métabolique des bactéries et de la quantité de médiateur réduit. La réoxidation de ce dernier génère un courant quantifiable par une méthode coulométrique [47] ou ampérométrique [42].
Les travaux de Pasco [47] et de Yoshida [42] dans les années 2000 ont permis le développement de capteurs basés sur ce principe.
L'équipe de Learoyd [44] a étudié le taux de réduction de sept colorants rédox par treize souches bactériennes. Différentes combinaisons de bactéries et colorant rédox ont été faites. Le bleu de toluidine et l'éthosulfate de phénazine ont été les plus rapidement réduits par la majorité des bactéries.
Le principal avantage est qu'avec ces médiateurs rédox, la réaction de biodégradation ne dépend pas de l'oxygène dans le milieu réactionnel [47]. De plus, avec un médiateur rédox, il n'est pas nécessaire de diluer les échantillons. Enfin, la durée d'analyse est plus courte que pour les méthodes standards étant donné que le médiateur rédox accélère la biodégradation.

1.2.2.3 Mesure du potentiel électrique

Des équipes de recherche ont travaillé sur le développement de capteurs basés sur le principe des piles à combustible microbiennes. Comme indiqué dans la figure 1.7, celles-ci sont composées d'un compartiment anaérobie avec une anode (électrode négative) et un compartiment aérobie avec une cathode (électrode positive) ; les deux étant séparés par une membrane. Dans le compartiment anaérobie, les microorganismes dégradent la matière organique et génèrent des électrons et des protons [7, 48]. Les protons migrent à travers la membrane vers la cathode, où l'oxygène est réduit pour former de l'eau (H_2O) et les électrons passent de l'anode à la cathode par un circuit électrique externe.

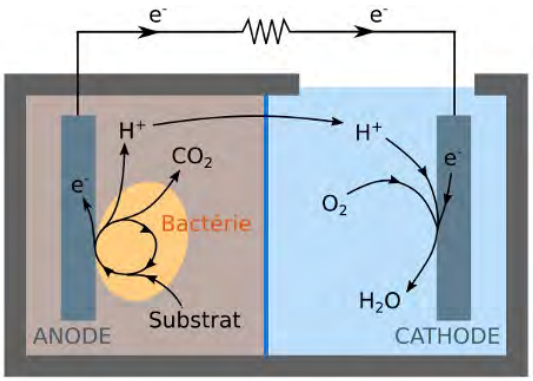

FIGURE 1.7 – Pile à combustible microbienne [7].

La circulation des électrons dans le circuit électrique génère un courant mesurable proportionnel à l'activité de biodégradation microbienne, permettant ainsi l'estimation de la DBO d'un échantillon. Les piles à combustible microbiennes développées par [49] montrent une bonne corrélation avec la DBO_5 obtenue avec la méthode standardisée ($r^2 = 0,999$).
Plusieurs travaux ont été centrés sur cette technique [49, 50, 51, 52, 53] mais peu ont été évalués avec des échantillons environnementaux réels. Ces méthodes ont permis d'élargir la gamme de détection jusqu'à 0-200 mg/L [7].

1.2.3 Dispositifs miniaturisés de mesure de polluants organiques (biodégradables)

Malgré leur forte robustesse et leurs bonnes performances, les méthodes conventionnelles présentent des limites conséquentes pour des mesures fréquentes. Les méthodes alternatives développées afin d'améliorer les caractéristiques de ces dernières présentent des limites similaires liées principalement au fait que les mesures sont différées, ne sont pas réalisées sur site et nécessitent également une durée de mesure importante [54]. L'intégration et la miniaturisation des capteurs offrent des perspectives intéressantes pour améliorer les performances des mesures en milieux biologiques.
Des recherches de plus en plus nombreuses essayent de répondre à ce besoin en développant une grande variété de biocapteurs millimétriques et micrométriques.
Les biocapteurs sont des dispositifs de détection analytiques qui traduisent un phénomène biologique par un signal détectable et mesurable. Ils se composent de deux parties principales : le biorécepteur et le système de transduction dédié au biorécepteur.
Les éléments de détection biologiques représentent la partie du biocapteur qui intéragit avec l'analyte d'intérêt. Par analogie avec les méthodes conventionnelles, nous limiterons notre étude aux capteurs bactériens. Les biocapteurs bactériens sont couramment utilisés pour la surveillance de l'environnement [55, 56, 57, 58]. Ils sont capables de fournir des informations sur les niveaux de pollution [59]. Le transducteur physique convertit l'activité biologique en un signal lié à la concentration de l'analyte d'intérêt [59]. Plusieurs types de transducteurs physiques peuvent être

intégrés sur un biocapteur.
Dans cette partie, nous présenterons les différents biocapteurs développés en fonction de la méthode de transduction choisie [60, 61] en nous focalisant sur les transductions électrochimique et optique qui sont les plus couramment utilisées.

1.2.3.1 Biocapteurs électrochimiques à bactéries

Les méthodes électroanalytiques offrent un grand potentiel de surveillance des échantillons d'eau car elles sont simples à utiliser et suffisamment sensibles. De plus, elles sont très facilement miniaturisables.
De nombreux biocapteurs électrochimiques ont été développés pour détecter la biodégradation dans les eaux [50, 55, 62, 63].
Les bactéries sont immobilisées sur les surfaces des électrodes ou confinées dans un puits, avec ou sans étape de prétraitement. Cette dernière permet d'optimiser le procédé et donc d'avoir une mesure plus rapide.
Les techniques d'immobilisation peuvent être classées en trois groupes. Dans le premier cas, les bactéries sont piégées à l'intérieur d'un réseau polymère qui limite leur mouvement. Plusieurs matrices ont été évaluées, dont l'alginate [64], l'agarose [65, 66], le polycarbamoxyl sulfonate (PCS) [67, 8, 68], un gel de silice [69], un matériau composite de type sol-gel (silice et poly (alcool vinylique) -polymère greffé (vinylpyridine)) [70, 71, 72, 73], un sol-gel d'Al_{2O3} [74], la résine ENT-3400 (une résine de réticulation activée par ultraviolet) [75], l'alcool polyvinylique (PVA) [76] et l'ormosil (silicate organiquement modifié) [77].

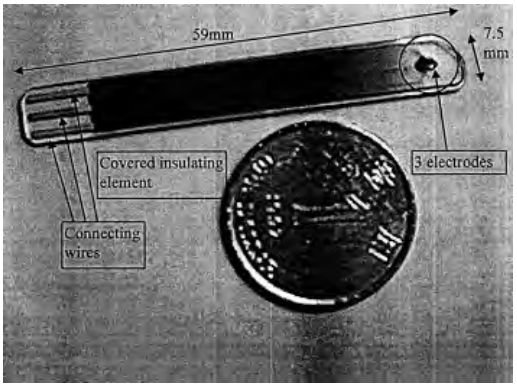

FIGURE 1.8 – Electrode à Oxygène à film épais. [8].

Tous ces polymères sont biocompatibles et ont une faible toxicité pour les micro-organismes. Néanmoins, le choix du polymère dépend de l'application. L'alginate et l'agarose sont particulièrement faciles à utiliser mais peuvent manquer de stabilité mécanique adéquate dans certaines conditions [67]. Les polymères PCS et le sol-gel sont plus complexes à utiliser mais plus résistants mécaniquement. De plus, les sol-gel de polymères sont décrits comme chimiquement inertes et photochimiquement et thermiquement stables.

La deuxième méthode d'immobilisation consiste à intercaler des cellules entre deux couches de polymères. Plusieurs combinaisons de polymères : membranes de teflon / dialyse [78], acétate de cellulose / éthylène-propylène fluorée (EPF) [79], teflon / teflon [80], polycarbonate / teflon [81] ont été utilisées dans les études citées.
La dernière méthode d'immobilisation microbienne consiste à adsorber les cellules sur des supports solides, par exemple, des membranes poreuses (cellulose [82], fibre de verre [83] ou nylon [84]).
Certains polluants peuvent exiger une phase de latence longue avant de devenir biodégradables par des micro-organismes. Une étape complémentaire de prétraitement consiste alors à hydrolyser, physiquement ou biochimiquement, les macromolécules qui sont plus difficiles à dégrader dans les échantillons [82, 85, 86].
Karube [55] a développé en 1977 deux types différents de capteurs à base d'électrodes microbiennes. Le premier comprend une électrode d'oxygène et utilise une membrane de bactéries/collagène. Le courant de l'électrode diminue de façon marquée avec le temps lorsque cette dernière est placée dans une solution de glucose ou d'acide glutamique (modèle d'eau usée). Le deuxième est une cellule de biocarburant utilisant une électrode de Clostridium Butyricum/Platine. Une relation linéaire a été obtenue entre le courant de l'électrode et la DBO avec une erreur de +/-10%. Une plateforme complète de mesure, développée par Ben-Yoav [9], permet l'analyse de la toxicité de l'eau (Figure 1.9). Le système électrochimique est composé de deux micro puces : une puce microfluidique en PDMS et une micro chambre à trois électrodes.

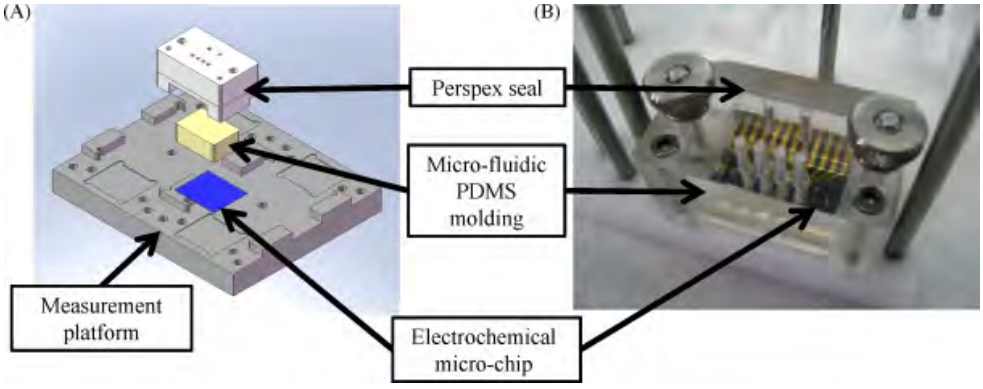

FIGURE 1.9 – (A) La plate-forme de mesure comprend un joint en plexiglas, un moulage PDMS micro-fluidique et une micropuce électrochimique. (B) Le système de puce électrochimique micro-fluidique. [9].

En 2004, une équipe suédoise [10, 11] a reporté le développement d'un biocapteur DBO rapide pour la surveillance en ligne des procédés de traitement biologique (figure 1.10).

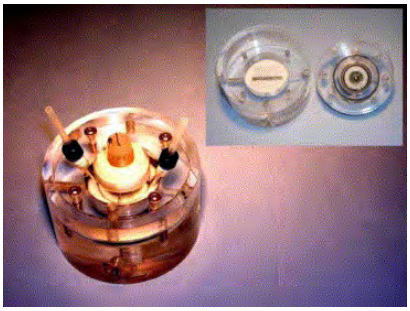

FIGURE 1.10 – Biocapteur à base de bioréacteur développé par Liu [10, 11].

Dans ce système, des microorganismes libres collectés à partir de boues activées d'une station d'épuration municipale sont maintenus dans un liquide à l'intérieur d'une cellule de mesure avec une membrane de dialyse.
Deux autres biocapteurs de type bioréacteur ont été développés par Villalobos et Wang [87, 88]. Ils consistent à immobiliser des bactéries dans des billes de PVA/Alginate suspendues dans un bioréacteur traditionnel.
Les performances de ces systèmes semblent intéressantes : le temps de réponse est proche de 30 min avec une forte corrélation entre le résultat obtenu et la méthode de référence [87, 88] (l'écart type de répétabilité et la reproductibilité du biocapteur sont compris entre +/-3.6 et +/- 6.4% et entre +/-3.45% et +/-4.88% respectivement). Toutefois, l'approche doit être encore validée car les travaux se sont limités à un nombre restreint d'échantillons (3 ou 5).

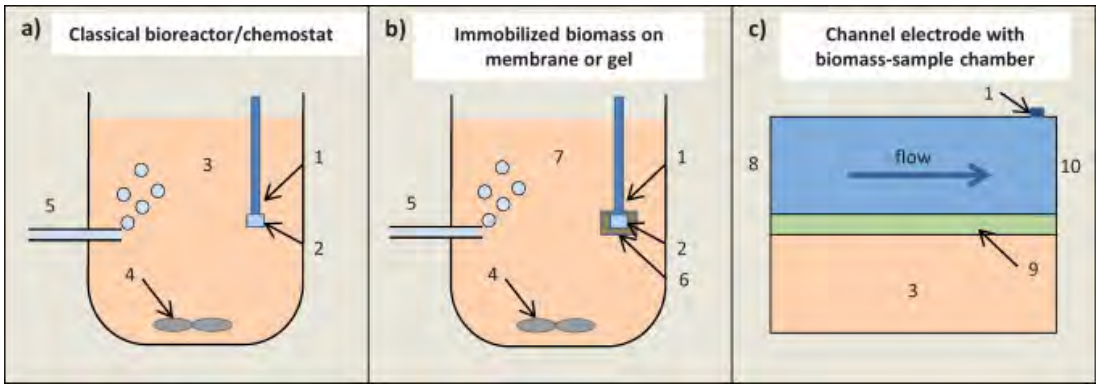

FIGURE 1.11 – (a) une électrode de type Clark classique placée à l'intérieur d'un bioréacteur ; (b) une électrode de type Clark modifiée avec de la biomasse concentrée autour de l'électrode ; (c) un canal d'électrolyte et une chambre de bioréacteur séparés par une membrane perméable à l'oxygène : 1 - capteur d'oxygène ; 2 - protection de type téflon contre la passivation de l'électrode ; 3 - échantillon plus biomasse bactérienne ; 4 - agitation ; 5 - apport d'oxygène ; 6 - membrane sandwich ou gel de biomasse bactérienne immobilisée ; 7 - échantillon sans biomasse bactérienne ; 8 - entrée d'électrolyte saturé d'oxygène ; 9 - membrane perméable à l'oxygène ; 10 - sortie [12].

Un biocapteur de type réacteur miniaturisé basé sur une microfluidique respirométrique est présenté par Torrents [12]. Ce système est composé de deux microcanaux séparés par une mem-

brane perméable à l'oxygène. L'échantillon et la biomasse sont dans la chambre de réaction (premier canal), le deuxième canal contient l'électrolyte (figure 1.11). La chambre de réaction contient les bactéries et l'échantillon à analyser. Le deuxième canal véhicule un flux constant d'électrolyte saturé en oxygène. L'oxygène diffuse à travers la membrane, de la chambre d'électrolyte à la chambre de réaction, où il est consommé par les bactéries aérobies. La surveillance de l'oxygène à la fin du canal d'électrolyte fournit des informations sur l'activité bactérienne.
Selon les auteurs, ces biocapteurs sont capables d'estimer la DBO_5 avec une durée d'analyse de 90 min. Cependant, la validation des résultats sur des échantillons réels est inexistante.
Dans la plupart des cas (environ 60%), les biocapteurs DBO sont basés sur une seule souche microbienne au lieu d'un mélange microbien comme dans les méthodes standards.
Les travaux de Raud [66] proposent une stratégie alternative pour prédire la valeur de la DBO basée sur un panel bactérien composé de sept souches utilisées individuellement. Pour cela, les données fournies par chaque souche sont analysées simultanément avec des modèles statistiques. Les résultats sont encourageants puisque les prévisions des valeurs sont totalement corrélées avec la DBO mesurée avec les méthodes standards ($r^2 = 1$) pour 30 échantillons.
Un autre indicateur de couleur redox, le 2,6-dichlorophénolindophénol, a été également utilisé par une équipe japonaise [13, 89, 90].
Les temps de réponse obtenus avec ces capteurs sont nettement plus bas qu'avec la méthode standard, soit 15 heures (durée maximale) au lieu de 5 jours. Cette amélioration est très probablement due au médiateur redox, qui agit comme un accepteur d'électrons à la place de l'oxygène et permet l'accélération de la réaction de biodégradation. D'autres facteurs peuvent également expliquer la différence observée avec la méthode de référence, dont l'utilisation de souches pures sélectionnées à des densités cellulaires beaucoup plus élevées que celles employées dans l'essai de référence.
Faisant suite à ces travaux utilisant un médiateur rédox [13, 89, 90], plusieurs études ont été menées pour améliorer les performances de ces appareils [69, 91, 92].
L'équipe de Baronian [93] a proposé un système de double médiateurs combinant l'hexacyanoferrate de potassium (III) et la menadione en utilisant des cellules eucaryotes (Saccharomyces cerevisiae). En présence de l'enzyme NAD(P), la menadione est transformée en ménadiol. Le ménadiol est une navette d'électrons du compartiment intracellulaire à la paroi cellulaire afin de réduire le médiateur hydrophile. La réoxydation de l'hexacyanoferrate de potassium (II) génère un courant proportionnel à l'activité cellulaire [94].
Cette stratégie a été utilisée par une équipe japonaise en 2007 [90, 89, 13] pour concevoir un biocapteur jetable.

1.2.3.2 Méthode optique

Les transducteurs optiques sont couramment utilisés pour évaluer la qualité de l'eau. La détection est basée sur la modification des propriétés optiques de l'échantillon lors de l'intèraction entre le biorécepteur du capteur et l'analyte d'intérêt. Plusieurs marqueurs ont été utilisés. Les

Dispositifs ampérométriques	Dispositifs potentiométriques	Piles à combustible microbiennes
[54] [8] [74] [70] [10] [11]	[95] [96]	[52] [51] [97] [80] [49] [98]

TABLE 1.2 – Biocapteurs électrochimiques

équipes de Dobbs [99], Bari [100] et Mrkva [101] ont utilisé la corrélation entre l'absorbance UV et l'oxygène consommé par les microorganismes. En effet, ces travaux ont démontré des coefficients de corrélation élevés dans des eaux dont la turbidité ne dépasse pas une certaine limite, ce qui a été le cas pour des effluents municipaux secondaires ne présentant pas une grande concentration en matière organique. Les applications de mesure de l'absorbance UV ont l'avantage d'être simples à mettre en oeuvre à base d'une lampe à mercure basse pression (à une ligne spectrale à 253,7 nm). Afin d'agrandrir la gamme de détection des concentrations organiques, la sensibilité peut être ajustée en agrandissant le volume des cellules de mesures.
Les travaux menés par Reynolds [102] portent sur la fluorescence des eaux usées à 340nm pour une excitation à 280nm. Les mesures ont été faites avec un spectrofluoromètre commercialisé (Fluoromax TM, SPEX Instruments SA).
Lai [103] et Hur [104, 105] ont mis au point une méthode de corrélation par étude spectrale de fluorescence de l'échantillon avec et sans effluents. Une analyse de régression multiple démontre une corrélation de l'ordre de 0,711 entre le taux des effluents organiques et l'écart des pics du spectre de fluorescence.
En 2006, deux équipes (de Tizzard et de Dudal) [106, 107] ont mis au point une méthode en microplaque à 96 puits utilisant la résazurine. C'est un médiateur redox bleu (hydrosoluble et non fluorescent) qui pénètre dans les bactéries et qui est réduit par l'activité cellulaire en résorufine (hydrosoluble, fluorescent à 590nm). L'intensité de la fluorescence émise dans la microplaque à puits après la période d'incubation est directement proportionnelle à la quantité de matière organique dégradée par les microorganismes dans les échantillons analysés. Les mesures de fluorescence sont faites en laboratoire avec un spectromètre commercial (LS55) de chez Perkin-Elmer.
Avec cette méthode, l'analyse est beaucoup plus rapide qu'avec la méthode de référence (15 h comparé aux 5 jours requis par la méthode de référence) et la gamme de mesure est augmentée de 6 mg/L (méthodes standards) à 300 mg/L.
Un an plus tard, l'équipe de Nakamura se base sur le développement antérieur d'un biocapteur électrochimique employant un système doubles médiateurs rédox (la menadione et le ferricyanide) [90] pour mettre au point deux systèmes optiques : le premier par la méthode de chimiolumines-

cence [13] et le second par la méthode de spectrophotométrie [89].
Le premier système [13] utilise la réaction rédox entre la quinone et la levure de boulanger. En présence de composés biodégradables et de microorganismes, la ménadione est réduite en ménadiol. La ré-oxydation du ménadiol génère du peroxyde d'hydrogène qui réagit avec le luminol et les anions hydroxyde, catalysés par l'hexacyanoferrate de potassium (III), pour produire la chimioluminescence. La figure 1.12 illustre la réaction rédox entre la quinone et la levure de boulanger.
La corrélation entre la réponse chimioluminescente et la concentration en acide glutamique est de l'ordre de 0,9999. Le système présente une limite de détection de 5,5mgO_2/L sur une plage de 11 à 220mgO_2/L pour 6 points de mesure et 3 échantillons.

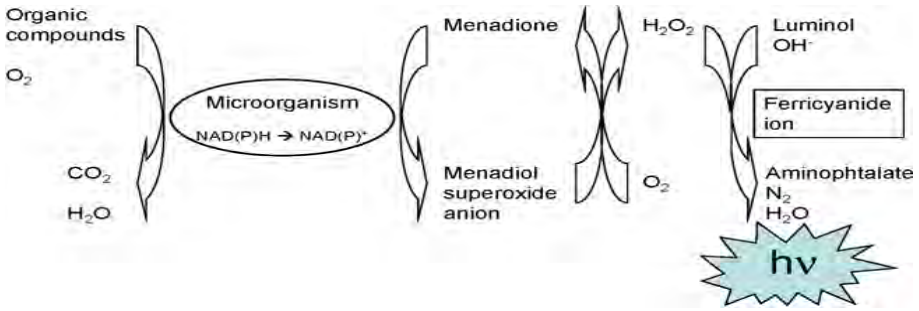

FIGURE 1.12 – Principe de mesure de la DBO par chimioluminescence [13].

Le deuxième système [89] repose sur le même principe de lecture de la fluorescence avec un indicateur de couleur rédox (2,6-dichlorophenolindophenol) avec l'eucaryote Saccharomyces cerevisiae. Les mesures sont faites avec un système de lecture commercial. Les résultats ont montré une limite de détection de 2mgO_2/L, une mauvaise reproductibilité (5%), un intervalle de mesure de 30min et une gamme de détection de 2 à 20 mgO_2/L.

1.2.3.3 Bilan partiel sur les systèmes miniaturisés

Les systèmes de détection électrochimiques sont facilement miniaturisés et portables permettant une analyse sur site et un résultat rapide, en temps réel sur la qualité des eaux [59, 108].
Ils permettent l'analyse à une fréquence élevée car la période de stabilisation de la mesure est généralement courte. De plus, le bruit est proportionnel à la taille de l'électrode, donc bas. Ces systèmes sont précis et sensibles.
Cependant, l'utilisation de biocapteurs électrochimiques est limitée aux espèces électro-actives [9]. En outre, le contact direct du capteur avec la solution examinée peut entraîner une détérioration de la surface des électrodes entraînant une modification des propriétés de détection.
La transduction optique présente plusieurs avantages par rapport à d'autres techniques telles que la possibilité d'effectuer une analyse multiple simultanément [109]. De plus, les systèmes optiques peuvent être facilement fabriqués en masse et miniaturisés et sont sans interférences électriques et magnétiques [110, 111]. Le système de transduction n'est pas en contact avec la

solution examinée, ce qui élimine les problèmes d'encrassement biologique [106, 112, 113].
La majorité des biocapteurs utilisant la transduction optique sont faits sur microplaque avec des systèmes de lecture commerciaux type spectrofluoromètre ou spectrophotomètre ce qui limite l'utilisation sur site. Ceci explique la faible production bibliographique sur des biocapteurs optiques miniaturisés par rapport aux biocapteurs électrochimiques. Les biocapteurs optiques présentent toutefois à leur tour des limites telles que l'interférence lumineuse ce qui signifie que les mesures doivent être effectuées dans des chambres noires ainsi que leur incapacité à fournir des résultats précis lors de l'examen d'échantillons troubles [59]. Ces limites restent peu contraignantes comparativement aux systèmes électrochimiques.

1.2.4 Conclusions sur l'état de l'art

Un des enjeux scientifiques et technologiques dans le domaine du traitement et de l'analyse des eaux est de disposer de systèmes de mesure performants et fiables, permettant de faire des mesures de polluants organiques en temps réel et sur site.
Les méthodes de mesure des polluants organiques peuvent être classées en deux grandes catégories : les méthodes conventionnelles et les biocapteurs (méthodes alternatives et miniaturisées).
Les méthodes conventionnelles nécessitent des mesures longues (5 jours au minimum). Elles permettent d'obtenir les résultats les plus précis car elles utilisent en général plusieurs souches bactériennes issues de boues actives. Ces méthodes fournissent une valeur exacte et de manière directe de la teneur en matière organique dans les eaux (la DBO).
Les biocapteurs permettent des temps d'analyse réduits avec de larges plages de mesure. Quant à eux, ils n'utilisent qu'une seule souche bactérienne et font appel souvent à des algorithmes complexes permettant l'estimation de la valeur réelle de la DBO. Ainsi, les mesures effectuées sont indirectes et peu de données sur des applications de terrain sont disponibles.
D'un point de vue biologique, une différence se manifeste entre les deux catégories de systèmes (direct et indirect) car généralement deux types d'inoculums microbiens sont utilisés : boues activées [78] ou souches pures.
Les méthodes de mesure conventionnelles sont technologiquement fiables (sonde d'oxygène ou de pression) et leurs protocoles d'utilisation sont disponibles dans la littérature. Néanmoins, elles nécessitent de longues périodes d'analyse et, en général, un espace de travail important. Inversement, les méthodes alternatives nécessitent un temps réduit pour effectuer des analyses.

1.3 Objectifs de la thèse

Cette thèse s'inscrit dans la continuité de travaux déjà menés au laboratoire. Les travaux antérieurs s'inscrivaient dans le cadre d'un projet ANR BIOGUARD (2011-2014) qui associait le laboratoire GEPEA, l'entreprise BIONEF et le LAAS-CNRS.
L'objectif du projet était de développer un système complet de mesure de la DBO pour le suivi des eaux usées d'une installation biotechnologique ou des stations d'épuration.

Ce capteur devait amener des éléments de réponse aux difficultés associées à l'utilisation des méthodes conventionnelles : il devait être portable, autonome en énergie et communication, présente des temps de mesure raccourcis (mesure en temps réel) et utilisable par du personnel non spécialisé. Il devait par ailleurs permettre des mesures fiables et reproductibles en milieu complexe, difficultés souvent rencontrées avec les biocapteurs.
Dans ce contexte, le dispositif devait permettre de mesurer une pollution organique d'au moins 50mgC/L.
L'approche retenue était celle d'un biocapteur bactérien permettant la mesure directe ou indirecte de la DBO. Elle s'appuie sur les travaux déjà réalisés par l'équipe de G. Thouand [114, 36, 115] et sur le savoir faire du LAAS dans le domaine des biocapteurs de la microfluidique. Cette approche est en effet très flexible et permet de se positionner plus facilement par rapport aux techniques de référence. Deux types de capteurs ont été mis à l'étude :

— Un capteur d'oxygène dissous à optode.
— Un capteur d'activité métabolique de bactéries à résazurine.

Les principes de fonctionnement de ces deux types de capteurs seront expliqués plus loin.
La thèse de Loic Recoules a permis de mettre en place les fondements conceptuels de ces deux approches, ainsi que de sélectionner, pour cette première phase d'étude, la bactérie *E.coli*, comme souche bactérienne modèle.

Capteur à optode Un capteur millimétrique ainsi qu'une puce miniaturisée et leur système de mesure associé ont été développés [116].
Les analyses effectuées sur un milieu modèle Luria-Bertani (LB) ensemencé en bactéries *E.coli*, amenaient à plusieurs conclusions :

— Elles permettaient de faire la preuve de concept et de déterminer une concentration bactérienne optimisée à $1{,}2.10^8$ cell/mL.
— Les dispositifs micro et milli montraient des dynamiques comparables mis à part un temps de latence inexpliqué de quatre heures avec le dispositif micro pour une concentration bactérienne de $9{,}2.10^7$ cell/mL et avec du milieu LB sans dilution.
— Les mesures étaient peu reproductibles rendant l'étalonnage difficile.
— Au delà de 2 à 4 heures de mesure, le taux en oxygène remontait, certainement en raison de la porosité du système à l'oxygène.

Capteur à résazurine De façon similaire, un capteur à résazurine a été conçu. Il s'agit d'une puce Verre/PDMS comportant huit puits de 24μL chacun [14].
Les mesures effectuées avec un milieu minimal (M9) contenant une population bactérienne de $8{,}6.10^7$ cell/mL et une concentration variable en carbone, montraient une relation logique entre le signal obtenu et la concentration en carbone organique.
Une première phase de croissance linéaire était observée quelle que soit la concentration en carbone et seul le niveau de stabilisation semblait représentatif. Ceci excluait donc la possibilité

de faire des mesures en dessous de six heures de suivi.
D'autre part, on observait une fluorescence importante dans un milieu ne contenant pas de carbone organique. Enfin, le rapport signal/bruit et la reproductibilité des mesures s'étaient avérés peu satisfaisant.
Compte-tenu de ces résultats encourageants, nous proposons de poursuivre le travail en nous attachant à lever les difficultés rencontrées et à améliorer les performances des capteurs.

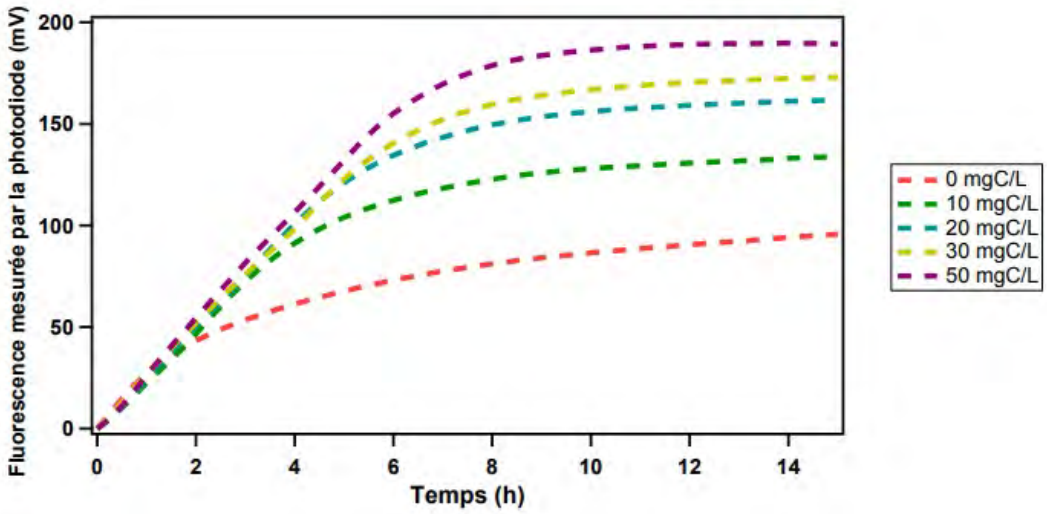

FIGURE 1.13 – Courbes de fluorescence au cours du temps de plusieurs échantillons à différentes concentrations en carbone organique [14]

L'objectif de cette thèse est donc, sur la base des premiers capteurs développés dans le cadre de la thèse de L. Recoules [14], d'une part de fiabiliser le fonctionnement du dispositif et d'autre part d'étendre son fonctionnement à plusieurs souches bactériennes de façon à tendre vers un objectif de « spectroscopie microbienne », c'est à dire d'une exploration multi-paramétrique des échantillons d'eau complexes.
Les points particuliers que nous aborderons seront :

— L'amélioration de la chaîne de mesure afin d'augmenter le rapport signal/bruit.
— L'amélioration de la reproductibilité des mesures.
— La qualification des performances du dispositif.
— La mise en oeuvre d'une analyse multi-puits, multi-souches bactériennes.

La suite de ce document retrace l'ensemble de ces développements en se focalisant sur le capteur à optode pour le deuxième chapitre et sur le capteur à résazurine dans le troisième chapitre. Enfin, le dernier chapitre rapporte les premiers résultats obtenus dans le cas d'une approche multi-puits/multi-souches pour la détection de molécules toxiques (pesticides). La conclusion finale dégage les principaux résultats obtenus ainsi que quelques voies prometteuses de développements ultérieurs.

Chapitre 2

Développement du capteur à Optode

Sommaire

2.1 Macrosystème à optode **25**
2.1.1 Optimisation du système de mesure avec du milieu LB et du glucose . . . 26
2.1.1.1 Reproductibilité des mesures 26
2.1.1.2 Ecart de mesure entre les différentes chaînes de mesure 27
2.1.1.3 Effet de la concentration bactérienne 28
2.1.2 Mesure de la concentration en matière organique à l'aide d'un capteur à optode 29
2.2 Microsystème à optode **33**
2.2.1 Réalisation du système microfluidique 33
2.2.1.1 Procédé de fabrication de la biopuce 33
2.2.1.2 Support mécanique de la biopuce 36
2.2.2 Mesure de la concentration en matière organique à l'aide d'un capteur miniaturisé à optode 37
2.2.2.1 Glucose mimant la matière organique 37
2.2.2.2 Milieu LB mimant la matière organique 38
2.3 Conclusion **40**

Les optode sont des capteurs d'oxygène commercialisés par la société allemande **Pyro-science®** [15]. Ce sont des pastilles de 5mm de diamètre et d'une épaisseur de 125μm composées d'un indicateur Redflash immobilisé sur une surface en polymère. La nature chimique de l'indicateur n'est pas renseignée précisément par le fournisseur. Il s'agit de molécules excitables avec une lumière rouge (610-630 nm) et émettant dans le proche infrarouge (760-790nm) en fonction de la concentration en O_2. Toutefois, de nombreux travaux dans la littérature rapportent l'utilisation de complexes de ruthénium pour réaliser les optode (le dichlorure de tris(2,2-bipyridine) de ruthénium [39], $Ru-(Ph_2phen)_3^{2+}$) [4, 38].

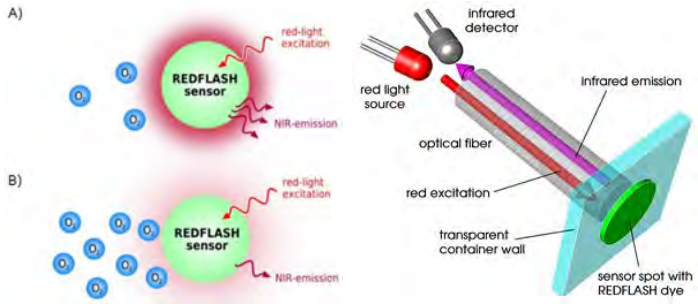

FIGURE 2.1 – Principe de fonctionnement de l'optode [15].

Le principe de fonctionnement repose sur l'extinction de la fluorescence du matériau sensible lors de l'intéraction avec des molécules d'O_2. Le matériau est éclairé par une lumière rouge d'excitation modulée sinusoïdalement. En réponse, les molécules Redflash émettent un signal sinusoïdal dans le proche infrarouge. Le déphasage entre les deux signaux d'excitation et d'émission constitue le signal optoélectronique du système et est converti en concentration en oxygène à travers la théorie de Stern-Vollmer [117].
L'équation de Stern-Vollmer (équation 2.1) traduit la cinétique du mécanisme de désactivation intramoléculaire (la fluorescence) :

$$\frac{I_f^0}{I_f} = 1 + k_q \tau_0 Q \tag{2.1}$$

Où I_f^0 est l'intensité de fluorescence en l'absence de désactivateur, I_f est l'intensité de fluorescence en présence de désactivateur, τ_0 est la durée de vie de l'état excité, Q est la concentration du désactivateur, k_q est le coefficient du taux de désactivation : $k_q = \frac{8RT}{3\eta}$ où R est la constante des gaz parfaits, T est la température et η est la viscosité dynamique de la solution.
Les capteurs sont commercialisés avec le système de mesure FirestingO2 qui leur est associé (cf figure 2.2). Ce dernier est un boîtier de dimensions 68 x 120 x30 mm^3, léger (350g), ayant une interface USB permettant la collecte et l'analyse des données avec le logiciel prévu à cet effet. Il comprend 4 ports destinés à connecter 4 fibres optiques pour l'excitation et la détection. Un cinquième port est destiné à la connexion d'une sonde de température.

FIGURE 2.2 – Système de mesure FirestingO2 [15].

Les fibres optiques (fournies avec le système) sont en contact d'un côté avec les parois du puits contenant l'optode et de l'autre au système de mesure. Le système FirestingO2 permet la mesure de l'oxygène dissous dans l'eau ainsi que dans les phases gazeuses avec des capteurs sans contact et des fibres optiques robustes.
Le système FirestingO2 est équipé de capteurs de pression atmosphérique et d'humidité qui sont étalonnés automatiquement. Néanmoins, une procédure manuelle d'étalonnage est indispensable afin d'éliminer de nombreuses sources d'erreur. Dans cette section, nous détaillerons les étapes principales de l'étalonnage de l'optode qui devront être faites à chaque expérience.
Les mesures sont effectuées sur une gamme à saturation d'oxygène dissous. Ainsi, le système doit être étalonné pour ces deux points : à 0% oxygène et à saturation en oxygène (Eau DI saturée correspondant à 8,5mgO_2/L à une température ambiante).
Pour atteindre le niveau 0% oxygène, nous avons fait buller de l'eau DI avec de l'azote dans une enceinte sous vide pendant 15 minutes. Ensuite, nous avons remplit les puits avec cette eau et étalonné les quatre chaînes du système FirestingO2.
Pour la calibration à saturation en oxygène dissous, nous avons fait buller l'eau DI à l'air libre pendant 10 minutes sous agitation et nous avons procèdé de la même manière pour étalonner les différentes chaînes du système.

2.1 Macrosystème à optode

Le système étudié est celui conçu dans le cadre de la thèse de Loic Recoules [14]. C'est un système à quatre puits de contenance 4mL chacun. Le nombre de puits est défini par le système de mesure FirestingO2 qui comporte quatre chaînes de mesure (voir figure du prototype de mesure figure 2.3).

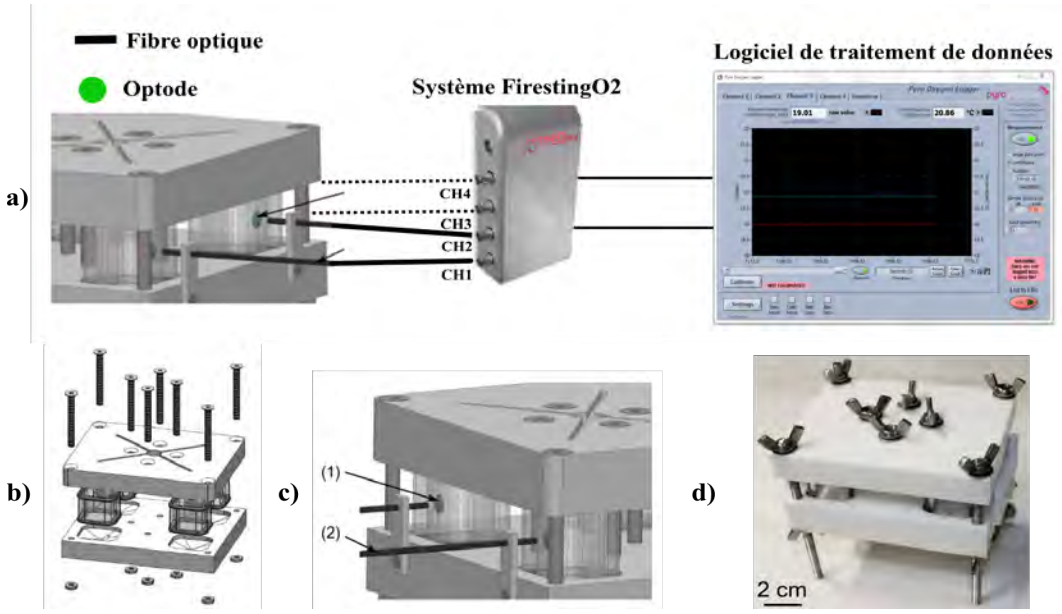

FIGURE 2.3 – a) Prototype du macrosystème, b) Représentation 3D du système à 4 puits à optode, c) 1- Optode collée à l'intérieur du puits et 2- Fibre optique et d) Photo du macrosystème à optode [14]

Les puits sont rectangulaires avec des angles arrondis pour éviter que les bactéries ne s'accrochent dans les angles et contaminent les expériences suivantes. Leur contenance est de 4mL avec des dimensions 25 x 14 x 17 mm^3. Le choix du matériau des puits ainsi que celui du socle qui les supporte est important car le matériau doit être biocompatible, transparent et non biodégradable. Le choix s'est porté sur du plexiglass transparent pour les réservoirs et sur du teflon pour le socle.
Le système complet de mesure est placé dans une mallette régulée à la température optimale de la croissance de l'*E.coli* soit 30°C.
Ce système macrofluidique à optode a été testé avec la bactérie *E.coli* en utilisant le protocole bactérien détaillé en annexe.

2.1.1 Optimisation du système de mesure avec du milieu LB et du glucose

Dans cette partie, l'objectif est de tester l'influence des paramètres pouvant impacter les performances de notre système de mesure. La finalité de ces expériences est de valider les conditions optimales permettant une bonne reproductibilité, une bonne sensibilité et une meilleure gamme de détection. Toutes les expériences reportées dans ce manuscrit ont été renouvelées au moins trois fois.

2.1.1.1 Reproductibilité des mesures

Les premières expériences ont été faites avec du milieu LB afin de tester l'étanchéité de notre système ainsi que la reproductibilité des mesures. Les puits sont remplis manuellement

à l'aide d'une micro pipette. Le système est ensuite fermé et introduit dans la malette régulée en température (30°C). L'écart type moyen varie entre 0,15 et 0,25 mgO_2/L d'une expérience à une autre, en fonction de la concentration en milieu LB et de la concentration bactérienne. La mesure est faite sur dix heures.

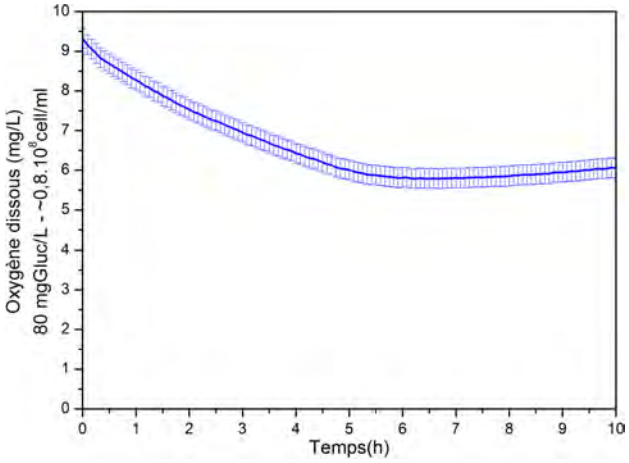

FIGURE 2.4 – Reproductibilité des mesures en milieu M9, pour une concentration de 80 mgGluc/L et une population bactérienne (*E.coli*) de 0,8.10^8 cell/mL

La même expérience est reproduite avec un milieu M9, différentes concentrations en glucose et différentes concentrations bactériennes. La préparation de l'échantillon est détaillée en annexe. Comme dans le cas des mesures en milieu LB, l'écart type de la reproductibilité des mesures varie d'une mesure à une autre de 0,15 à 0,25mgO_2/L en fonction de la concentration en matière organique (glucose) et aussi de la concentration bactérienne. La figure 2.4 présente la consommation de la concentration en oxygène dans le temps ainsi que l'écart de la reproductibilité de mesure pour 5 expériences faites à 80mgGluc/L pour une concentration bactérienne de 0,8.10^8 cell/mL. L'écart type est de 0,25mgO_2/L qui est un faible écart validant la reproductibilité des mesures.

2.1.1.2 Ecart de mesure entre les différentes chaînes de mesure

Un autre paramètre à prendre en compte est l'erreur d'une chaîne de mesure à une autre et d'un puits à un autre. Une même mesure est faite plusieurs fois dans tous les puits et aussi avec les quatre chaînes du système de mesure. Le but est de voir l'écart pour une même concentration bactérienne et concentration en matière organique entre les quatre fibres optiques du système de mesure. La figure 2.5 présente l'écart de mesure entre les différentes lignes optiques du système pour une concentration bactérienne de 2.10^8 cell/mL et une concentration en glucose de 80mg/L. Un léger écart est observable de l'ordre de 0,26 mg/L. On voit que cet écart est du même ordre de grandeur que l'écart type entre 2 expériences consécutives. On peut considérer que ce n'est donc pas pénalisant pour la mesure. Toutefois afin de minimiser cette erreur, la même expérience sera faite sur la même chaîne à chaque fois.

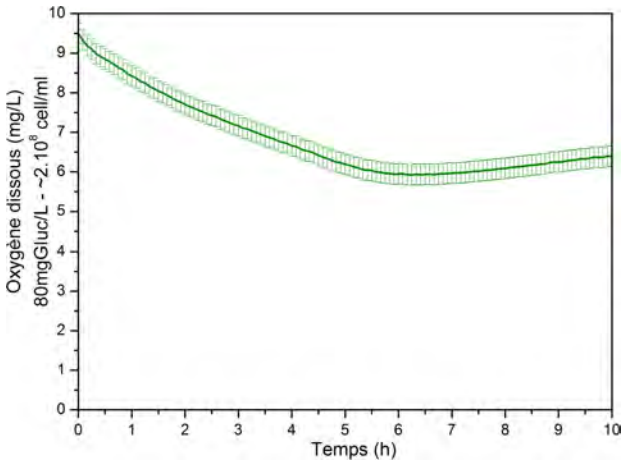

FIGURE 2.5 – Erreur de mesure des chaînes de mesure du système FirestingO2

2.1.1.3 Effet de la concentration bactérienne

Afin de voir l'effet de la concentration bactérienne sur la consommation en oxygène, nous avons fait plusieurs expériences avec plusieurs dilutions du milieu LB (dilué 100 fois : 1/100 et dilué 300 fois : 1/300) et avec différentes concentrations bactériennes de $0{,}16.10^8$ cell/mL qui correspond à une $\text{Absorbance}_{590\text{nm}} = 0,02$ jusqu'à une concentration de 2.10^8 cell/mL qui correspond à une $\text{Absorbance}_{590\text{nm}} = 0,25$.
La figure 2.6 illustre l'influence de la concentration bactérienne sur l'accélération de la consommation de l'oxygène dissous. Les résultats corroborent les observations effectuées par L. Recoules.

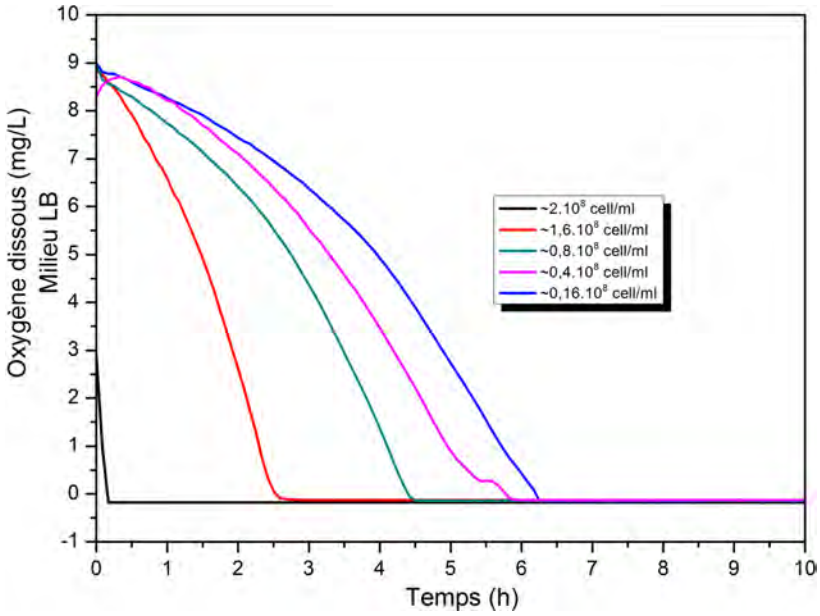

FIGURE 2.6 – Effet de la concentration bactérienne sur la consommation de l'oxygène dissous

La première constatation attendue est que la cinétique de consommation de l'oxygène est trés sensible à la population bactérienne. Pour la concentration de 2.10^8 cell/mL, la consommation en O_2 est très rapide, inférieure à 30 minutes et la cinétique de consommation est peu visible.

On observe également un fort décalage du signal à t=0. La consommation rapide de l'oxygène avant t=0, peut expliquer ce décalage. En effet, les bactéries, nombreuses et ayant beaucoup de nutriments, réagissent très rapidement avant le remplissage des puits et le lancement de la mesure, ce temps pouvant prendre entre 10 et 15 minutes. Ainsi, afin de voir la cinétique de consommation des bactéries il vaut mieux éviter des populations trop importantes surtout que cela peut entraîner également la mort de bactéries qui constitueront à leur tour une source de matière organique pour les vivantes.
On constate également que l'oxygène contenu en solution est totalement consommé ce qui montre la bonne étanchéité du système.
En calculant la pente à l'origine pour les différentes courbes (entre une heure et deux haures de mesure), on peut déduire la vitesse de consommation de l'oxygène dissous dans la solution. Ces valeurs sont rassemblées dans le tableau 2.1 qui donne également le temps de mesure nécessaire à l'analyse.
La concentration bactérienne joue un rôle important sur la vitesse de consommation de l'oxygène et donc la durée de mesure.

	Milieu LB sans dilution	
Concentration bactérienne	Pente (mg/L/h)	Temps de mesure
0,16.10^8 cell/mL	0,77	$\approx 6h30min$
0,4.10^8 cell/mL	0,93	$\approx 5h30min$
0,6.10^8 cell/mL	1,27	$\approx 4h30min$
1,6.10^8 cell/mL	3,09	$\approx 2h30min$
2.10^8 cell/mL	18,07	$<$ 30min

Table 2.1 – Oxygène consommé par heure (mg/L/h) et temps de mesure (h) en fonction de la concentration bactérienne pour du milieu LB sans dilution

2.1.2 Mesure de la concentration en matière organique à l'aide d'un capteur à optode

L'objectif de ce travail est de déterminer d'une part quelles sont les conditions opératoires optimales et d'autre part d'évaluer les performances du capteur.
Afin d'étudier la réponse du capteur en fonction de la teneur du milieu en matière organique, nous reconstituons un échantillon organique à l'aide d'une solution M9 (voir annexe) contenant les bactéries (en concentration variable) et une solution de glucose (en concentration variable également).
L'échantillon à analyser est constitué de 90% de solution de bactéries dans du milieu M9 et 10% de solution de glucose. Nous avons choisi une gamme de mesure de glucose de 0 à 300 mg/L. La concentration en glucose correspondant à 40% de concentration en carbone organique, ce qui

nous permet de déduire que pour la gamme de [0-300]mgGluc/L en glucose correspond à une gamme de mesure de [0-120]mgC/L en carbone. En première intention, nous avons regardé la variation de la concentration en oxygène sur une très large gamme de concentrations en glucose.

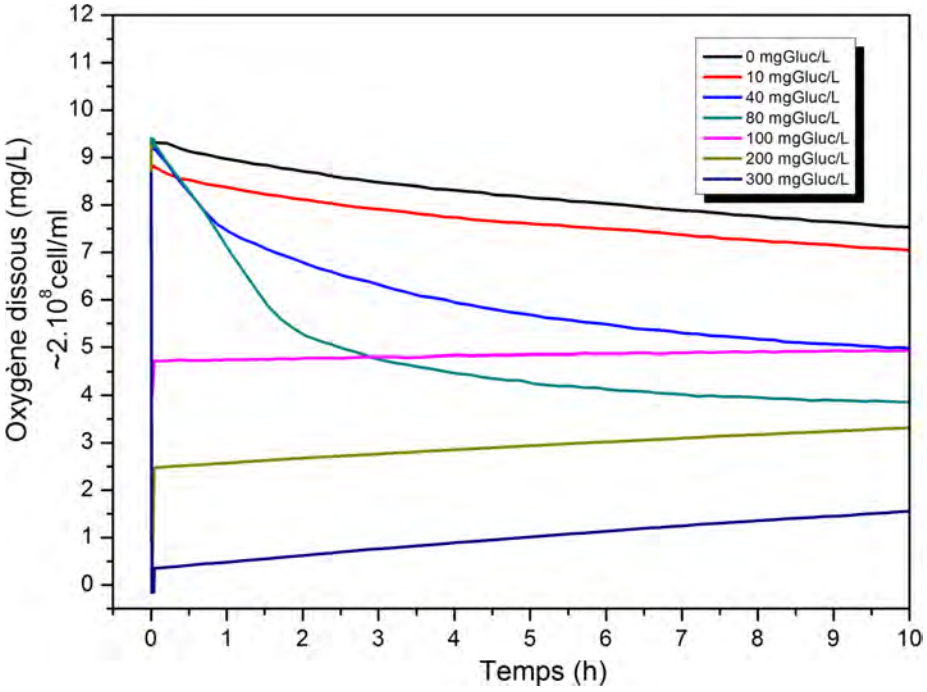

FIGURE 2.7 – Effet de la concentration en Glucose sur la consommation de l'oxygène dissous (2.10^8 cell/mL)

La figure 2.7 présente ces variations, pour une concentration bactérienne de 2.10^8 cell/mL. On observe bien l'influence de la matière organique sur la respiration bactérienne pour les concentrations inférieures à 100mgGluc/L. Pour les concentrations supérieures, nous avons remarqué une saturation du sytème.

Ce résultat montre clairement que la gamme de mesure du capteur à optode est limitée à environ 80mgGluc/L soit 32mgC/L. Nous limiterons donc nos travaux par la suite à cette gamme et nous étudierons la réponse du capteur pour quatre concentrations bactériennes : $0{,}4.10^8$ cell/mL, $0{,}8.10^8$ cell/mL, $1{,}6.10^8$ cell/mL et 2.10^8 cell/mL.

La figure 2.8 permet de visualiser l'impact de la concentration bactérienne sur les mesures. Pour la concentration la plus faible ($0{,}4.10^8$ cell/mL) le signal décroit lentement et aucune influence de la concentration en glucose n'est observée. En doublant le nombre de bactéries, une nette influence de la concentration en matière organique se dessine. Plus le milieu est riche en matière organique plus la consommation en oxygène est importante. Ceci, en se référant au processus de respiration bactérienne, est tout à fait logique.

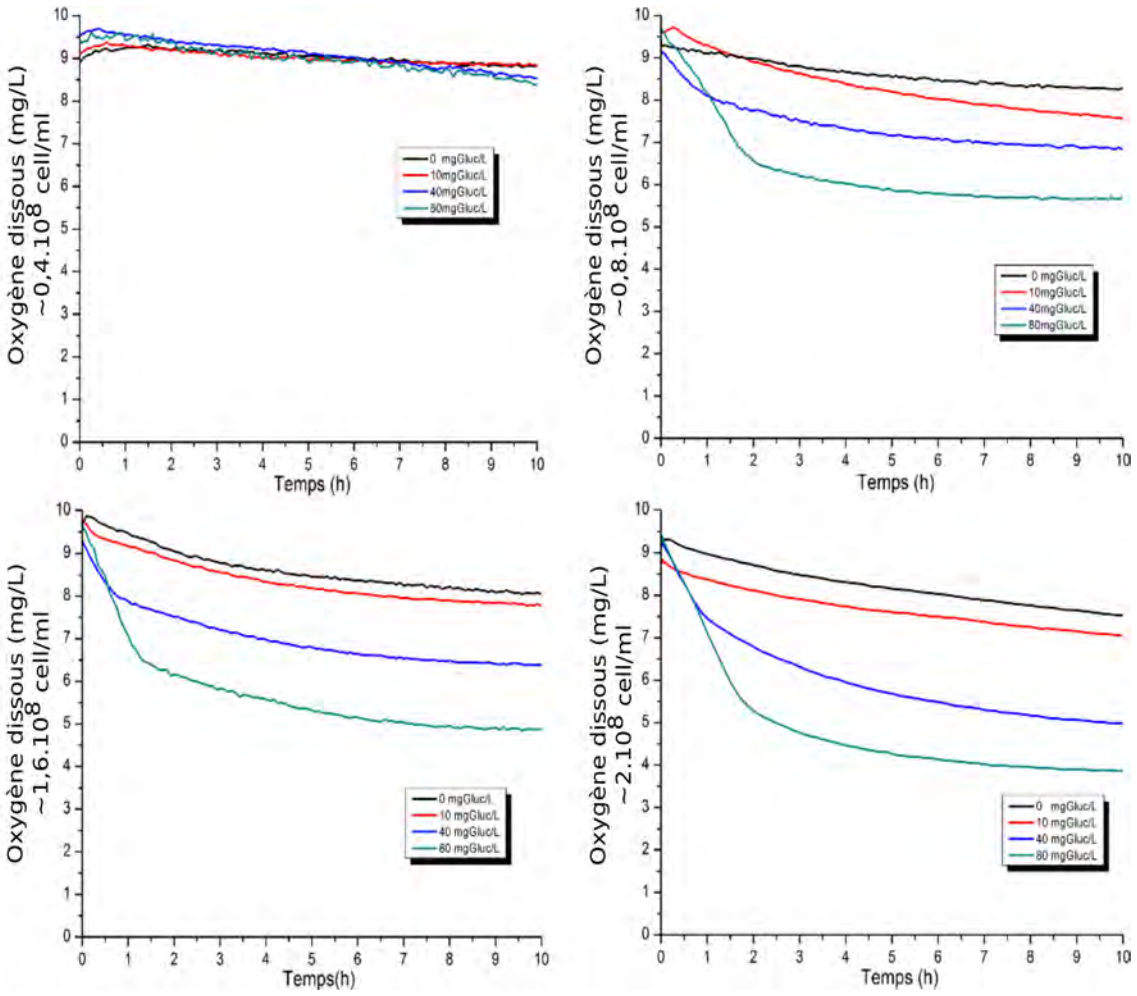

FIGURE 2.8 – Influence de la concentration cellulaire sur la réponse du capteur

Le tableau 2.2 présente les vitesses de consommation d'oxygène pour les différentes concentrations bactériennes et en glucose. Ce tableau met bien en évidence que le capteur ne permet pas de mesurer la concentration du substrat lorsque la population bactérienne est trop basse ($0{,}4.10^8$ cell/mL). Pour les autres concentrations bactériennes, nous observons l'augmentation du taux d'oxygène consommé en fonction de l'augmentation de la concentration du substrat et du nombre de bactéries. Toutefois, la consommation d'oxygène varie peu entre $1{,}6.10^8$ cell/mL et 2.10^8 cell/mL ; la cinétique apparait un peu plus rapide à 2.10^8 cell/mL.

Concentration bactérienne	0mgGluc/L	10mgGluc/L	40mgGluc/L	80mgGluc/L	Sensibilité
$0{,}4.10^8$ cell/mL	-	-	-	-	-
$0{,}8.10^8$ cell/mL	0,067	0,23	1,09	1,6	0,030
$1{,}6.10^8$ cell/mL	0,36	0,56	1,41	2,35	0,037
2.10^8 cell/mL	0,35	0,52	1,84	2,29	0,052

TABLE 2.2 – Vitesse de consommation de l'oxygène dissous par les bactéries (mg/L/h) et la sensibilité ($[O_2]$/[Glucose])

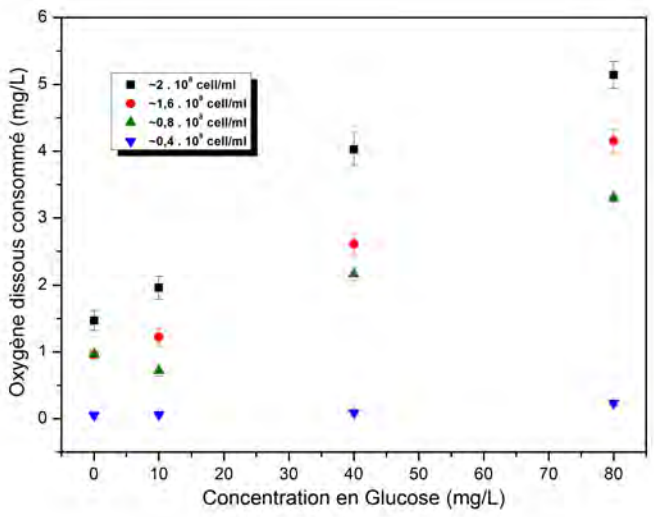

FIGURE 2.9 – Courbes de calibration du macrosystème à optode pour plusieurs concentrations bactériennes

La figure 2.9 présente les courbes d'étalonnage pour les différentes concentrations bactériennes. Celle-ci confirme qu'une concentration bactérienne de l'ordre de 2.10^8 cell/mL est nécessaire pour obtenir la meilleure sensibilité et qu'au-delà de 80mgGluc/L, la réponse du capteur est saturée. La corrélation entre la réponse du signal et la concentration en glucose est de 0,99 à dix heures de mesure. L'important coefficient de corrélation ($R^2 = 0,9944$) entre la consommation de l'oxygène par les bactéries et la concentration en glucose valide la fiabilité de notre macrosystème pour le suivi de la respiration bactérienne pour une gamme de matière organique de 0 à 32mgC/L avec une concentration bactérienne d'*E.coli* de 2.10^8 cell/mL.

	0mgGluc/L		**10mgGluc/L**		**40mgGluc/L**		**80mgGluc/L**	
Concentration bactérienne	$[O_2](mg/L)$	T (h)	$[O_2]$	T	$[O_2]$	T	$[O_2]$	T
$0,4.10^8$ cell/mL	-	-	-	-	-	-	-	-
$0,8.10^8$ cell/mL	0,97	>10	0,72	≈ 8	2,17	≈ 6	3,3	≈ 4
$1,6.10^8$ cell/mL	0,96	≈ 8	1,22	≈ 7	2,61	≈ 4	4,15	≈ 3
2.10^8 cell/mL	1,47	≈ 7	1,96	≈ 6	4,03	≈ 3	5,14	≈ 2

TABLE 2.3 – Oxygène consommé (mg/L) et temps de mesure (h) en fonction de la concentration bactérienne et du taux de la matière organique

2.2 Microsystème à optode

Un système à puce Verre/PDMS (Polydiméthylsiloxane) a été réalisé dans le but de répondre à l'objectif de miniaturisation, du temps de réponse et de portabilité du système. Le design général des puces est celui défini dans le cadre de la thèse de L. Recoules [14]. Les dimensions ont toutefois été adaptées de manière à optimiser le procédé de fabrication et la fiabilité de la puce.

2.2.1 Réalisation du système microfluidique

2.2.1.1 Procédé de fabrication de la biopuce

Le choix s'est porté sur des biopuces mono-puits de contenance 20μL. Les dimensions du réservoir ont été définies en fonction des dimensions de l'optode. Cette dernière est de forme cylindrique de rayon 2,5mm et d'épaisseur 125μm. L'optode est collée à l'intérieur du puits. Celui-ci a une forme circulaire de hauteur 500μm et de rayon 4mm. Les canalisations microfluidiques d'entrée/sortie font 6mm de longueur et 0,6mm de largeur.
Le procédé de fabrication utilisé comprend trois étapes : la réalisation du moule des puces (un moule en Silicium/SU8), la fabrication des puces par moulage de PDMS et finalement l'étape de capotage. Les différentes étapes de réalisation des biopuces sont schématisées sur la figure 2.11 et les détails du procédé dans le tableau 2.4.

Procédé de fabrication du moule des biopuces Les masques sont dessinés à l'aide du logiciel Clewin. La configuration des puces est simple avec une canalisation d'entrée et de sortie reliées au puits. Sur un wafer 4 pouces, nous avons pu placer une dizaine de biopuces comme illustré dans la figure 2.10.

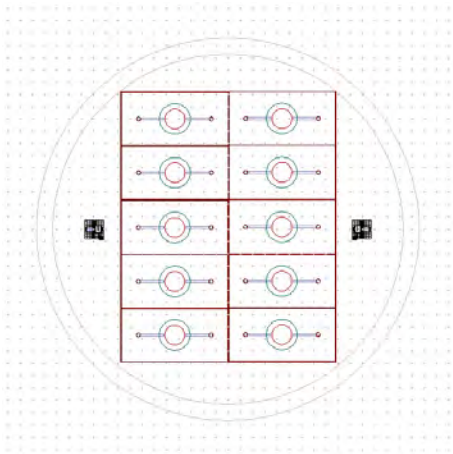

FIGURE 2.10 – Design des masques des biopuces à optode avec Clewin

Les masques sont ensuite réalisés sur un film photosensible insolé avec un phototraceur et révélé. Ce type de masque présente une résolution de l'ordre de 25μm ce qui ne pose pas de

problème dans notre cas.
Après avoir nettoyé le substrat en silicium dans un bain de H_2O_2/H_2SO_4, nous avons effectué le dépôt d'une couche de résine photosensible SU8 d'épaisseur 500μm avec une machine d'enduction automatique EVG120. Comme il s'agit d'une forte épaisseur, le protocole est réalisé en trois étapes d'enduction avec une vitesse de rotation du plateau de 800tr/min pour la première enduction et 700tr/min pour les deux autres enductions. Le dépôt de la résine SU8-500μm prend une nuit entière (ce dépôt correspond aux étapes b-i à b-iii de la figure 2.11).

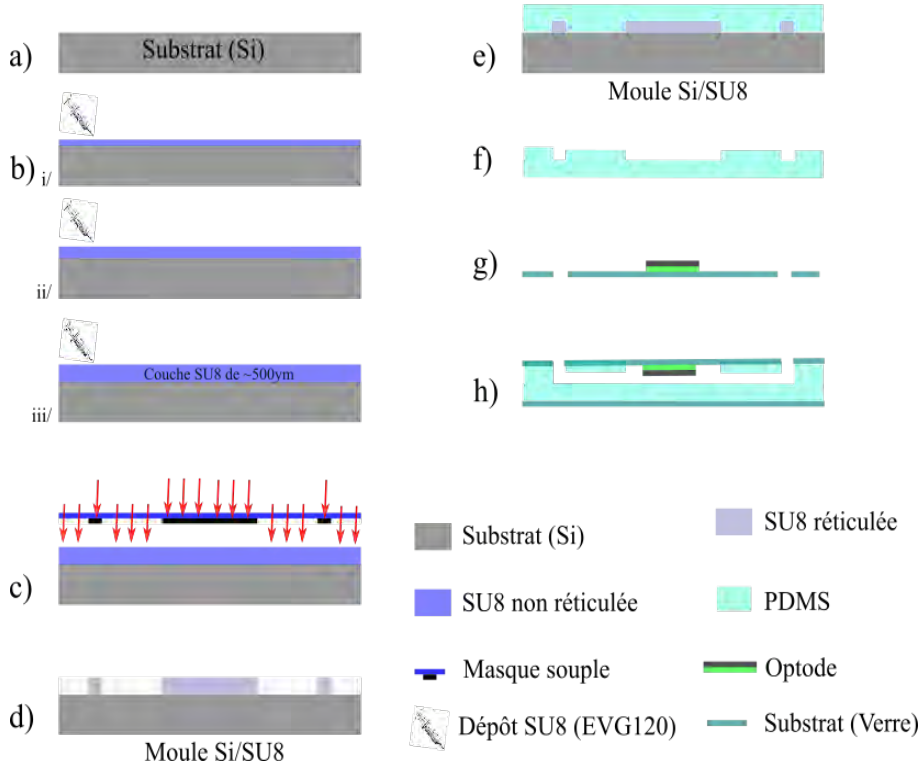

FIGURE 2.11 – Procédé de fabrication de la biopuce Verre/PDMS à optode : Fabrication du moule Si/SU8 (a-d), de la fluidique en PDMS (e-f), du collage de l'optode et du scellement du capot (g-h)

Une fois que le dépôt de résine négative est fait, nous avons procèdé à l'étape de photolithographie comme indiqué à l'étape c) dans la figure 2.11. Le temps d'insolation est adapté en fonction du substrat utilisé (le degré de réflexion varie d'un matériau à un autre), de la machine utilisée (SUSS Microtech MA6) et du masque utilisé (un masque dur ou souple). Pour notre procédé, la puissance lumineuse d'insolation est de $20mW/cm^2$. Le temps d'insolation optimal de la résine SU8-500μm est de 66s.
Le recuit après exposition (PEB : post exposure bake) est fait avec une plaque chauffante HP de chez Suss Microtec. Le recuit démarre à 65°C, puis la température augumente suivant un gradient de 10°C/min jusqu'à atteindre 95°C. Un plateau de 27min à 95°C est choisi puis la température descend de 5°C/min jusqu'à atteindre 25°C.
L'étape de développement est opérée dans un bain de « développeur SU8 »pendant 30min. Pour

accélérer cette étape, nous avons mis le crystallisoir contenant le développeur et le wafer sur une plaque tournante et nous renouvellons le bain de développeur trois fois. Un rinçage avec de l'isopropanol et un séchage à l'azote sont effectués pour finir.

Etape	Schéma	Description
1	(a)	Nettoyage substrat (Si)- Bain H_2O_2/H_2SO_4 (2min). Déshydratation 15min.
2	(b) : i-iii	Dépôt SU8-500 μm. Dépôt et enduction 3 fois de suite pendant une nuit avec la machine EVG120.
3	(c)	Photolithographie : Insolation masque souple, $\lambda = 365nm$, 20mW.cm^-2, 66s. PEB (rampe) : 95°C, 27min
	(d)	Développement : bain de "développeur SU8" pendant 30min
	-	Recuit (rampe) : 125°C, 2min
4	(e)	Moulage PDMS sur le moule Si-SU8, enduction 4h à 60°C
	(f)	Démoulage fluidique en PDMS, perçage et découpage de la fluidique des puces
5	(g)	Préparation capot biopuce : découpage et perçage du capot, nettoyage Isopropanol 5min au bain ultrason, collage manuel optode sur le capot.
6	(h)	Scellement fluidique et capot de la biopuce par plasma O2.

Table 2.4 – Protocole de réalisation de biopuces à optode

Figure 2.12 – Moule Si/SU8 des biopuces à optode

Avant de procéder au moulage du PDMS, une étape de traitement de la surface du moule en Si/SU8 s'impose. En effet, le greffage d'une couche moléculaire de FDTS (1H,1H,2H,2H-PerPerfluorodecyltrichlorosilane) rend la surface hydrophobe et anti-adhésive et facilite le démoulage du PDMS par la suite. Ce traitement a été effectué avec la machine de traitement de surface SPD de chez MEMSSTAR. Le moule des biopuces est alors prêt à l'utilisation (figure 2.12).

Le PDMS est préparé à partir de PDMS liquide et d'un agent réticulant en proportion de 90% et 10% du volume final, respectivement. Après dégazage, le PDMS est versé sur le moule et

placé au four à 60°C pendant 6 heures. Une fois le PDMS durci, nous décollons le moulage qui présente la réplique du dessin des puces sur le moule. On découpe par la suite les puces et on perce les entrées/sorties.

Préparation du capot de la puce A partir d'un wafer 4 pouces en Verre AF32 d'épaisseur 500μm, nous pouvons obtenir dix capots de biopuces. Le perçage des trous d'entrée/sortie est fait avec une sableuse et la découpe des capots est faite avec une scie diamantée.
Les capots sont ensuite nettoyés dans un bain à ultrasons pendant 5min dans l'isopropanol et déshydratés pendant 15min dans une étuve à 80°C. Nous avons collé la pastille d'optode avec une colle silicone fournie avec le kit FirestingO2. Ainsi, le capot de la biopuce est prêt.

Scellement de la partie fluidique et du capot L'étape finale du procédé de fabrication des biopuces à optode est le scellement de la partie microfluidique et du capot. Les deux surfaces sont traitées par plasma O_2 à 0.5mbar pendant 2min30s à 100% de puissance (machine plasma de chez Diener PICO), puis sont mises en contact et placées au four pendant 40min à 60°C.

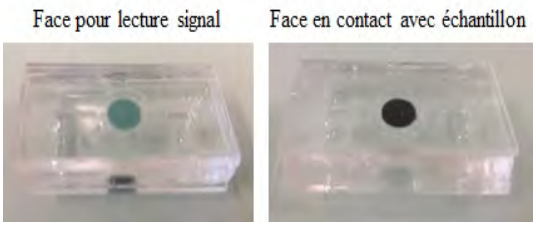

FIGURE 2.13 – Biopuce Verre/PDMS à optode

Les biopuces finales sont présentées dans la figure 2.13. La photo de gauche montre la partie de l'optode par laquelle est effectuée la lecture du signal : la fibre optique vient sur cette partie pour la transduction du signal. La photo de droite représente la puce à l'envers où nous voyons l'autre côte de l'optode c'est à dire la surface réactive Redflash.

2.2.1.2 Support mécanique de la biopuce

L'étape de remplissage des puces est une étape primordiale. Pour assurer un bon remplissage, un support spécifique a été conçu. Il est composé de deux parties : une partie en aluminium et une partie en matériau polymère (PEEK et Acétale). La partie polymère comporte les connectiques fluidiques des entrées/sorties et aussi l'emplacement de la fibre optique du système de mesure. Le support en polymère comporte des joints toriques au niveau des connectiques fluidiques pour éviter d'éventuelles fuites.
Une photo du support éclaté, des puces et du support monté avec des vis est donné figure 2.14. Deux supports ont été fabriqués pour les biopuces. Le premier est fait avec un matériau thermoplastique semi-cristallin, le polyétheréthercétone désigné aussi PEEK. Ce support a été remplacé par la suite par un autre matériau qui assure une meilleure étanchéité optique et ayant une plus

faible autofluorescence. C'est un polymère de synthèse qui présente de bonnes propriétés mécaniques et est utilisé pour des applications optiques : Acétal.

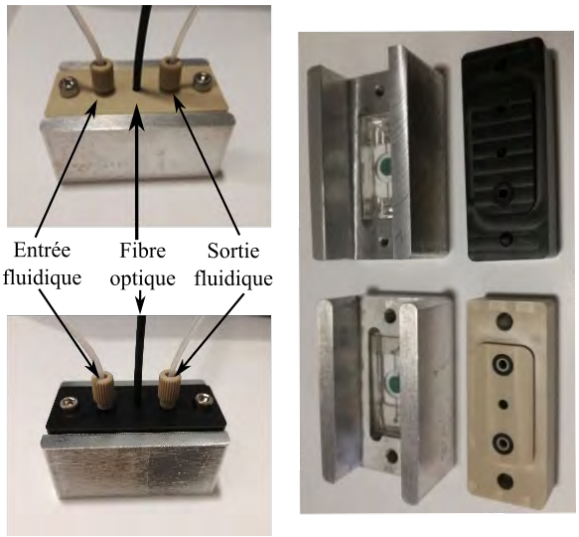

FIGURE 2.14 – Support biopuce

En conclusion, l'efficacité du macrosystème a été évaluée en utilisant une souche d'*E.coli* avec du glucose comme substrat. La respiration bactérienne a été surveillée durant dix heures de mesure. Les mesures montrent une corrélation entre la réponse du capteur et la concentration en glucose.

2.2.2 Mesure de la concentration en matière organique à l'aide d'un capteur miniaturisé à optode

Afin de tester le microsystème, nous avons reproduit les expériences faites avec le macrosystème et avons comparé les deux systèmes pour les mêmes conditions expérimentales. Le protocole expérimental utilisé pour cette section est le même que celui utilisé pour le macrosystème.

2.2.2.1 Glucose mimant la matière organique

Comme dans le cas du capteur millifluidique, la biopuce est testée avec une solution contenant du glucose. Le protocole bactérien est exactement le même que précédemment. Nous reprenons le culot bactérien après lavage et ajustons la concentration bactérienne avec du milieu M9 jusqu'à obtenir de la densité souhaitée. L'échantillon final est préparé en diluant le milieu bactérien dans le milieu M9 enrichi en glucose.

Influence de la concentration bactérienne La figure 2.15 montre la consommation de l'oxygène dissous pour une concentration en glucose de 80mg/L pour quatre concentrations bactériennes différentes allant de $0{,}8.10^8$ cell/mL à $4{,}8.10^8$ cell/mL.

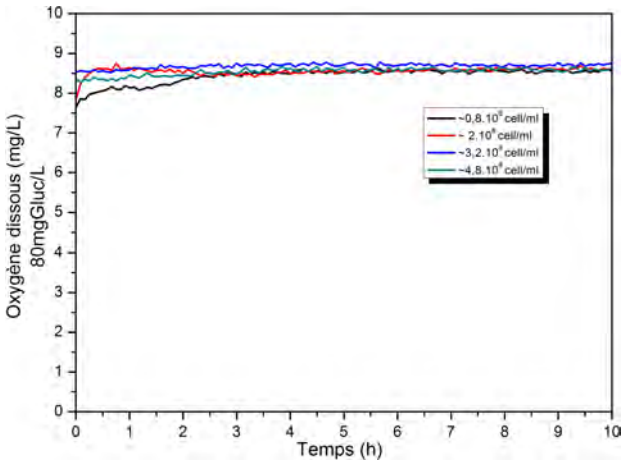

FIGURE 2.15 – Influence de la concentration bactérienne pour une concentration en glucose de 80 mg/L

On note une absence complète de dynamique respiratoire en fonction des concentrations bactériennes, ce qui n'était pas le cas pour le macrosystème.

Mesure de la concentration en glucose L'absence de l'effet de la concentration bactérienne pour la concentration en glucose de 80 mg/L, nous a poussé à regarder l'impact de la concentration de ce dernier pour une densité bactérienne donnée.
La figure 2.16 présente les résultats pour 2.10^8 cell/mL pour trois concentrations en matière organique. Le résultat est identique.

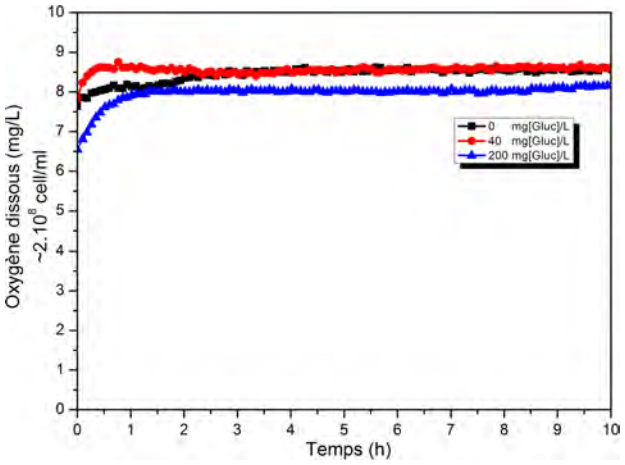

FIGURE 2.16 – Influence de la concentration en glucose pour une concentration bactérienne de 2.10^8 cell/mL

2.2.2.2 Milieu LB mimant la matière organique

Afin de comprendre l'absence de la respiration bactérienne (signal constant) , nous avons décidé de reproduire les expériences avec le milieu LB qui est très riche en nutriments.
L'expérience a été faite pour deux concentrations en bactéries à savoir 2.10^8 cell/mL et $4{,}8.10^8$

cell/mL. Les résultats sont présentés sur la figure 2.17.
Comme pour le macrosystème, l'augmentation du taux en bactéries joue sur le temps de mesure et aussi sur la vitesse de consommation. En effet, pour la concentration la plus importante, la mesure est faite en moins de 4 heures tandis que pour la concentration de 2.10^8 cell/mL, la mesure prend plus de 9 heures. Pour cette dernière concentration bactérienne, un temps de latence assez important, de l'ordre de 5 heures, est également noté. A partir de ce moment là, la cinétique de la consommation de l'oxygène reprend à une vitesse de 1,4 mgO_2/L/h. Pour la concentration élevée, il n'y a pas de temps de latence. La vitesse de consommation de cette dernière est de 1,44 mgO_2/L/h, soit similaire à celle observée avec la population bactérienne plus élevée.

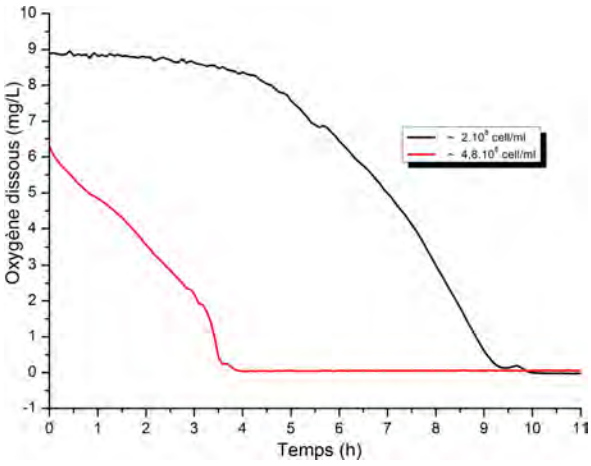

FIGURE 2.17 – Influence de la concentration bactérienne sur la consommation en oxygène

Mesure de la concentration en matière organique La détermination du taux d'oxygène dissous consommé en fonction de la matière organique présente est un paramètre important pour valider notre système et aussi définir sa gamme de détection. Les échantillons sont préparés avec plusieurs dilutions du milieu LB et les résultats sont comparés à ceux obtenus de façon analogue avec le macrosystème. Les cinétiques de ces dernières sont illustrées dans la figure 2.18.
L'échantillon préparé est composé de bactéries avec différentes concentrations et du milieu LB avec quatre concentrations différentes (dilution 10, 100 et 300 fois).
Pour une même concentration bactérienne, nous avons voulu voir l'effet de la concentration en nutriments sur la consommation en oxygène. La figure 2.18 illustre les résultats de la consommation en oxygène en fonction de la dilution du milieu de culture pour une concentration bactérienne correspondant à une $\text{Absorbance}_{590\text{nm}} = 0,25$ (2.10^8 cell/mL).
Pour le macrosystème, l'influence de la concentration en nutriments est nettement visible sur la vitesse de consommation et aussi sur la durée de mesure. Pour le milieu non dilué, la réponse est très rapide et la vitesse de consommation est de 18,07mg/L/h. Pour les milieux LB 100 et 300 fois dilués, la durée de mesure et la vitesse de consommation de l'oxygène sont respectivement deux heures, quatre heures et 3,11 mg/L/h, 2,14 mg/L/h.

Les comportements sont radicalement différents dans le cas du microsystème. En effet, cette absence de consommation bactérienne dans le cas des milieux LB dilués 100 et 300 fois avec le microsystème ne peut pas être expliquée par le manque en matière organique car les mêmes dilutions montrent une dynamique de consommation avec le macrosystème.

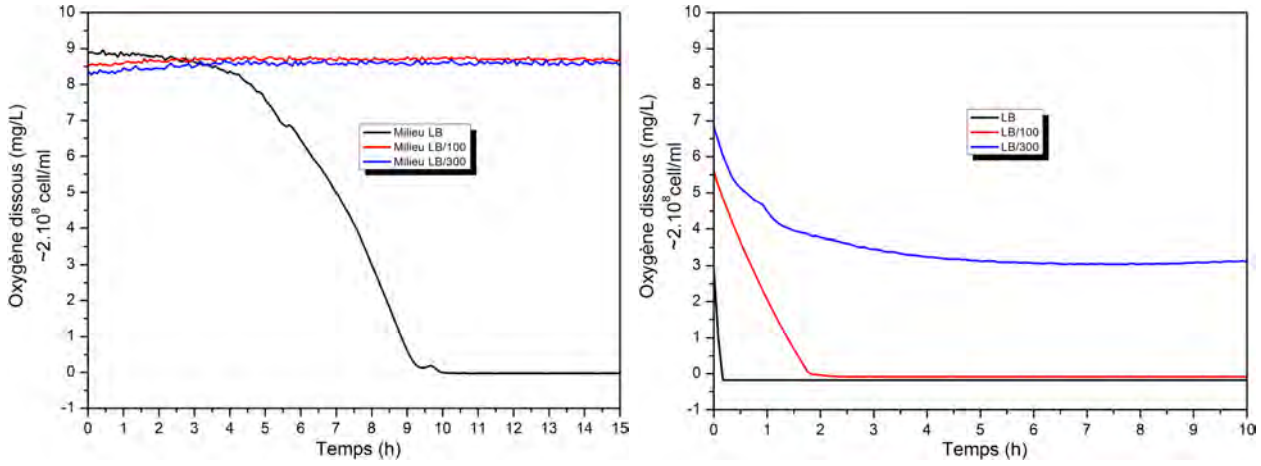

FIGURE 2.18 – Influence de la concentration en matière organique pour une concentration bacétrienne de 2.10^8 cell/mL : à gauche pour le microsystème et à droite pour le macrosystème

L'explication la plus probable est que la porosité du PDMS permet un renouvellement rapide de l'oxygène dans l'échantillon ce qui masque la consommation bactérienne. Cet effet est d'autant plus visible que le rapport surface exposée/volume du réservoir est grand, ce qui est clairement en défaveur du système miniaturisé.

2.3 Conclusion

Nous avons développé un capteur à optode sous deux formes, macrométrique et micrométrique, qui permettent d'effectuer des analyses avec des volumes d'échantillons de 4mL et de 15 μL, respectivement.
Les capteurs à optode peuvent travailler dans toute la région 0-100% de saturation en oxygène dans l'eau mais nous avons démontré qu'ils sont peu sensibles dans le cas de fortes concentrations. Ainsi, le macrosystème a été validé pour une gamme de mesure de 0 à 32mgC/L ce qui représente une gamme de faible concentration en matière organique.
Une corrélation de la dynamique bactérienne entre le micro et macrosystème a été faite pour des conditions déterminées : dans du milieu LB avec une concentration de 2.10^8 cell/mL. Cette corrélation est vérifiée mais avec une latence de 5 heures.
Toutefois, nous avons pu constater que les performances du capteur étaient largement insuffisantes pour le microsystème, certainement en raison de la diffusion de l'oxygène de l'air au travers de la puce en PDMS.
Ces problèmes trouvés pour le système à optode nous ont poussés à réfléchir à une deuxième

génération de capteur améliorant la sensibilité et la stabilité de mesure et permettent d'augumenter la gamme de détection.

Chapitre 3

Développement du capteur à résazurine

Sommaire

3.1 Introduction **44**
3.2 Qu'est ce que la résazurine? **44**
3.3 Préparation de l'échantillon **45**
3.4 Mise en place d'une expérience de référence **46**
3.4.1 Optimisation du protocole expérimental 47
3.4.1.1 Effet de la concentration en résazurine 47
3.4.1.2 Effet de l'âge de la boîte de pétri 48
3.4.2 Etalonnage de la mesure de la concentration en matière organique 49
3.4.3 Conclusion 52
3.5 Ingénierie du microsystème à résazurine **53**
3.5.1 Amélioration de la chaîne instrumentale 54
3.6 Conception et réalisation des biopuces **58**
3.6.1 Design des biopuces 58
3.6.2 Première génération de biopuce : Biopuces PDMS 59
3.6.2.1 Procédé de fabrication des biopuces 59
3.6.2.2 Résultats et limites des biopuces Verre/PDMS 60
3.6.3 Deuxième génération de biopuces : Biopuces SU8 63
3.6.3.1 Procédé de fabrication des biopuces en SU8 63
3.6.3.2 Résultats avec les biopuces en SU8 67
3.6.4 Troisième génération de biopuces : Biopuces en film DF 70
3.6.4.1 Procédé de fabrication des biopuces en film DF 71
3.6.4.2 Mise en oeuvre et caractérisation des biopuces en film DF 76
3.7 Conclusion **80**

3.1 Introduction

Compte-tenu des limites rencontrées avec le système à optodes, nous nous sommes orientés vers un autre système de mesure. Notre choix s'est porté sur l'utilisation d'un indicateur rédox qui émet une fluorescence proportionnelle à la quantité de matière organique dégradée. Cet indicateur est la résazurine (détaillée à la section 3.2) qui permet de traduire de façon efficace le métabolisme respiratoire bactérien.

3.2 Qu'est ce que la résazurine ?

La respiration bactérienne est un processus complexe multipliant plusieurs réactions chimiques permettant la dégradation des composés organiques (substrats source de carbone organique) en ATP (Adénosine Tri Phosphate). Cette succession de réactions est décrite par le cycle de Krebs qui représente la voie métabolique permettant l'oxydation des groupes acétyle, produits de la dégradation précédente. Cette chaîne respiratoire implique un grand nombre d'enzymes respiratoires permettant le transfert d'électrons.
Une présentation simple de la respiration bactérienne est donnée par la figure 3.1. Les enzymes (A, B, C et D) assurent le transport intermédiaire des électrons dans la chaîne respiratoire. Le composé organique constitue le substrat énergétique donneur d'électrons et l'oxygène est l'accepteur d'électrons final dans la chaîne respiratoire. Plusieurs couples de coenzymes respiratoires interviennent dans la chaîne respiratoire comme l'hydrogénase (H^+/H_2), le NADH déshydrogénase ($NAD^+/NADH$), le Nitrite réductase (NO_3^-/NH_3)...

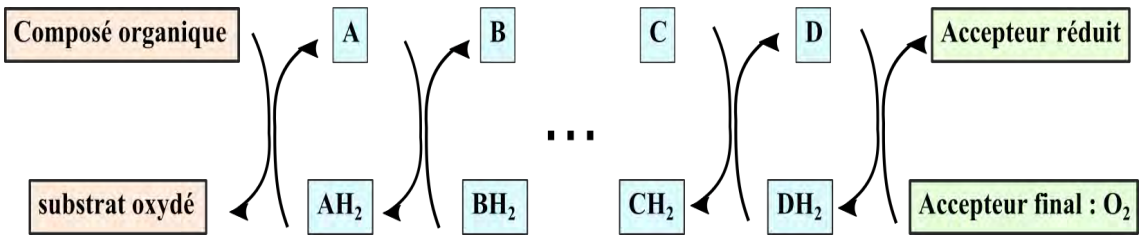

FIGURE 3.1 – Schéma simplifié de la chaîne respiratoire des bactéries

La résazurine ou 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one ($C_{12}H_7NO_4$) est un indicateur d'oxydo-réduction de couleur bleue peu fluorescent. En présence de la co enzyme déshydrogénase NADH (Nicotinamide Adenine Dinucléotide +), (figure 3.2) elle se réduit en une substance hautement fluorescente appelée « résorufine » de couleur rose. Le couple $NAD^+/NADH$ intervenant dans le métabolisme cellulaire comme transporteur d'électrons, la résazurine peut être utilisée comme marqueur/détecteur de l'activité cellulaire.

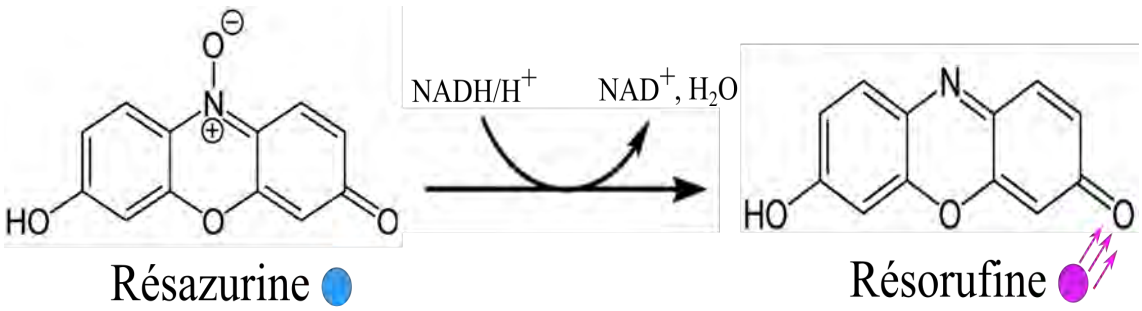

FIGURE 3.2 – Réaction de la réduction de la résazurine

Ainsi, en mesurant le signal de fluorescence émis par la résorufine, on peut remonter à la quantité de polluants organiques dans l'échantillon. La résazurine que nous avons utilisée durant nos expériences provient de la société Invitrogen®, Presto Blue Cell Viability Reagent. Elle est fournie sous forme de solution aqueuse 10 fois concentrée et peut être mélangée directement avec les microorganismes. Il est conseillé par le fournisseur de diluer la résazurine à 10% lors de son utilisation. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la résorufine sont respectivement 560nm et 590nm, comme l'illustre le spectre de fluorescence de la figure 3.3.

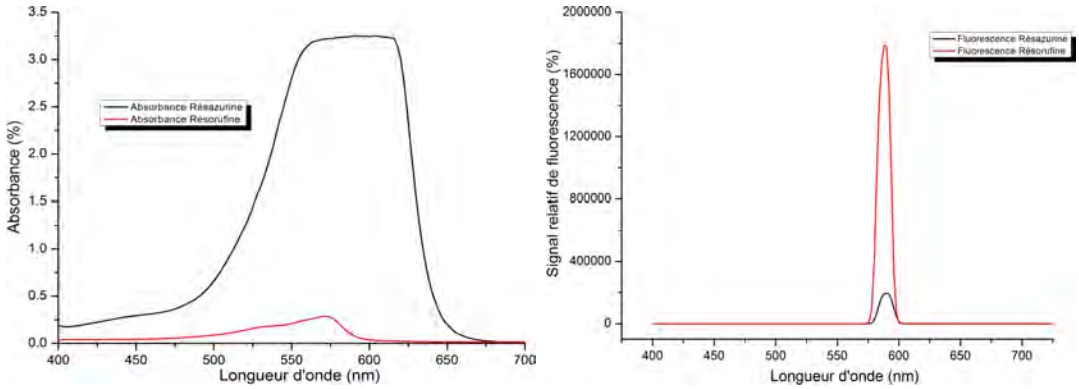

FIGURE 3.3 – Spectre d'absorbance (gauche) et spectre d'émission en fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation de 560nm (droite) du couple résazurine/résorufine

3.3 Préparation de l'échantillon

Le protocole bactérien utilisé se déroule de la même manière que celui détaillé dans la partie annexe A.2 jusqu'à l'étape de lavage des bactéries ; moment où les suspensions bactériennes dans le milieu M9 sont prêtes à être mélangées avec l'échantillon et la résazurine. Les proportions de l'échantillon final sont de 80% de suspension bactérienne dans du milieu M9, 10% de résazurine (pourcentage recommandé par le fournisseur) et 10% de l'échantillon à analyser.

3.4 Mise en place d'une expérience de référence

Etant donné la reproductibilité insuffisante des résultats obtenus dans le cadre de la thèse de L. Recoules [14], notre premier objectif a été de mettre en place une méthode de référence de manière à différencier l'origine des difficultés et à fiabiliser notre protocole expérimental.

FIGURE 3.4 – Photo lecture multimodal : varioskan [16]

Pour ce faire nous avons utilisé un lecteur de plaque multimode «Varioskan LUX» de la société Thermo Scientific®.
La figure 3.5 shématise le principe de fonctionnement du Varioskan. Le système d'illumination est une lampe Xenon à large spectre (200-850nm), à lumière pulsée à 100Hz. Le système de sélection de la longueur d'onde est composé d'un filtre de sélection de l'ordre de diffraction, de deux monochromateurs (connectés en séries afin d'augmenter l'efficacité et d'éviter les longueurs d'ondes indésirées) et d'un sélecteur de bande passante (qui est définie en fonction de la largeur de la fente des monochromateurs).
Le module de détection est composé pareillement de deux monochromateurs d'émission, des filtres de sélection d'ordre de diffraction et d'un détecteur de lumière d'émission. Les deux monochromateurs utilisés sont connectés en série avec une bande passante de 12 nm et permettent un grand rejet de la lumière parasite. Les harmoniques indésirables des monochromateurs sont bloqués par les filtres de diffraction. Enfin, la lumière d'émission est convertie en un signal électrique par un photomultiplicateur.

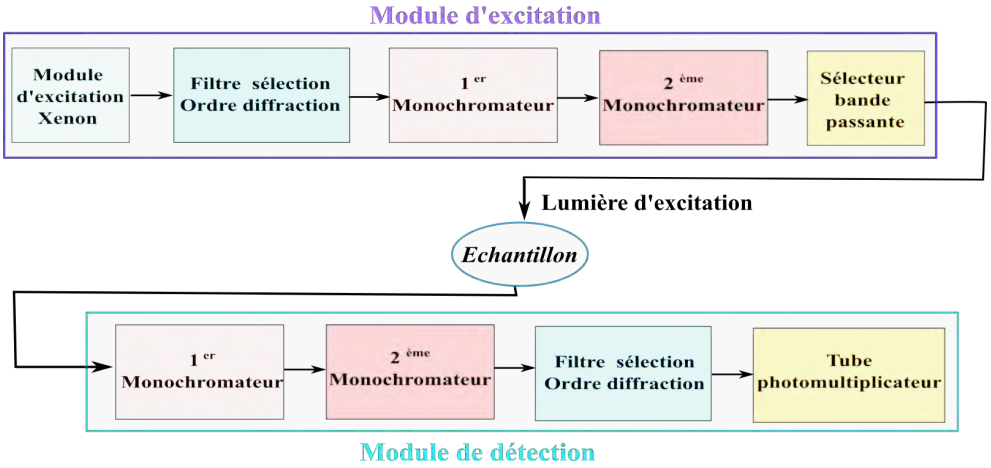

FIGURE 3.5 – Modules d'excitation et de détection optique du Varioskan

3.4.1 Optimisation du protocole expérimental

Afin de fiabiliser le protocole expérimental, notre première priorité a été de regarder l'effet de paramètres de base : la concentration en résazurine, la densité cellulaire et l'âge de la boîte de pétri.

Les conditions expérimentales des expériences faites avec le Varioskan sont :

- Un temps de mesure de 15 heures.
- Un intervalle de temps entre deux mesures de 10 minutes.
- Un temps d'intégration de 100ms.
- Des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 560nm et 590nm, respectivement.
- Une température de 30°C.

Ces conditions expérimentales ont été les mêmes pour toutes les expériences qui seront présentées dans cette section. Toutes les expériences ont été faites au minimum 3 fois.

3.4.1.1 Effet de la concentration en résazurine

Les mesures sont effectuées à une densité optique de 0,25, ce qui correspond à une concentration bactérienne de $2.10^8 cell/ml$ dans les mêmes conditions expérimentales telles que décrites précédemment.

Le signal de fluorescence de la résorufine en fonction de la concentration en résazurine est présenté par la figure 3.6 pour une concentration en matière organique de 9,6mgC/L équivalente à 25mgGluc/L.

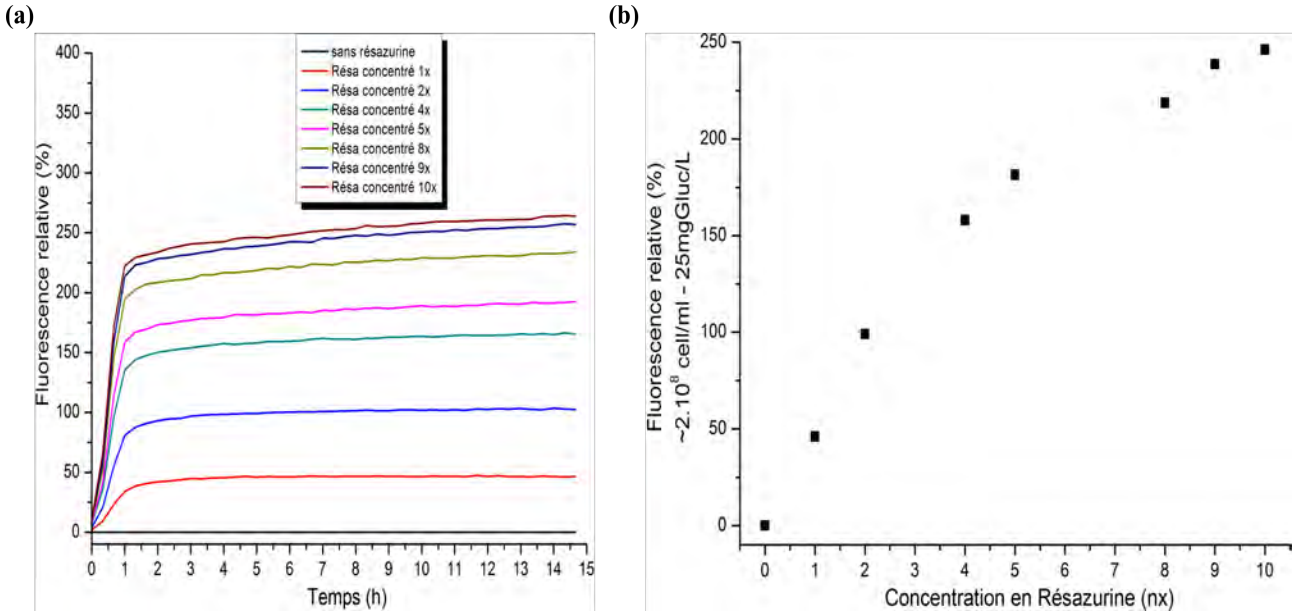

FIGURE 3.6 – a) Evolution dans le temps du signal de fluorescence pour différentes concentrations en résazurine, pour une concentration en carbone de 9,6 mg/L et une population d'*E.coli* de $2.10^8 cell/ml$ b) Variation du signal de fluorescence en fonction de la concentration en résazurine dans les mêmes conditions

Le signal est peu bruité et atteint un plateau quasi-statique après environ une heure de mesure. La figure 3.6 montre bien l'influence de la dilution de la résazurine sur l'intensité du signal. La courbe donnant la valeur du signal de fluorescence en fonction de la concentration en résazurine est tracée à partir des valeurs à dix heures de mesure.
Il ressort qu'à partir d'une concentration 8x en résazurine, le signal tend à saturer. Au delà de cette valeur, la concentration en résazurine ne sera pas un facteur limitant et que le métabolisme bactérien sera traduit complètement. En conséquence, les expériences présentées par la suite dans ce manuscrit ont été faites avec la concentration 10x en résazurine, telle que donnée par le fournisseur.

3.4.1.2 Effet de l'âge de la boîte de pétri

Les bactéries sont conservées soit sur des billes congelées à -80°C ou bien sur des boîtes de pétri (voir les détails en annexe A.2). Les boîtes de pétri sont conservées à 4°C pendant 15 jours. L'âge de la boîte de pétri n'était pas un paramètre pris en compte dans les expériences antérieures. Afin de savoir si ce paramètre peut avoir une influence sur la reproductibilité de la mesure, nous avons fait des mesures avec une même boîte de pétri pendant plusieurs jours consécutifs. Nous avons également regardé s'il y avait une variabilité d'une boîte de pétri à l'autre.
Les expériences ont été faites avec les conditions suivantes :

— Une concentration bactérienne de $2.10^8 cell/ml$.
— Une concentration en matière organique de 100mgGluc/L.

La figure 3.7 illustre l'évolution du signal du jour 1 de la boîte de pétri au jour 5. Les signaux de fluorescence du premier et du deuxième jour de la boîte de pétri sont presque confondus. Cependant à partir du 4ème jour, une chute importante du signal est remarquée, celui-ci est quasiment divisé par deux.

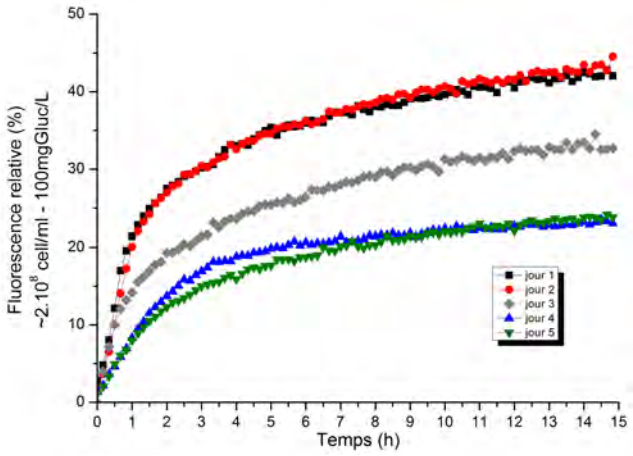

FIGURE 3.7 – Influence de l'âge de la boîte de pétri sur le niveau d'émission de fluorescence

La même expérience a été reproduite pour trois boîtes de pétri différentes au jour 1 pour une

concentration bactérienne de $2.10^8 cell/ml$ avec un taux en matière organique de 100mgGluc/L. L'écart entre ces trois boîtes de pétri est présenté dans la figure 3.8. Cet écart est minime : de l'ordre de 0,73 UFR (unité de fluorescence relative).
À partir de ces expériences, nous pouvons déduire qu'il est primordial d'utiliser la boîte de pétri toujours à jour 1 après incubation afin de garantir une bonne reproductibilité de mesure avec un écart très minime de l'ordre de 2% du signal de fluorescence. La reproductibilité d'une boîte à l'autre est excellente ce qui facilitera le comparatif entre les différents résultats.
Les expériences décrites dans la suite du document ont toujours été effectuées avec des bactéries isolées à partir de boîtes de pétri au jour 1.

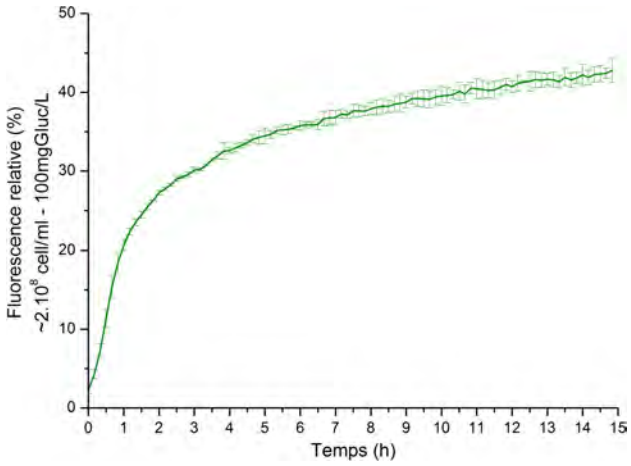

FIGURE 3.8 – Ecart du niveau de fluorescence induite entre boîtes de pétri

3.4.2 Etalonnage de la mesure de la concentration en matière organique

Le varioskan nous a permis, dans un premier temps, d'étudier l'influence de la concentration en résazurine sur le signal de fluorescence. Nous avons choisi de travailler avec la concentration de résazurine et le pourcentage de l'échantillon préconisés par le fournisseur (résazurine 10x concentré et 10% de l'échantillon). L'objectif est, dans ce cas, de calibrer le plus rigoureusement possible le système réactif bactéries/matière organique/résazurine afin de disposer de courbes de références qui nous permettront ultérieurement d'interpréter la réponse du biocapteur miniaturisé et d'en comprendre les limitations.
Les expériences ont été faites en suivant le protocole bactérien détaillé en annexe C pour une gamme de concentration en glucose de 0 à 800mg/L de glucose (équivalent à 320 mg/L de carbone organique) avec cinq concentrations bactériennes de $1,6.10^8 cell/ml$ ($DO_{590nm} = 0{,}1$) à $6,16.10^8 cell/ml$ ($DO_{590nm} = 0{,}77$).
Les courbes de la figure 3.9 montrent l'évolution dans le temps du signal de fluorescence. Une phase de croissance du signal est observée, elle est d'autant plus rapide que la population bactérienne est élevée. Le signal atteint alors un plateau dans un temps d'autant plus court que la concentration bactérienne est grande.

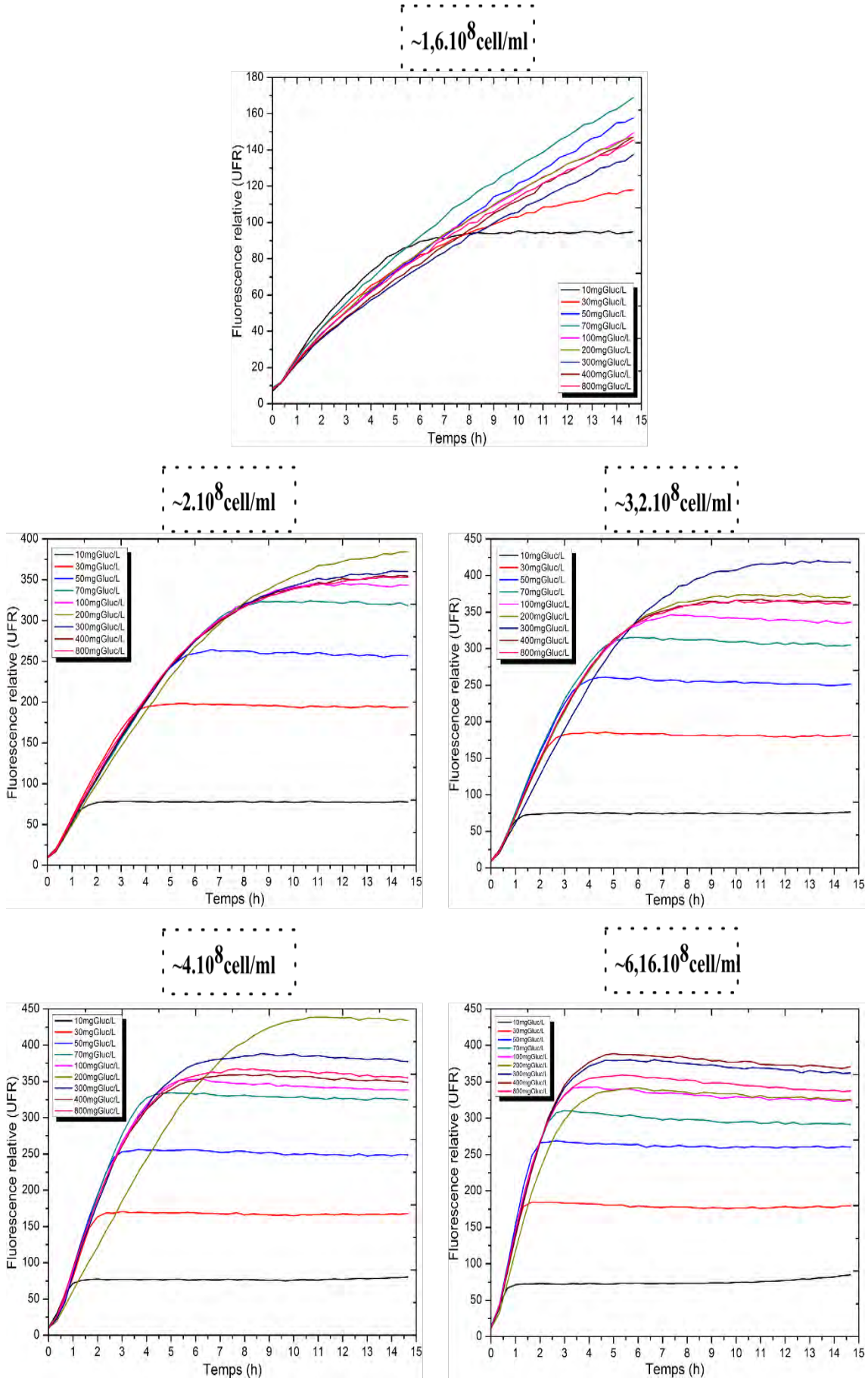

FIGURE 3.9 – Effet de la concentration bactérienne sur le signal de fluorescence émis, en fonction de la concentration en glucose

Les 15 heures d'expérience n'ont pas permis d'atteindre le plateau pour la concentration la plus basse soit $1,6.10^8 cell/ml$.
Le niveau de signal au plateau est assez peu influencé par la concentration cellulaire.
À partir des résultats obtenus (figure 3.9), nous avons calculé le coéfficient de corrélation R^2 entre la fluorescence de la résorufine et la concentration en matière organique, pour chaque concentration bactérienne et chaque temps de mesure. La valeur maximale de R^2 a été utilisée pour déterminer le temps minimal d'analyse en fonction de la densité cellulaire (figure 3.10).
D'après ces résultats, le temps minimal d'analyse est déduit : trois heures pour la plus grande densité soit $6,16.10^8 cell/ml$ contre dix heures pour la densité la plus faible $1,6.10^8 cell/ml$.
Toutefois, la corrélation entre le signal de fluorescence et la concentration en carbone baisse lorsque la densité cellulaire augmente.

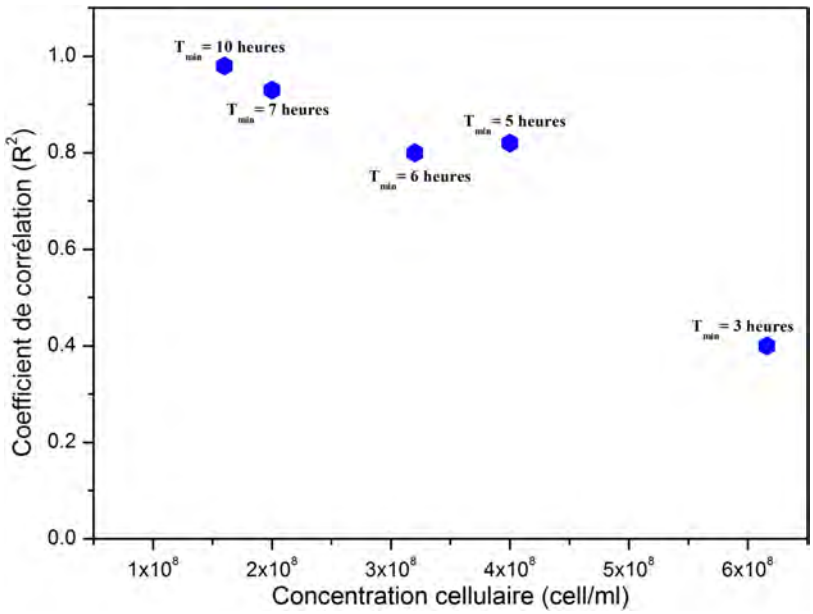

FIGURE 3.10 – Effet de la concentration bactérienne sur la corrélation entre activité respiratoire et concentration en carbone

Nous avons également tracé les gammes de mesure de la concentration en matière organique en fonction de la densité bactérienne, (figure 3.11). Cette dernière est plus étendue pour une concentration bactérienne faible tandis qu'elle est plus étroite pour les concentrations bactériennes les plus élevées. Ainsi, la concentration bactérienne de $1,6.10^8 cell/mL$ (densité optique de 0,1 à 590 nm) permet d'avoir la gamme de détection la plus étendue soit [0-300]mg/L de glucose tandis que pour la concentration bactérienne de $6,16.10^8 cell/mL$ (densité optique de 0,77), la gamme de mesure est de [0-70]mg/L de glucose.
Ces résultats permettent d'écarter certaines conditions opératoires : les concentrations cellulaires supérieures à $6,16.10^8 cell/mL$ qui présentent une corrélation insuffisante et celles inférieures à $2.10^8 cell/mL$ qui demandent un temps d'analyse trop long.

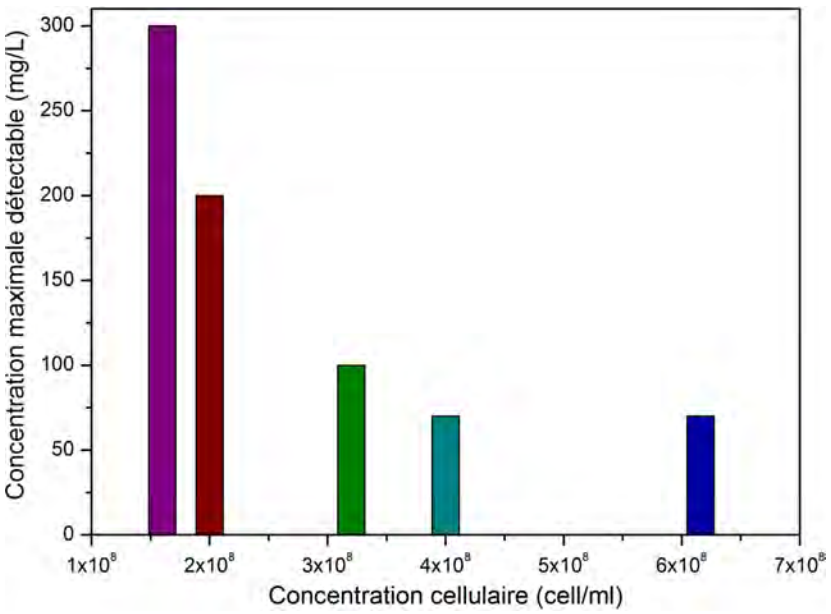

FIGURE 3.11 – Récapitulatif des gammes de détection de la matière organique en fonction des densités bactériennes

3.4.3 Conclusion

Les expériences ont été faites avec un lecteur de fluorescence varioskan sur des microplaques transparentes de 384 puits avec une contenance de 25 μL chacun. Afin de mimer le carbone organique, nous avons utilisé le glucose comme source en carbone organique et toutes les expériences ont été faites dans les conditions optimales de température, au premier jour de boîte de pétri et avec la résazurine dix fois concentrée.

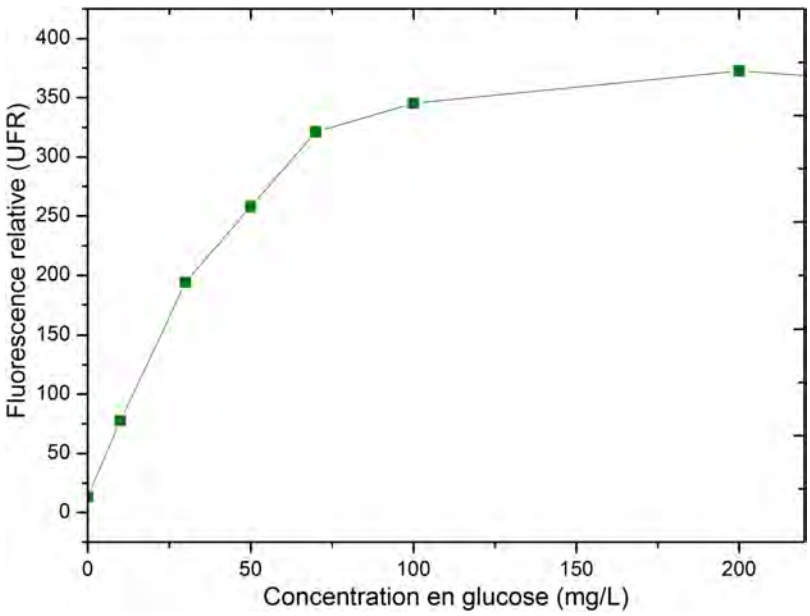

FIGURE 3.12 – Courbe de l'activité bactérienne en fonction de la concentration en matière organique pour une densité bactérienne de $2.10^8 cell/mL$

A ce stade, les principaux résultats obtenus montrent qu'un accroissement de la densité bactérienne permet la réduction du temps minimal d'analyse mais en revanche réduit les gammes de concentrations détectées.
Nous avons ainsi défini les conditions optimales pour notre protocole expérimental : la concentration cellulaire de $2.10^8 cell/mL$ correspondant à une densité optique de 0,25 à 590nm, représente un bon compromis entre le temps minimal d'analyse et la gamme de matière organique détectée.

3.5 Ingénierie du microsystème à résazurine

Une première version du microsystème à résazurine a été réalisée durant la thèse de L. Recoules [14]. Comme tout capteur de fluorescence, la chaîne instrumentale est composée de trois étages principaux : un étage d'excitation, un étage de mesure et l'échantillon à analyser placé entre les deux. La figure 3.13 illustre le schéma fonctionnel de la chaîne instrumentale.

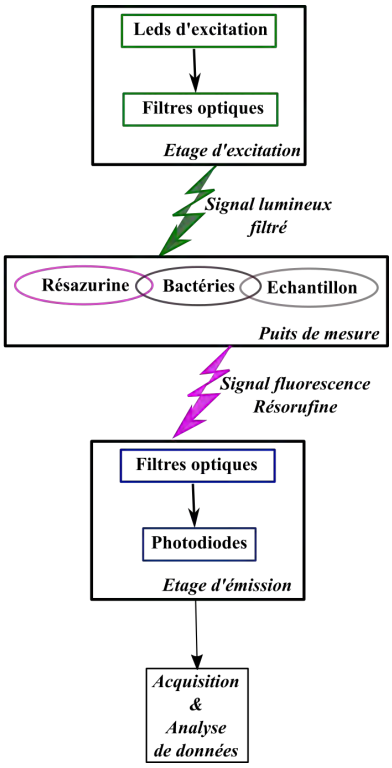

FIGURE 3.13 – Organigramme de la chaîne instrumentale du système de détection à résazurine

L'étage d'excitation comporte 8 modules de leds, deux leds pour chaque réservoir, un circuit de commande des leds ainsi qu'une référence de courant assurant une régulation de l'alimentation des leds.
L'acquisition du signal de fluorescence est assurée par un module de 8 photodiodes équipées d'un pré-amplificateur de 4 khz de bande passante et d'un gain de 1000.
Un système d'acquisition de données DAQ (Data Aquisiton and Quantification) (Ni-USB 6212) permet de commander le courant des leds ainsi que la récupération de la tension de sortie des

photodiodes et celà, à travers des entrées/sorties analogiques et des sorties numériques.
Le logiciel de traitement, d'analyse et d'affichage des données a été développé au LAAS avec le language C sous labwindows CVI. Il permet de faire varier le temps entre l'excitation des leds et la prise de la mesure, le temps d'acquisition, la fréquence de mesure et aussi la durée de cette dernière. Ces paramètres peuvent être optimisés selon les expériences à réaliser.
Les schémas des cartes électroniques et le détail de la chaîne instrumentale sont donnés en annexe D. Les composants électroniques et optiques ont été choisis en fonction des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de notre indicateur.

3.5.1 Amélioration de la chaîne instrumentale

Les travaux de L. Recoules s'étaient heurtés à un haut niveau de signal parasite : hors présence d'un échantillon fluorescent, le rapport signal/bruit était très faible.
La figure 3.14 montre le signal à vide mesuré par chaque photodiode pour un temps d'aquisition de 100ms, un délai de 300ms entre l'excitation et la mesure et un courant de polarisation des leds de 20mA.
Le signal parasite à vide est très important et varie entre 1,5V et 2,5V en fonction de la photodiode. Ce signal parasite ainsi que cet écart entre les photodiodes peut être expliqué par deux sources de bruit :

— Une source électronique qui peut provenir du bruit des cartes électroniques.
— Une source optique qui peut provenir de l'étanchéité optique insuffisante de la malette ou bien du manque d'efficacité des filtres optiques d'excitation et de détection.

Afin d'évaluer l'origine de ce bruit, nous avons caractérisé en premier lieu l'étage d'excitation. La carte électronique des leds a été testée en vérifiant à chaque fois la corrélation entre la commande et la mesure du courant de polarisation avec un ampèremètre. D'après les données du fabricant de leds, l'intensité lumineuse varie de 5600 à 18000 mcd en fonction du lot de fabrication. Nous avons mesuré la puissance lumineuse émise par chaque led en fonction du courant de polarisation (de 0mA à 20mA avec un pas de 5mA).

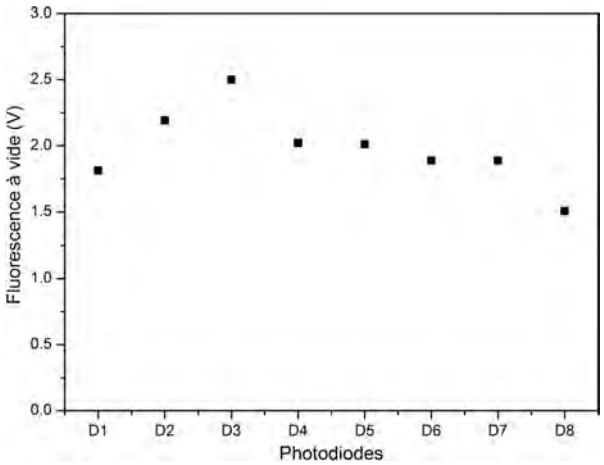

FIGURE 3.14 – Signal à vide détecté par les photodiodes

La figure 3.15 montre la moyenne de l'intensité lumineuse et l'écart entre les différentes leds en fonction du courant d'excitation. L'écart entre les leds augmente en fonction du courant de polarisation. L'erreur de mesure atteint 10% pour 20 mA de courant de polarisation des leds. Bien que léger, cet écart peut contribuer à l'erreur observée du signal détecté à vide entre les différentes photodiodes. La caractérisation du spectre d'émission des leds a été faite également dans la gamme de longueurs d'onde de 510 à 570 nm et montre une bonne correspondance avec le spectre indiqué par le fournisseur.

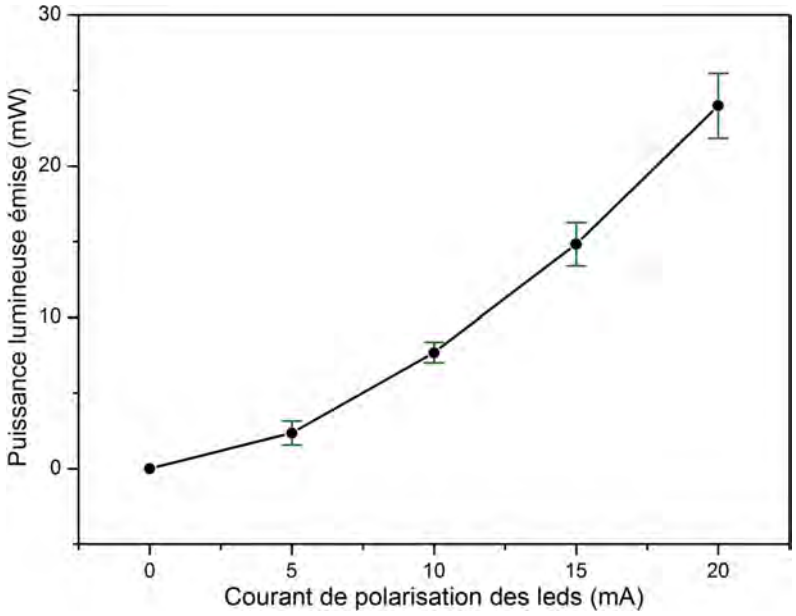

FIGURE 3.15 – Moyenne de la puissance lumineuse émise par les leds pour différents courants de polarisation (de 0 à 20 mA)

Les filtres optiques sont indispensables à notre système afin de sélectionner la longueur d'onde à laquelle nous exciterons notre échantillon et celle à laquelle l'échantillon émet.
Le premier choix des filtres s'est porté sur des filtres d'excitation de la société Semrock (FF01-542/50-25) [118] et un filtre de détection de la société Semrock également (BLP01-568-25) [119].
Une caractérisation de la transmission des deux filtres a été faite avec un spectromètre FTIR (Vortex 70 de chez Bruker Optics). Les courbes bleue et rouge de la figure 3.16 illustrent respectivement, le spectre du filtre d'excitation et d'émission.
Une bonne transmission des deux filtres de l'ordre de 98% ainsi qu'une bonne coupure du filtre d'excitation (courbe bleue de la figure 3.16) avec des fronts bien droits ont été remarquées.
Pour mieux voir le taux de recouvrement entre les deux filtres d'excitation et d'émission, nous avons calculé la densité optique qui est le logarithme du coefficient de transmission (DO = -log(T)).

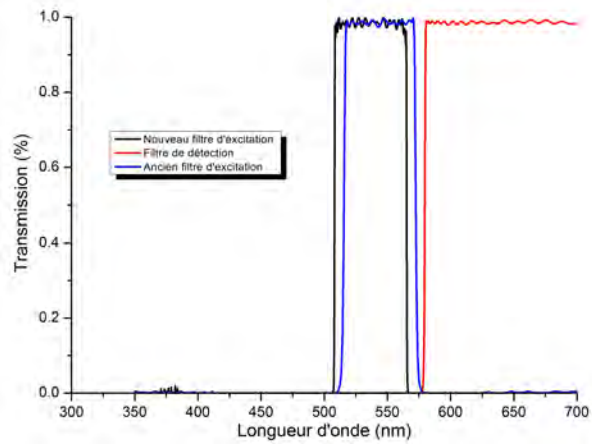

FIGURE 3.16 – Spectre de transmission des deux filtres d'excitation et du filtre d'émission

La figure 3.17 donne les valeurs de la densité optique pour le filtre d'excitation (courbe bleue) et le filtre de détection (courbe rouge). Contrairement aux courbes de transmission, ces courbes se coupent à une densité optique de 2,3 ce qui montre qu'il y une partie de l'énergie lumineuse qui passe à travers le filtre de détection.
Compte tenu de ces résultats nous avons choisi de changer le filtre d'excitation afin de minimiser ce bruit optique. Notre choix s'est porté sur le filtre de la société Semrock, référence FF01-535/50 [120], sa transmission et sa densité optique sont représentées en noir dans les figures 3.16 et 3.17, respectivement. Pour ce deuxième filtre, la coupure et le non recourvrement entres les deux filtres est assuré.

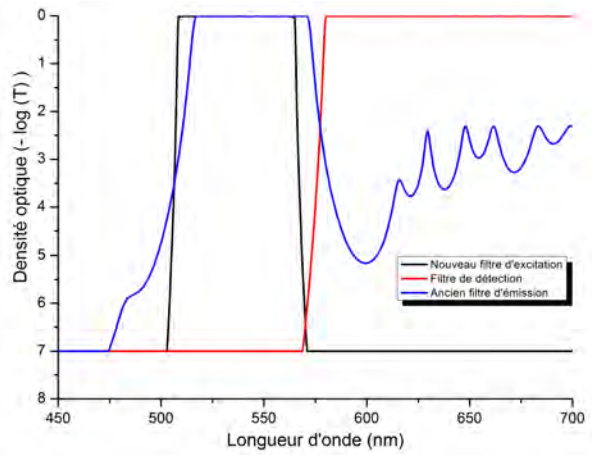

FIGURE 3.17 – Spectre de la densité optique des deux filtres d'excitation et du filtre d'émission

La figure 3.18 présente le signal à vide détecté par les photodiodes avec les ancien et nouveau filtres d'excitation. Avec le nouveau filtre, il y a une réduction du signal parasite. Toutefois, cette réduction varie entre 0,07 à 0,49 V d'une photodiode à une autre. Le problème du signal parasite reste donc présent après le changement des filtres.

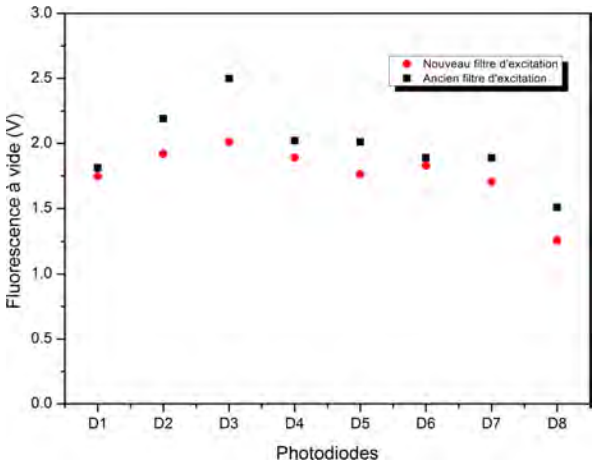

FIGURE 3.18 – Signal à vide avec les anciens filtres d'excitation et les nouveaux filtres d'excitation

Pour remédier à ce problème, nous avons appliqué plusieurs changements au support de la chaîne instrumentale. Dans un premier temps, nous avons procédé à l'anodisation des supports métalliques des filtres optiques. Aussi, par découpe laser, nous avons réalisé des supports de filtre en carton noir avec une fenêtre de mêmes dimensions que la surface active des photodiodes (soit 2,28 x 2,29 mm^2).
Les supports réalisés sont présentés dans la figure 3.19.

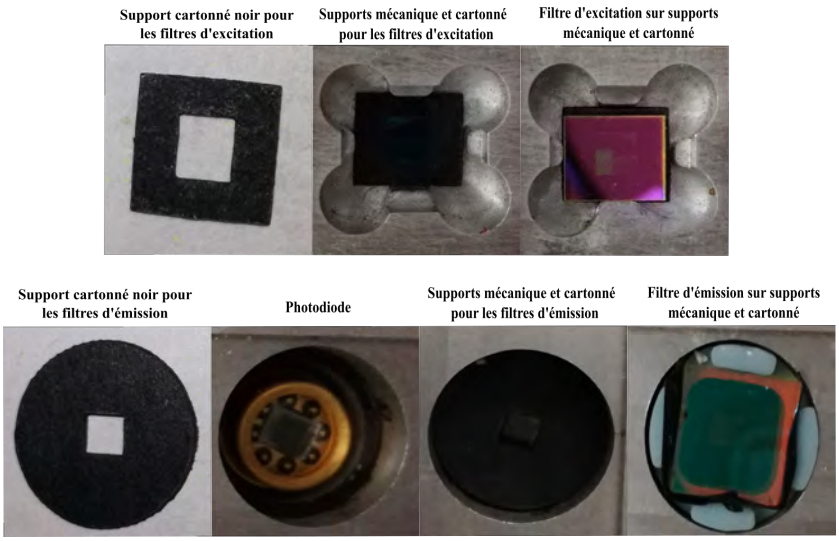

FIGURE 3.19 – Supports des filtres d'excitation et d'émission permettant une bonne étanchéité optique

Toutes ces modifications nous ont permis de réduire le signal parasite entre 0,008V et 0,15V selon la photodiode. L'écart entre les photodiodes est peu significatif et certainement dû à l'excitation des réservoirs voisins.

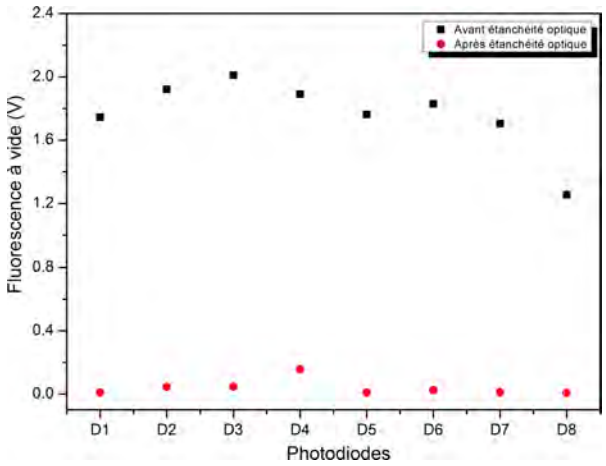

FIGURE 3.20 – Signal à vide de la chaîne instrumentale après étanchéité optique

Cette partie de l'amélioration de la chaîne instrumentale a été réalisée dans le cadre des stages de Chayma Haloui [121] et Meriem Djouaher [122].

3.6 Conception et réalisation des biopuces

3.6.1 Design des biopuces

Les dimensions des biopuces sont choisies en fonction des dimensions des photodiodes. Leur taille est de 7,4 cm de longueur et 2,4 cm de largeur. Elles sont placées en sandwich entre les deux étages d'excitation et de détection de la chaîne instrumentale. Comme le montre la figure 3.21, la puce comporte huit réservoirs de forme ovale avec un grand axe égal à 8mm et un petit axe à 6mm. Chaque réservoir est placé en regard d'une led d'excitation et au dessus d'une photodiode de détection. La forme elliptique des réservoirs a été choisie pendant la thèse de L. Recoules afin d'en faciliter le remplissage et d'éviter la formation de micro bulles.

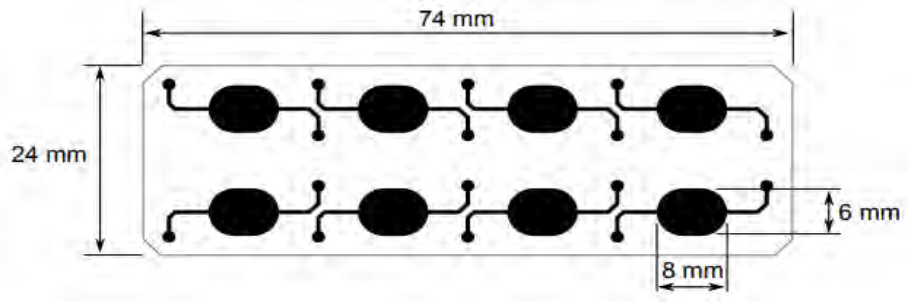

FIGURE 3.21 – Design de la biopuce à 8 puits [14]

Les entrées/sorties microfluidiques sont conçues de manière à pouvoir assurer le remplissage de manière indépendante et donc à pouvoir utiliser différentes souches bactériennes en parallèle ou à analyser différents échantillons en simultané. Les canalisations reliées aux entrées/sorties font une largeur de 500μm et une longueur totale de 4,9mm. L'entrée et la sortie de la canalisation

ont une forme circulaire de diamètre 1,5mm. La hauteur des réservoirs ainsi que des canalisations est de 500μm, ce qui fait un volume de 24μL pour chaque réservoir.

3.6.2 Première génération de biopuce : Biopuces PDMS

Une première génération de biopuces a été réalisée avec du Verre/PDMS. Le procédé de fabrication de ces biopuces est quasiment identique au procédé adopté pour les biopuces à optode et décrit dans le chapitre précédent.

3.6.2.1 Procédé de fabrication des biopuces

Chaque wafer de 4 pouces permet de fabriquer deux biopuces comme montré sur la figure 3.22.

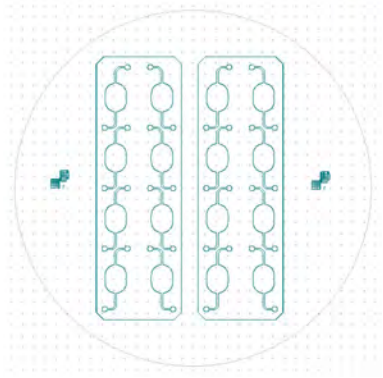

FIGURE 3.22 – Masque de la biopuce à résazurine

Les biopuces finales sont présentées sur la figure 3.23. Nous avons utilisé des cônes de pipettes enfoncés dans les entrées/sorties en PDMS afin d'assurer le remplissage du dispositif (figure 3.23).

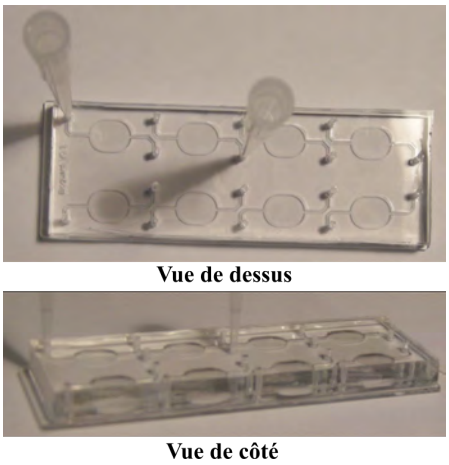

FIGURE 3.23 – Photo de la biopuce en verre/PDMS (vue de dessus et vue de côté)

3.6.2.2 Résultats et limites des biopuces Verre/PDMS

Les bactéries sont préparées en suivant les étapes du protocole bactérien détaillé en annexe C. L'échantillon complet est mis dans les réservoirs de la biopuce avec une micro pipette. La biopuce est intercalée dans la chaîne instrumentale entre le module d'excitation et le module de détection. La fluorescence de la résorufine est mesurée en temps réel à l'aide du logiciel d'acquisition de données. Les conditions expérimentales sont :

— 300ms entre l'excitation et la mesure par les photodiodes.
— 100ms de temps d'intégration.
— Une mesure est prise toutes les 10 minutes pendant 15 heures.
— La gamme de concentration en glucose est comprise entre 0 et 400 mg/L : 0, 10, 40, 80, 100, 150, 200 et 400 mg/L.
— La température de la malette est de 30°C.

L'évolution du signal de fluorescence dans le temps pour différentes concentrations en glucose est reportée dans la figure 3.24. Les courbes montrent des cinétiques similaires à celles trouvées avec la méthode de référence avec une bonne reproductibilité.
À partir de ces courbes, nous avons pu déduire la courbe d'étalonnage du signal de fluorescence à 10 heures en fonction de la concentration en glucose.

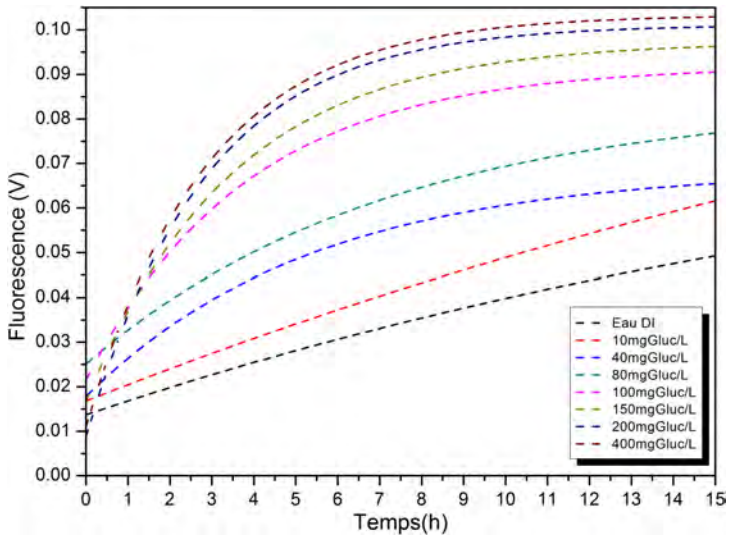

FIGURE 3.24 – Signal d'émission de fluorescence de la résorufine mesurée dans les biopuces en Verre/PDMS pour une gamme de glucose 0 à 400 mg/L avec une concentration bactérienne de 2.10^8cell/mL

La figure 3.25 présente la courbe d'étalonnage pour la gamme de 0 à 400 mg/L de glucose. Nous remarquons que le signal de fluorescence augmente avec le taux en matière organique et que la gamme de détection est comprise entre 10 et 200 mgGluc/L. En effet, à partir de 200 mgGluc/L une saturation de notre capteur est constatée.

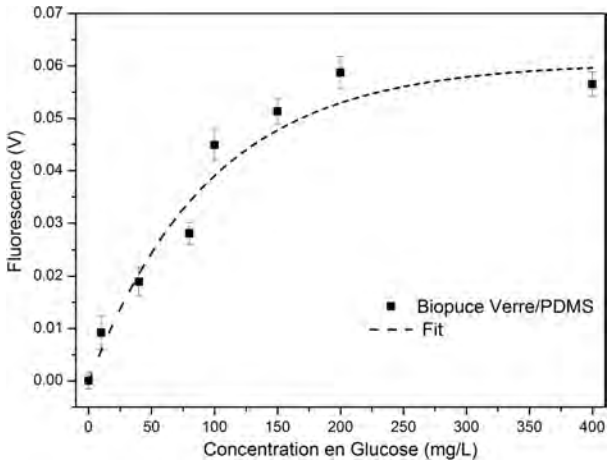

FIGURE 3.25 – Courbe étalon avec les biopuces Verre/PDMS pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose

Cette saturation du signal est due à la saturation de l'activité respiratoire bactérienne. Ces résultats nous permettent de déterminer la sensibilité de 0,29 mV/[mgGluc/L] pour notre capteur. Sur la partie linéaire des courbes de la figure 3.24 entre une heure et 5 heures de mesure, la pente en (mV/h) pour chaque concentration en glucose est calculée. La figure 3.26 représente les variations de la pente à l'origine de la consommation en carbone en fonction de la concentration de l'échantillon en matière organique. Une corrélation satisfaisante (R^2=0,9) est observée entre 10 et 200mg/L de glucose, démontrant que la pente à l'origine peut également être une signature des polluants.

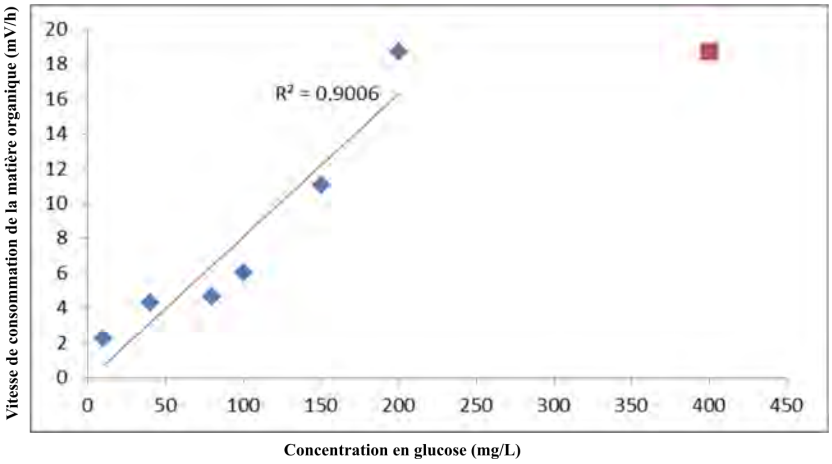

FIGURE 3.26 – Réduction de la résorufine dans le temps en fonction de la concentration en glucose

Par ailleurs, nous avons contrôlé le niveau du signal/bruit pour chaque concentration afin de nous assurer de la qualité de la mesure.
La figure 3.27 illustre les valeurs du rapport signal sur bruit en fonction de la concentration en glucose. Il atteint la valeur de 5 pour 200mg/l de glucose. Ce bon rapport de signal sur bruit traduit l'efficacité de notre chaîne instrumentale.

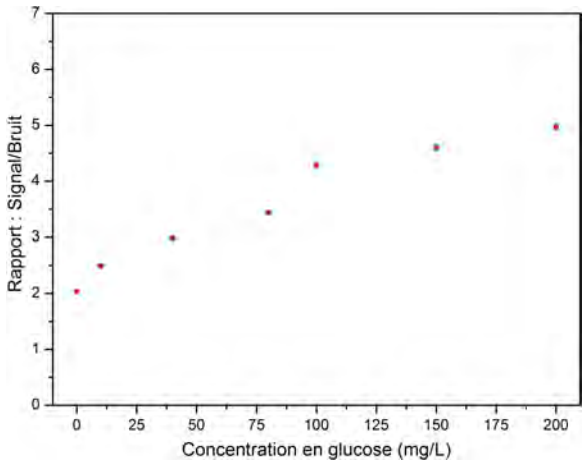

FIGURE 3.27 – Rapport signal/bruit en fonction de la concentration en glucose pour les biopuces Verre/PDMS

Nous avons également souhaité vérifier l'influence de la diffusion de l'oxygène de l'air au travers de la structure en PDMS sur la mesure de la fluorescence.
Pour ce faire, les mêmes expériences ont été répétées à l'air libre et dans une enceinte d'Argon. La figure 3.28 montre les résultats obtenus pour une concentration en glucose de 40mg/L et une concentration bactérienne de 2.10^8cell/mL.

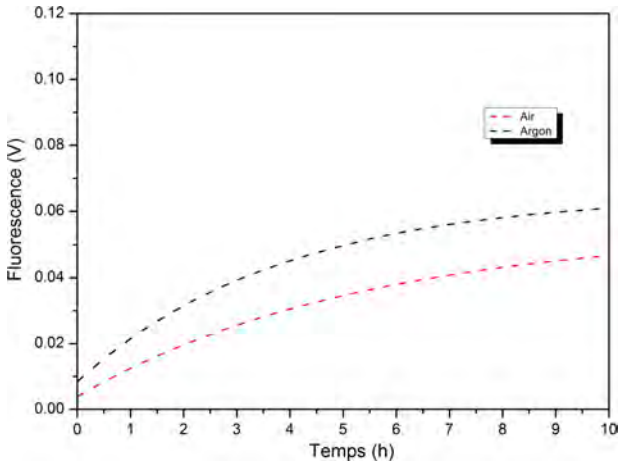

FIGURE 3.28 – Signal de réduction de la résorufine avec des puces en Verre/PDMS à l'air libre et en enceinte sous Argon (40mgGluc/L)

Nous remarqueons qu'il y a un écart sensible entre la cinétique du même échantillon sous l'enceinte d'argon et à l'air libre. Effectivement, à dix heures de mesure, un écart de 0,013 V soit 24% du signal et aussi une cinétique plus rapide sous l'enceinte d'argon ont été démontrés.
Ces résultats confirment l'hypothèse de la diffusion de l'oxygène au travers du PDMS ainsi que la limitation du PDMS comme matériau pour les biopuces.
Afin de remédier à ce problème, nous avons décidé de réaliser les puces avec des polymères moins poreux que le PDMS.

3.6.3 Deuxième génération de biopuces : Biopuces SU8

Le LAAS maitrise de longue date les technologies de microfabrication utilisant la résine SU8. Il s'agit d'une résine époxy transparente présentant une légère coloration résiduelle jaune.
Afin de tester la biocompatibilité de la SU8, nous avons eu recours à un test commercial appelé « Live/Dead bacteria »[123]. Il est composé de deux fluorophores le syto9 et l'iodure de propidium qui s'excitent et émettent respectivement à des longueurs d'onde de 480/500nm et 490/635nm.

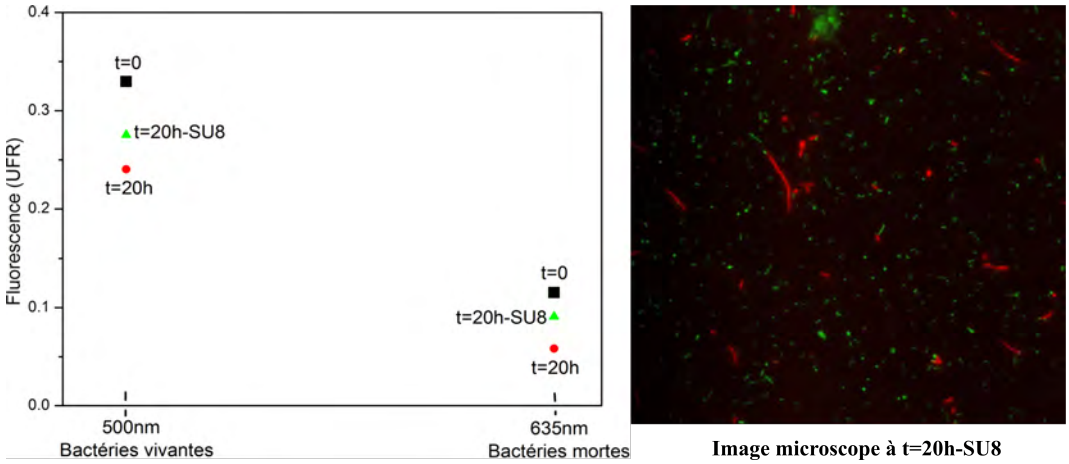

FIGURE 3.29 – Biocompatibilité de la SU8 avec l'*E.coli* : à gauche le signal de fluorescence des bactéries mortes et vivantes à t=0 et à t=20 heures et à droite une image de microscope optique à t=20 heures.

Le mode opératoire est de mélanger l'échantillon avec les bactéries (à la dernière étape du protocole bactérien détaillé en annexe C) une partie avec le syto9 traduisant le taux de bactéries vivantes en émettant à 500nm après excitation à 480nm et une autre avec l'iodure de propidium qui lui au contraire traduit le taux de bactéries mortes à 490nm, émettant à 635nm.
Afin de vérifier la biocompatibilité de la SU8, nous avons mesuré avec le varioskan et avec un microscope optique la fluorescence de l'échantillon à t=0 et à t=20 heures après avoir passé l'échantillon dans un puit d'une puce en SU8 et dans un eppendorf. En superposant, grâce à un traitement d'images, les images de bactéries mortes et vivantes pour les bactéries dans une puce en SU8 après 20 heures de mesure, nous obtenons l'image présentée par la figure 3.29 qui illustre bien le taux de bactéries vivantes dans des puces en SU8. Le traitement d'image a été fait avec « imageJ ».
Grâce à ces expériences, nous avons validé la biocompatibilité de la résine SU8 avec nos bactéries et notre application.

3.6.3.1 Procédé de fabrication des biopuces en SU8

En gardant le design présenté à la section (3.6.1), nous avons procédé à la fabrication des biopuces en Verre/SU8.

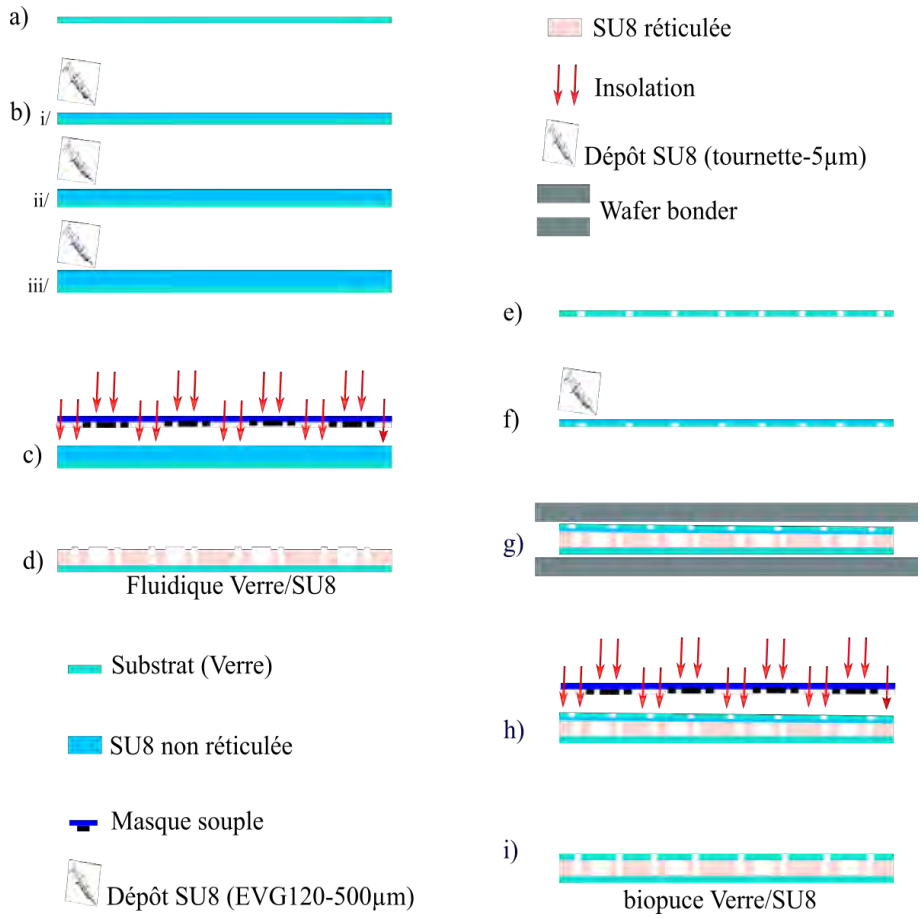

FIGURE 3.30 – Procédé de fabrication de la biopuce Verre/SU8

Le procédé de fabrication est détaillé sur la figure 3.30 ainsi que dans le tableau 3.1. Il repose sur le même principe que la fabrication du moule en Silicium/SU8. Le procédé commence par l'édition du masque souple à l'aide du logiciel Clewin mais en inversant la polarité par rapport au masque fait pour le moule dans la section (3.6.2).

La résine SU8 est déposée sur un substrat Verre (wafer 4 pouces schott AF32 d'épaisseur 500 μm). Le choix d'un substrat en verre se justifie par le fait qu'il garantit une lecture optique optimale.

Une étape de nettoyage du substrat en Verre est primordiale avant le dépôt de la résine (voir première étape du tableau 3.1).

Le dépôt de la SU8 se fait en couche épaisse de 500μm et cela avec une vitesse de rotation du plateau de 800tr/min sur trois enductions succèssives (le dépôt est fait avec une machine d'enduction EVG120). Les étapes b)i à b)iii illustrent le dépôt de résine.

Une étape de photolithographie impliquant l'utilisation d'un masque souple, suit le dépôt de la résine. Le temps d'insolation dépend de la nature du substrat utilisé atant donné que le degré de réflexion varie d'un substrat à un autre. Dans notre cas, le temps d'insolation est de 80s pour une dose d'énergie de 20mW.cm^{-2} à 365nm.

Après l'insolation, un recuit est fait sur une plaque chauffante HP de la société Suss Microtec. Le recuit démarre à 65°C, puis la température augumente suivant un gradient de 10°C/min jusqu'à

atteindre 95°C. Un plateau de 27min à 95°C est choisi puis la température descend de 5°C/min jusqu'à atteindre 25°C.
L'étape de développement est opérée dans un bain de « développeur SU8 »pendant 30min. Pour accélérer cette étape, le crystallisoir contenant le développeur et le wafer est mis sur une plaque tournante, le bain de développeur est renouvelé trois fois. Un rinçage avec de l'isopropanol et un séchage à l'azote sont effectués pour finir. Le wafer est prêt à être découpé avec une machine de découpe à scie diamantée.
L'étape qui suit est la préparation du capot en verre de la puce. À partir d'un wafer en Verre AF32, les entrées/sorties fluidiques de la puce ont été percés avec une sableuse et les puces sont découpés à l'aide d'une scie diamantée. Afin de simplifier et optimiser cette étape, un film photosensible sur les deux côtés du wafer (PH2040) a été laminé et avec un masque souple, où figure les entrées/sorties ainsi que les dimensions des puces, nous avons insolés. Cette astuce nous facilite l'étape de préparation du capot.
Une fine couche de résine SU8 de 5μm d'épaisseur est déposée sur le capot. Le procédé de dépôt est détaillé à l'étape 5) du tableau (3.1).

Etape	Schéma	Description
1	(a)	Nettoyage du substrat (Verre AF32)- Bain H_2O_2/H_2SO_4 (2min). Plasma O_2, 800W, 15min.
2	(b) : i-iii	Dépôt SU8-500 μm. Dépôt et enduction 3 fois de suite pendant une nuit avec la machine EVG120.
3	(c)	Photolithographie : Insolation avec masque souple, $\lambda = 365nm$, 20mW.cm^-2, 80s. PEB (rampe) :95°C, 27min
	(d)	Développement : 3 bains de "développeur SU8" pendant 30min
	-	Recuit (rampe) : 125°C, 2min : fluidique Verre/SU8
4	(e)	Préparation du capot de la biopuce (Verre AF32) :
	-	Perçage des entrées/sorties avec une sableuse.
	-	Découpe capot de puce individuelle (scie diamantée).
	-	Nettoyage - Plasma O_2, 800W, 15min.
5	(f)	Dépôt couche 5μm de SU8 : Tournette 3000tr/min , accélération 300, 30s.
	-	Recuit : 95°C, 3min : capot prêt à être scellé à la fluidique
6	(g)	Bonding fluidique et capot, 110°C, 1200N, 5min. (wafer bonder)
7	(h)	Photolithographie : Insolation avec masque souple, $\lambda = 365nm$, 20mW.cm^-2, 8s. PEB :95°C, 6min (côté capot).
8	(i)	Développement : bains de "développeur SU8" pendant 3min sous cloche sous-vide.
	-	Recuit côté capot (rampe) : 125°C, 2min : Biopuce Verre/SU8

Table 3.1 – Procédé de fabrication de la fluidique Verre/SU8

Le scellement est fait ensuite avec une machine de wafer bonding AWB04 Bonder à une température de 110°C avec une force appliquée de 1200N pendant 5min.
Après bonding, l'ensemble est insolé à 20mW.cm^-2 à 365nm pendant 8s avec le même masque que la première insolation de la fluidique. Un recuit est fait après exposition pendant 6min à 95°C. Le développement est fait par la suite sous cloche à vide et avec agitation dans un bain de développeur SU8. La cloche à vide permet de faire circuler le développeur dans les canalisations et les réservoirs des biopuces.

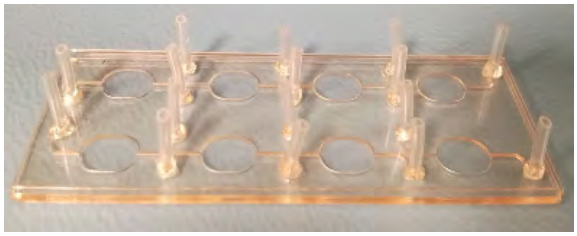

Figure 3.31 – Photo d'une biopuce SU8/Verre

Une étape finale de recuit du côté du capot est faite à 125°C pendant 2min : les biopuces Verre/SU8 sont alors terminées. La figure 3.31 montre une photo de la biopuce en SU8/Verre finalisée.
Le procédé a été optimisé de manière à obtenir des structures d'excellente qualité comme montré sur la figure 3.32.

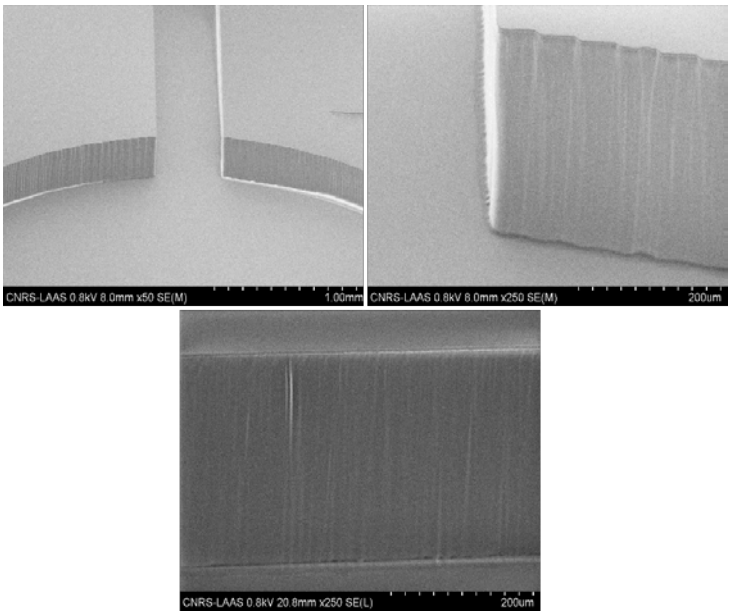

FIGURE 3.32 – Images MEB des biopuces SU8/Verre

3.6.3.2 Résultats avec les biopuces en SU8

Les tests sont réalisés en suivant le même protocole que celui de la section 3.6.2.2. L'échantillon à analyser est mis dans les réservoirs de la biopuce par remplissage avec une micro pipette. La biopuce est mise entre le module d'excitation et le module de détection. La fluorescence de la résorufine est mesurée en temps réel à travers les photodiodes et les données sont collectées par le logiciel dédié. Les conditions expérimentales sont :

— 300ms de durée entre l'excitation et la mesure par les photodiodes.
— 100ms de temps d'intégration.
— Une mesure est prise toutes les 10 minutes pendant 15 heures.
— Une gamme de glucose comprise entre 0 et 400 mg/L : 0, 10, 40, 80, 100, 150, 200 et 400 mg/L.
— La température de la malette est de 30°C.

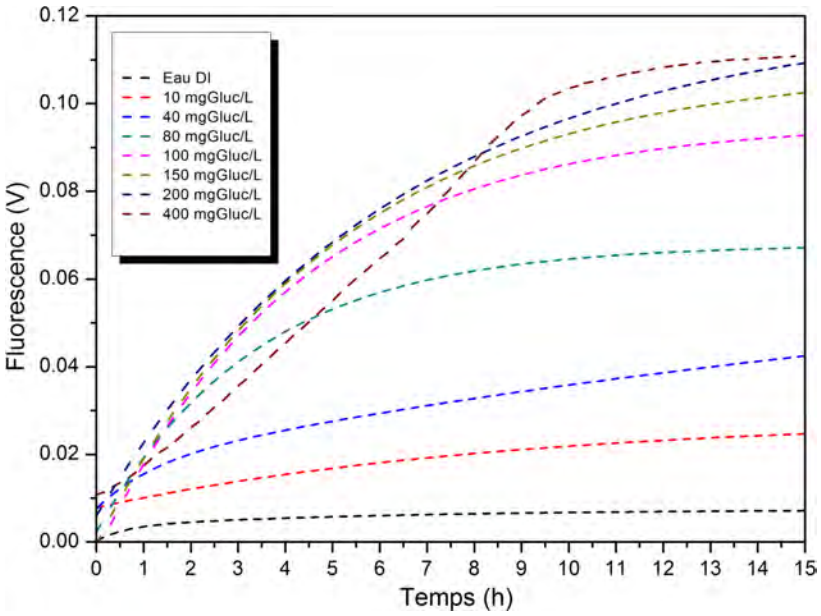

FIGURE 3.33 – Signal de fluorescence de la résorufine pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose avec des biopuces en Verre/SU8 avec une concentration bactérienne de 2.10^8cell/mL

Pour une concentration bactérienne fixée à 2.10^8cell/mL, nous avons mesuré plusieurs fois consécutives la cinétique du signal de fluorescence de la résorufine pour plusieurs concentrations en matière organique. La figure 3.33 illustre les allures de la respiration bactérienne pour 8 concentrations différentes en matière organique et cela, sur 15 heures de mesures.
De ces courbes, nous avons remarqué une nette influence du taux de la matière organique sur la respiration bactérienne. Aussi, les cinétiques de respiration bactérienne sont très rapprochées de celles trouvées avec le varioskan avec une très bonne reproductibilité des mesures.
En nous plaçant sur le plateau vers 8 heures de mesure, nous avons pu tracer une courbe d'étalonnage de la fluorescence en fonction de la concentration en glucose.

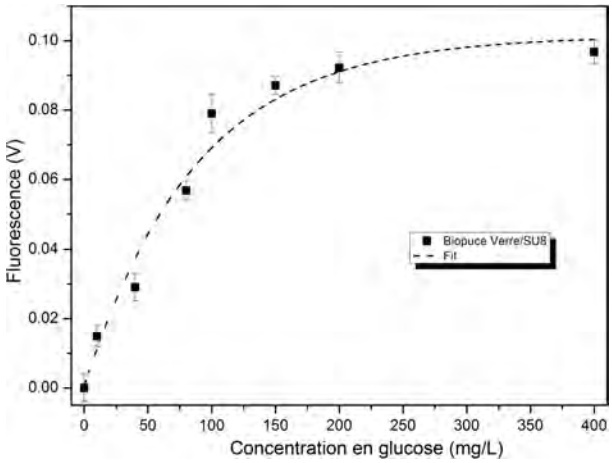

FIGURE 3.34 – Courbe d'étalonnage avec les biopuces Verre/SU8 pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose

La figure 3.34 montre que le signal de fluorescence augmente avec la concentration en matière organique. La gamme de détection est comprise entre 0 et 200 mgGluc/L. À partir de 200 mgGluc/L, une saturation du système s'installe. Cette saturation à 200mgGluc/L est équivalente à celle observée avec les biopuces en Verre/PDMS. Pour les biopuces en Verre/SU8, la sensibilité du capteur est de 0,48 mV/[mgGluc/L]. Le système est beaucoup plus sensible que les biopuces en Verre/PDMS dont la sensibilité était de 0,29 mV/[mgGluc/L].
Sur la partie linéaire des courbes de la figure 3.33, entre une heure et 5 heures de mesure, les variations de la pente à l'origine de la consommation en carbone sont mesurées en fonction de la concentration de l'échantillon en matière organique.

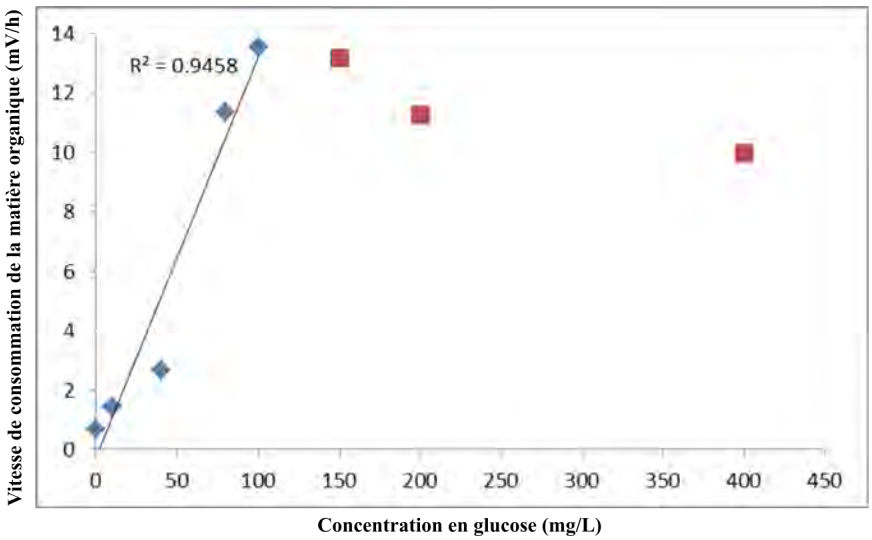

FIGURE 3.35 – Signal de fluorescence par heure en fonction de la concentration en glucose

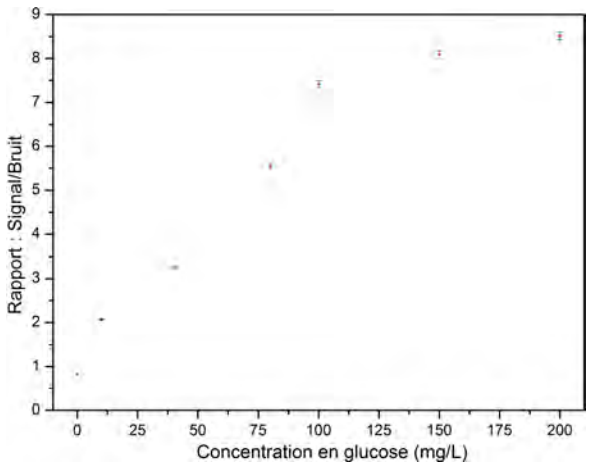

FIGURE 3.36 – Rapport signal/bruit en fonction de la concentration en glucose pour les biopuces Verre/SU8

La figure 3.35 présente une très bonne corrélation (R^2=0,95) entre 0 et 100 mg/L de glucose. Le rapport du signal sur bruit est vérifié pour chaque concentration en matière organique. La

figure 3.36 illustre les valeurs du rapport signal sur bruit en fonction de la concentration en glucose. Celui-ci atteint la valeur de 8,9 pour la concentration de 200mg/l de glucose. A travers ces valeurs, une limite de mesure est donnée pour la concentration en glucose de 10 mg/L. Ce bon rapport de signal sur bruit traduit bien évidemment la fiabilité de notre capteur.
Comparé aux biopuces en Verre/PDMS, le rapport signal sur bruit a augumenté de 45% pour la même concentration en matière organique. Ces résultats valident l'effet présent de la diffusion de l'oxygène au travers du PDMS sur la mesure de la matière organique contenue dans l'échantillon.

3.6.4 Troisième génération de biopuces : Biopuces en film DF

La résine photosensible SU8 a montré son efficacité et a été utilisée dans de nombreux travaux dans le domaine des laboratoires sur puce, des MEMS et des biopuces. Cependant, ce matériau est onéreux avec un temps de fabrication important en particulier pour des couches épaisses.
Une alternative intéressante consiste à utiliser des films secs (dry films) de la société Engineered Material Systems [124]. Il s'agit d'une résine négative type époxy comme la SU8.
Ces films secs de la série DF-1000 répondent aux critères suivants :

1. Matériau peu coûteux (pour une épaisseur de 50 μm le coût est de 1,6 euro comparé à 10 euro pour la SU8).
2. Une bonne stabilité chimique.
3. Peu fluorescent.
4. Biocompatible.

Ils sont vendus sous forme de rouleaux de différentes épaisseurs allant de 5 μm (DF-1005) à 50 μm (DF-1050). Ils peuvent être déposés par laminage (dans la section 3.6.4.1 une présentation détaillée du procédé de fabrication est faite).

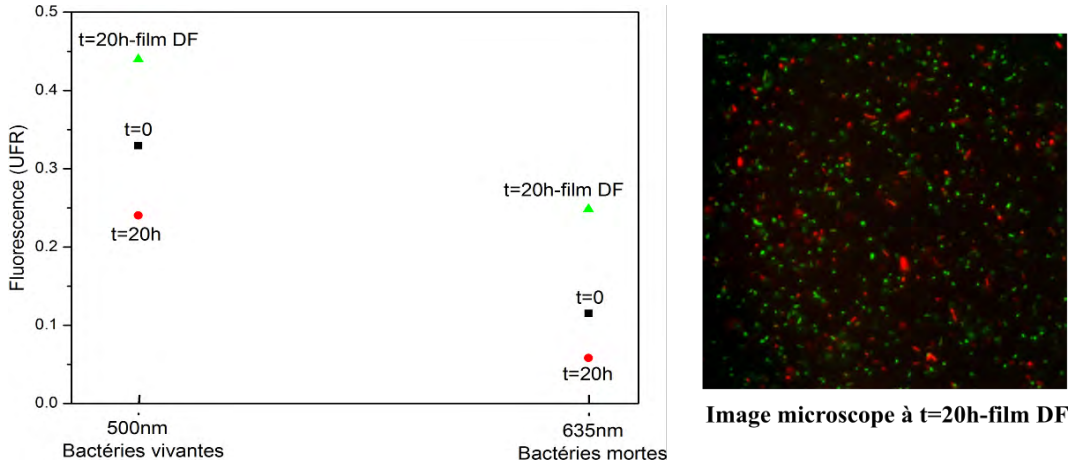

FIGURE 3.37 – Biocompatibilité du film DF avec l'*E.coli*

Le test de biocompatibilité fait avec le film sec DF est le même qu'avec la résine SU8. il a été fait de la même manière avec . En effet, les bactéries dans le milieu M9 sont mélangées avec

les proportions de fluorophore recommandées par le fournisseur du kit Live/Dead bacteria.
La figure 3.37 illustre les résultats de la biocompatibilité du film DF avec notre souche bactérienne. Les courbes de gauche illustrent le résultat mesuré avec le varioskan et la figure de droite présente l'image prise avec un microscope optique droit et cela à t=0 et t=20 heures de mesure. Comme pour la résine SU8, la biocompatibilité du film sec DF avec notre souche bactérienne a été validée. Ces résultats confirment les tests effectués par Courson et al [124].

3.6.4.1 Procédé de fabrication des biopuces en film DF

Le procédé de fabrication des puces en film sec DF se divise en deux étapes principales : une étape de fabrication de la fluidique et une étape de capotage.

Fabrication de la fluidique des biopuces Verre/Film DF : La première étape est la fabrication de la fluidique en Verre/Film DF. Le tableau 3.2 et la figure 3.39 en détaillent les étapes. Les premiers essais ont été réalisés sur un substrat en Verre de type Borofloat 33 en suivant les étapes de fabrication détaillées ultérieurement. Un problème d'adhérence au substrat a été détecté. En effet, le film est totalement décollé du substrat (figure 3.38).

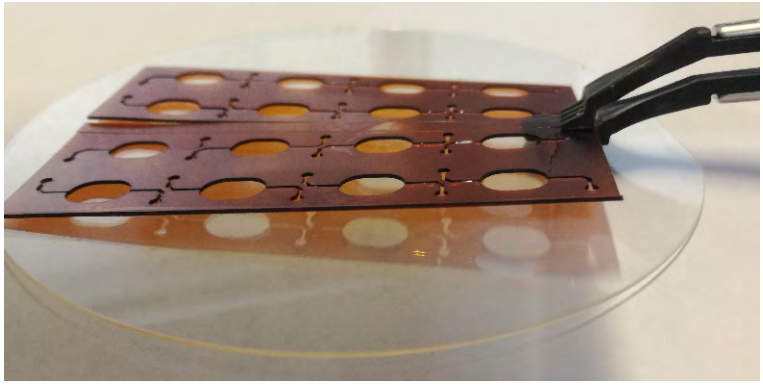

FIGURE 3.38 – Problème de décollage de la fluidique en DF sur un substrat verre B33

En changeant le substrat B33 par un substrat verre de type Schott AF32, ce problème a été complètement résolu.
L'épaisseur souhaitée de nos puits étant de 500μm, l'étape de laminage est délicate. En effet, le film DF le plus épais est de 50μm ce qui nécessite de laminer 10 films de 50μm pour atteindre l'épaisseur voulue.
L'empilement de plusieurs films DF est un procédé critique au moment du retrait du liner avant laminage de la couche suivante. Cette étape est critique car une partie de la résine accroche sur le liner ou bien des stries sur la résine au moment d'enlever le liner impliquant une surface en relief et pas homogène. Aussi, cet empilement engendre une contrainte mécanique qui peut provoquer une cassure du wafer au moment du laminage des dernières couches et aussi des problèmes d'alignement pendant l'étape de photolithographie en raison de la déformation du wafer.

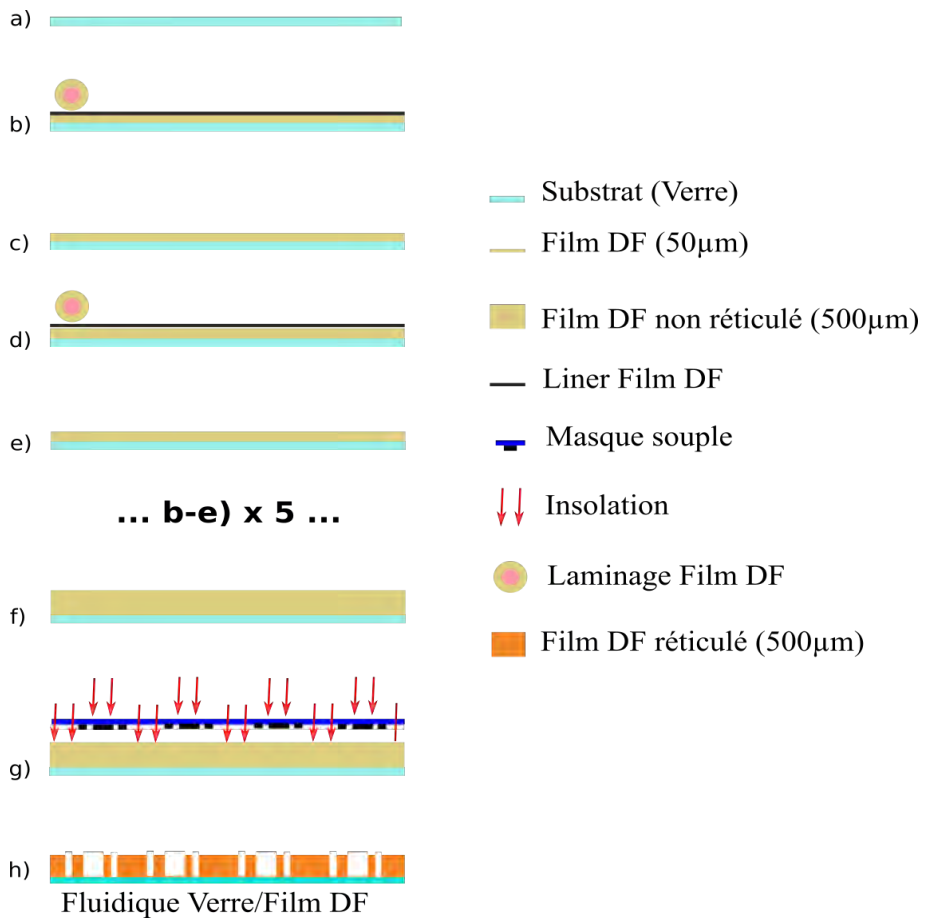

FIGURE 3.39 – Procédé de fabrication de la fluidique Verre/Film DF

Le temps d'insolation du film DF d'épaisseur 50μm est de 12s avec une énergie de 20mW.cm^{-2} à 365nm. Dans notre cas, le substrat est du verre et nous avons utilisé un masque souple ce qui rajoute un temps d'insolation de 20% et 50%, respectivement. Le temps total d'insolation est de 400s, ce qui est considérable.

Un recuit vient suivre l'étape de photolithographie. Comme pour la SU8, le recuit commence à 65°C suivi d'une rampe jusqu'à atteindre 100°C à vitesse de 10°C/min, un plateau de 900s à 100°C et enfin une descente en température jusqu'à 25°C à une vitesse de 10°C/min.

Une épaisseur de 500μm de film DF nécessite un temps lent de développement. Le développement est fait avec du cyclohexanone et cela en changeant trois fois le bain sous agitation pendant 42 minutes.

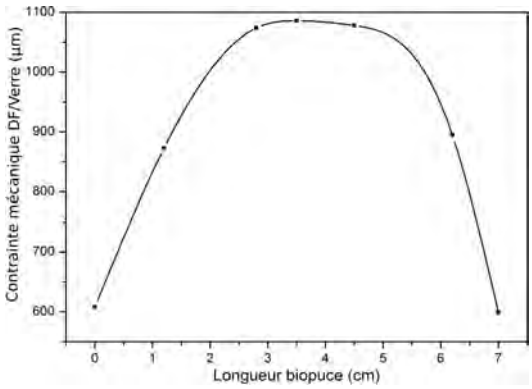

FIGURE 3.40 – Contrainte mécanique suite à l'empilement de films DF pour nos biopuces

Etape	Schéma	Description
1	(a)	Nettoyage substrat (Verre)- Bain H_2O_2/H_2SO_4 (2min). Plasma O_2, 800W, 15min. Découpe et retrait du liner.
2	(b-c)	Laminage film DF 50μm. Pression = 2,5bar, Vitesse des rouleaux = 0,5 m/min, T = 110°C.
3	(f)	Répéter les étapes (b-c) de laminage du film DF 50μm 10 fois jusqu'à atteindre l'épaisseur de 500μm.
4	(g)	Photolithographie : Insolation avec masque souple, $\lambda = 365nm$, 20mW.cm^-2, 400s. PEB (rampe) :100°C, 15min
5	(h)	Développement : bain de "Cyclohexanone" pendant 42min. Fluidique Verre/Film DF

TABLE 3.2 – Protocole de réalisation de la fluidique Film DF/Verre

La figure 3.41 de la fluidique en film DF/Verre montre l'image de la fluidique avec un microscope à balayage électronique sous plusieurs angles. Cette image illustre l'empilement des dix couches du film sur le substrat en Verre. On remarque une différence de résolution par rapport à l'image de la fluidique faite dans la partie précédente avec la résine SU8. Cette différence peut être due à l'empilement du film DF et aussi à l'utilisation du masque souple qui présente une résolution de 30 μm.

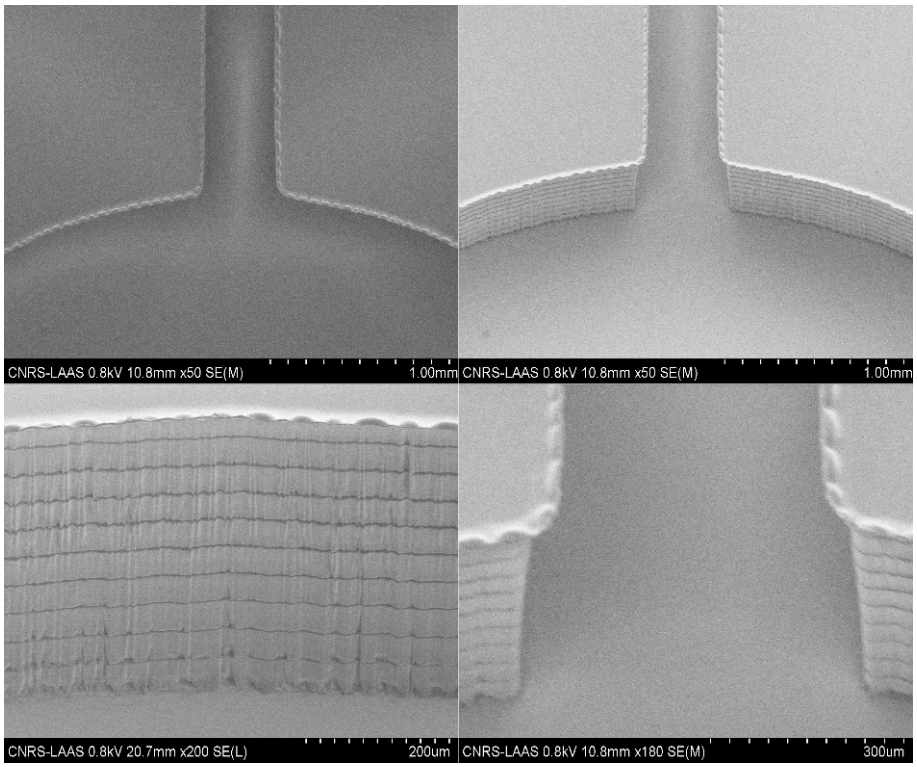

FIGURE 3.41 – Images MEB des biopuces DF/Verre

Une caractérisation de l'épaisseur des dix couches de film DF 50 μm est faite après développement, avant et après recuit (hard bake).
Juste après le développement, l'épaisseur moyenne des puits est de l'ordre de 490μm et après recuit une perte d'épaisseur de l'ordre de 20μm est observée.

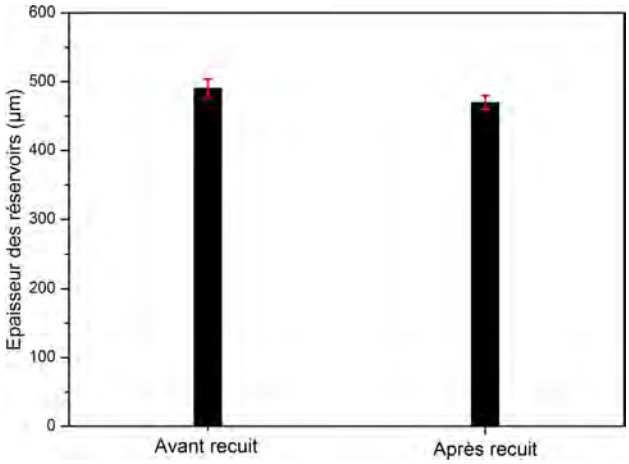

FIGURE 3.42 – Epaisseur du film DF des réservoirs des fluidiques avant recuit et après recuit

Après recuit, l'épaisseur des puces est de 422μm, ce qui permet d'obtenir des puits de 22μL de volume. En fin du procédé de fabrication, les puces sont découpées et prêtes à être capotées.

Etape de capotage de la fluidique Verre/Film DF : Plusieurs solutions ont été imaginées pour capoter les fluidiques en Verre/Film DF. Une première solution était de laminer un film DF d'épaisseur 50μm. Pour assurer une bonne adhérence de ce dernier, une étape de préparation de la surface est faite avec un traitement par plasma O_2 à 200W pendant 2 minutes. Le laminage du film DF de 50μm comme capot est fait avec une pression de 2,5 bars à une température des rouleaux de 60°C et à une vitessse trois fois plus rapide que celle utilisée pour la partie fluidique, soit 1,5 m/min. Ces paramètres de la lamineuse sont choisis dans le but d'éviter le collage du film au fond des puits et des canalisations. Par la suite, le capot est insolé avec les mêmes paramètres que l'étape 4 du tableau 3.2 pendant 40 secondes avant de dégager les entrées/sorties des réservoirs. Un recuit est fait avec rampe, identique à l'étape 4 du tableau 3.2 mais avec un plateau de 6 minutes. La révélation avec du cyclohexanne est faite pendant 3 minutes.
Avec cette solution de capotage avec du film DF 50μm, nous avons remarqué en premier lieu que 50% des réservoirs ne sont pas utilisables car le film s'est enfoncé au fond des puits comme illustré en figure 3.43. L'autre moitié des puits a pu être caractérisée. Avec un profilomètre, nous avons regardé le profil de la surface du puits et nous avons constaté que la surface du capot n'est pas uniforme et varie entre +/- 200μm, ce qui fait augmenter le volume du réservoir et rajoute une source d'erreur de mesure.

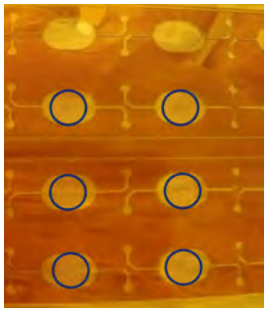

FIGURE 3.43 – Problème de collage au fond des puits du capot en DF

Une deuxième solution de capotage a donc été imaginée et testée. Elle consiste à faire un capot en DF de 100 μm d'épaisseur qui sera plus rigide que le capot de 50 μm. En effet, la caractérisation du capot des puits avec le profilomètre a montré une surface plus uniforme qu'avec le film 50μm mais présentant néanmoins des variations non négligeables avec 30% des puits défectueux (film collé au fond du réservoir). Nous avons remarqué également que le film se décollait après remplissage des puits. Cette solution de capotage avec le film DF a donc été aussi rejetée.
La troisième solution testée consiste à reporter un capot de verre selon le même principe que le capot utilisé pour les biopuces en Verre/SU8.
Le capot est collé à l'aide d'une fine couche de résine SU8 (5μm) à l'aide de la machine de wafer bonding. Les différentes étapes de ce processus de capotage sont détaillées dans la figure 3.44 et le tableau (3.3).

Etape	Schéma	Description
1	(a)	Préparation du capot de la biopuce (Verre AF32) :
	-	Perçage des entrées/sorties avec une sableuse.
	-	Découpage capot de puce individuelle (scie diamantée).
	-	Nettoyage substrat- Plasma O_2, 800W, 15min.
2	(b)	Dépôt couche 5μm de SU8 : Tournette 3000tr/min , accélération 300, 30s.
	-	Recuit : 95°C, 3min : capot prêt à être scellé à la fluidique
3	(c)	Bonding fluidique et capot, 110°C, 1200N, 5min.
4	(d)	Photolithographie : Insolation avec masque souple, $\lambda = 365nm$, 20mW.cm^-2, 8s. PEB : 95°C, 6min (côté capot).
5	(e)	Développement : bains de "développeur SU8" pendant 3min sous cloche sous-vide.
	-	Recuit côté capot (rampe) : 125°C, 2min : Biopuce Verre/SU8

TABLE 3.3 – Procédé de capotage de la fluidique Verre/DF avec du Verre

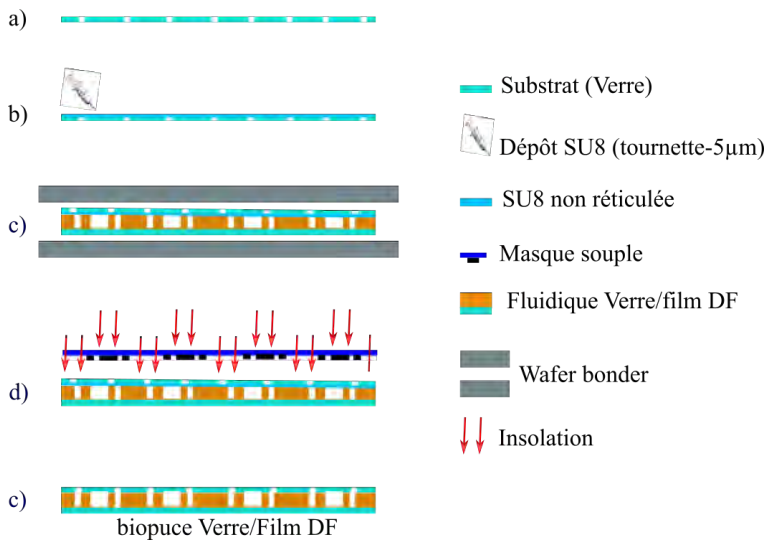

FIGURE 3.44 – Procédé de capotage en verre de la fluidique Verre/Film DF

3.6.4.2 Mise en oeuvre et caractérisation des biopuces en film DF

La partie « connectiques microfluidiques »ainsi que le remplissage des réservoirs sont des éléments importants dans le domaine de la microfluidique. Les premières expériences avec les puces en film DF ont été faites par simple remplissage des puits avec une micropipette.

FIGURE 3.45 – Puces DF avec la première génération de connectiques fluidiques intégrées dans la chaîne instrumentale

Toutefois, en cours d'expérience, nous avons remarqué une perte de signal au bout de 3 heures de mesure. A la fin de la mesure, les puits sont vides ou contiennent beaucoup de bulles d'air. Le volume de stockage des entrées/sorties de la puce n'est pas suffisant pour compenser l'évaporation et la puce s'assèche petit à petit.
Afin de régler ce problème, nous avons, dans un premier temps, rajouté une connectique PDMS à la puce. Il s'agit de plots en PDMS collés avec une colle photosensible réticulée avec un pistolet à lumière Ultra Violette et dans lesquels des tubes d'alimentation sont insérés. La colle utilisée provient de la société Permabond et est réticulée à 625 nm. La figure 3.45 illustre la biopuce en Verre/Film DF avec les connectiques intercalées dans la chaîne instrumentale.
Les premières expriences, ont montré une belle cinétique du signal sans perte d'intensité. Les réservoirs sont bien remplis en fin de mesure sans présence de bulles, ce qui confirme notre hypothèse de départ (les réservoirs sont vidés en cours de mesure).
Cependant, l'étape de collage est délicate car, en collant les plots, la colle peut entrer dans les canalisations et boucher les réservoirs. De même, en manipulant les puces, que ce soit pour le remplissage ou bien pour l'insérer et la retirer dans la chaîne de mesure, les plots se décollent facilement de la biopuce.
Nous avons alors cherché une autre solution pratique permettant un bon remplissage sans fuites. Nous avons réalisé des embouts en plastique noir que nous pouvons insérer dans le support des filtres. À la base de ces supports, une gorge a été usinée afin de positionner des joints toriques de 0,8mm de diamètre.
Ces supports sont illustrés dans la figure 3.46 où la géométrie 3D des supports et leur insertion à l'emplacement des entrées/sorties fluidiques des réservoirs sur le support métallique des filtres optiques sont illustrés.

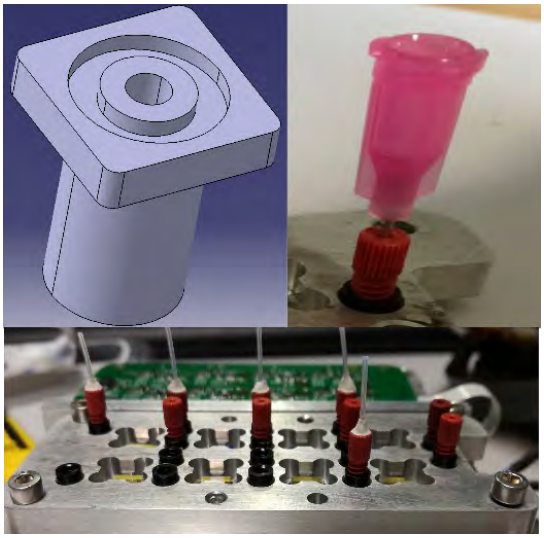

FIGURE 3.46 – Connectiques fluidiques finaux permettant une garantie de remplissage sans fuites

Une fois ces derniers ajustements opérés, la caractérisation des biopuces a pu être effectuée. L'échantillon à analyser est mis dans les réservoirs de la biopuce par remplissage avec une micro pipette. La biopuce est mise entre le module d'excitation et le module d'émission (figure 3.46). La fluorescence de la résorufine est mesurée en temps réel à travers les photodiodes et les données sont collectées par le logiciel dédié. Les conditions expérimentales sont :

— 300ms entre l'excitation et la mesure par les photodiodes.
— 100ms de temps d'integration.
— Une mesure est prise toutes les 10 minutes pendant 15 heures.
— Une gamme de glucose entre 0 et 400 mg/L : 0, 10, 40, 80, 100, 150, 200 et 400 mg/L.
— La température de la malette est de 30°C.

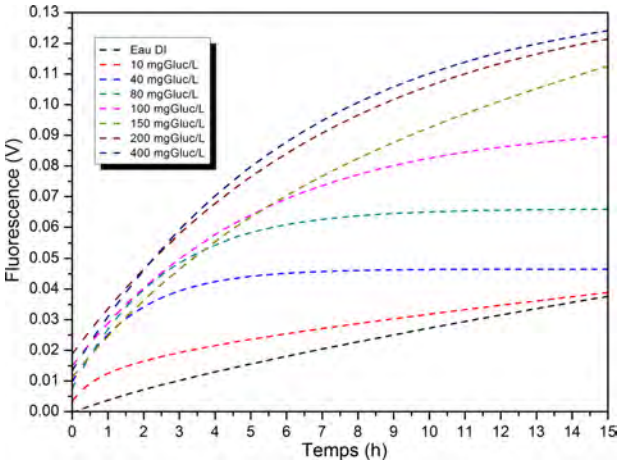

FIGURE 3.47 – Signal de fluorescence de la résorufine pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose avec des biopuces en Verre/film DF

Les courbes de la figure 3.47 montrent les cinétiques de la respiration bactérienne pour 8 concentrations différentes en matière organique et cela sur 15 heures de mesure.

Premièrement, une nette influence du taux de la matière organique sur la respiration bactérienne est remarqué. Deuxièmement, nous avons constaté que les cinétiques de respiration bactérienne sont très proches de celles observées avec le varioskan et aussi avec les biopuces en Verre/SU8 avec une très bonne reproductibilité des mesures.

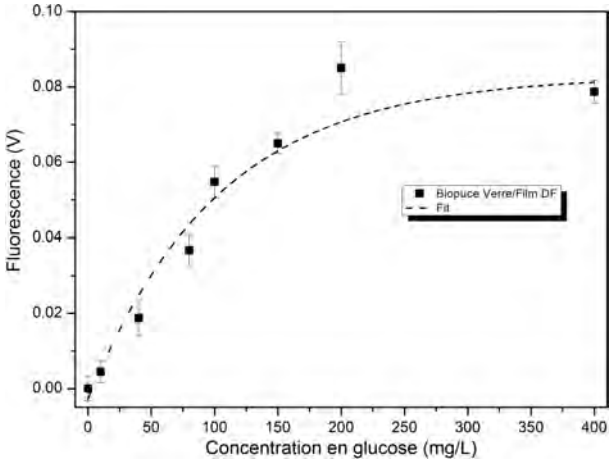

FIGURE 3.48 – Courbe d'étalonnage avec les biopuces Verre/film DF pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose

À partir des courbes de la figure 3.47, en se plaçant sur le plateau de mesure, nous avons tracé la courbe d'étalonnage du capteur.
Sur la figure 3.48, on remarque que le signal de fluorescence augmente avec le taux de matière organique. La gamme de détection est comprise entre 0 et 200 mgGluc/L.
Comme précédemment, une saturation est observée à partir de 200 mg/L de glucose. Pour les biopuces en Verre/DF, la sensibilité du capteur est de 0,43 mV/[mgGluc/L].
Le système est beaucoup plus sensible que les biopuces en Verre/PDMS, les biopuces en Verre/SU8 sont plus sensibles que les deux autres.

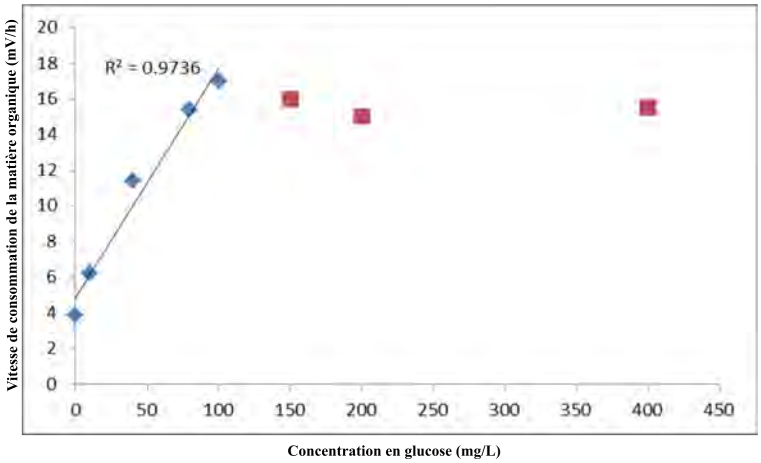

FIGURE 3.49 – Signal de fluorescence en mV par heure en fonction de la concentration en glucose avec les biopuces Verre/DF

Sur la partie linéaire des courbes de la figure 3.47, entre une heure et 4 heures de mesure, nous calculons la pente à l'origine de la consommation en carbone en fonction de la concentration de l'échantillon en matière organique.
La figure 3.49 présente les variations des pentes à l'origine en mV/h. Une très bonne corrélation (R^2=0,97) entre la consommation bactérienne en carbone et la concentration en matière organique est remarquée entre 0 et 100 mg/L de glucose.
Le rapport du signal sur bruit pour chaque concentration en matière organique est présenté dans la figure 3.50. Le rapport signal sur bruit atteint la valeur de 7,1 pour la concentration de 200mg/L de glucose. A travers ces valeurs, une limite de quantification est donnée pour la concentration en glucose de 10 mg/L. Ce bon rapport de signal sur bruit confirme la fiabilité de notre capteur.
Comparé aux biopuces en Verre/PDMS, le rapport signal sur bruit a augmenté de 30% pour la même concentration en matière organique. Ces résultats valident encore une fois la diffusion de l'oxygène au travers du PDMS. Une variation de 15% se présente aussi entre les deux matériau époxy utilisés.

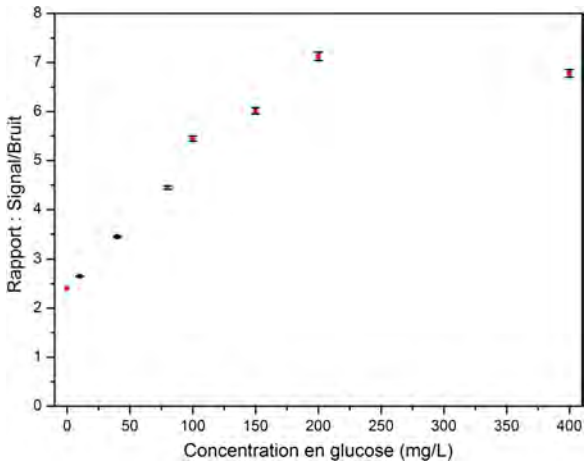

FIGURE 3.50 – Rapport signal/bruit en fonction de la concentration en glucose pour les biopuces Verre/DF

3.7 Conclusion

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à une deuxième génération de biocapteurs pour la détection du taux de matière organique dans des échantillons d'eaux usées. La solution est basée sur l'utilisation d'un indicateur rédox qui traduit la respiration bactérienne.
Notre capteur est un biocapteur à base de bactéries. Nous avons développé un protocole expérimental de culture des bactéries et de préparation de l'échantillon à analyser. Une optimisation du protocole a été faite grâce à une méthode de référence présente au laboratoire. Cette méthode nous a permis d'établir les limites d'influences de trois éléments composant l'échantillon : le fluorophore la résazurine, les bactéries suspendues dans du milieu M9 et l'échantillon en matière

organique. Cette méthode nous a permis de fixer certaines conditions : une concentration en résazurine donnée par le fournisseur (soit 10 fois concentré) et une concentration bactérienne de $2.10^8 cell/mL$.
Sur cette base nous avons développé et fabriqué un système de détection miniaturisé et portable. Un premier type de capteur en Verre/PDMS a été testé. Les résultats ont montré une bonne reproductibilité des mesures ainsi que des cinétiques comparables à la méthode de référence. Toutefois, les effets négatifs liés à la diffusion de l'oxygène ont été mis en évidence.
Une deuxième et troisième générations de biopuces ont été fabriquées en Verre/SU8 et en Verre/Film DF. Le processus de fabrication des différentes biopuces est détaillé (section 3.6.2 , section 3.6.3.1 et section 3.6.4.1). Plusieurs difficultés ont été rencontrées durant la fabrication des puces, liées au matériau de fabrication et à la technique de capotage des puces. Les solutions apportées permettent de disposer d'une technologie fiable. Les mêmes expériences ont été faites sur les trois générations dans le but de tester et valider la technologie la plus adéquate pour notre application. La figure 3.51 présente les courbes d'étalonnage des trois générations de puces pour une gamme de 0 à 400 mg/L de glucose. Pour les mêmes conditions expérimentales et la même gamme de concentrations en matière organique, les courbes sont décalées d'un type de puce à un autre. En effet, les puces en Verre/PDMS présentent le signal et la sensibilité les plus faibles. Cela explique les effets présents liés à la porosité du matériau utilisé (le PDMS).

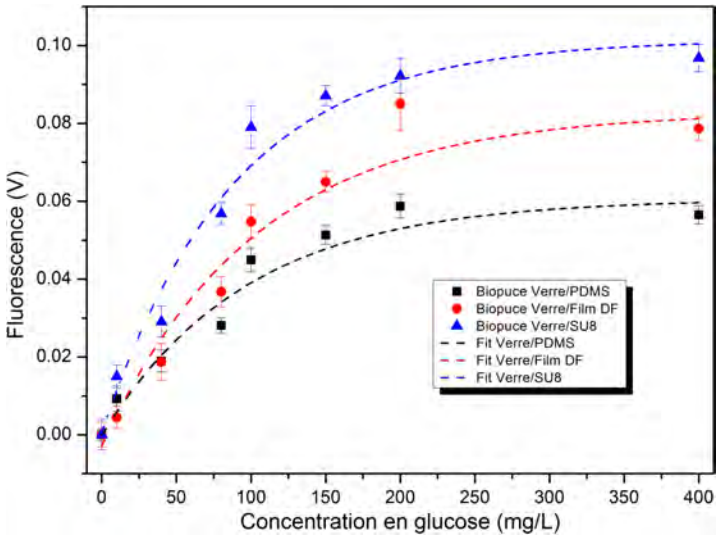

FIGURE 3.51 – Comparaison des courbes étalon des trois générations de biopuces

Les biopuces faites avec une résine époxy, les puces en film DF et en SU8, présentent à leur tour un décalage. En effet, les biopuces en SU8 sont plus sensibles que les biopuces en film DF comme présenté au tableau (3.4).

	PDMS/Verre	**Film DF/Verre**	**SU8/Verre**
Sensibilité	0,29	0,43	0,48

TABLE 3.4 – Sensibilité en mV/[mgGluc/L] pour les trois générations de biopuces

Une série de tests de caractérisation des biopuces a été faite afin d'expliquer ce décalage. Le premier test effectué a été de vérifier les paramètres optiques de chaque biopuce afin de voir si l'autofluorescence du matériau pouvait perturber la mesure. Le spectre d'autofluorescence des trois puces à travers le puits de mesure a été mesuré par spectroscopie de photoluminescence. Ce spectre est présenté par la figure 3.52. Une autofluorescence faible du PDMS à la longueur d'émission de la résorufine a été remarquée. Contrairement au PDMS, le film DF et la résine SU8 ont une autofluorescence qui n'est pas négligeable. Aussi, l'autofluorescence des deux résines à la longueur d'émission de la résorufine est quasiment la même (courbes rouge et bleue de la figure 3.52). Nous pouvons conclure que l'autofluorescence du matériau n'est pas à l'origine du décalage entre les courbes d'étalonnage des deux puces en SU8 et en film DF.

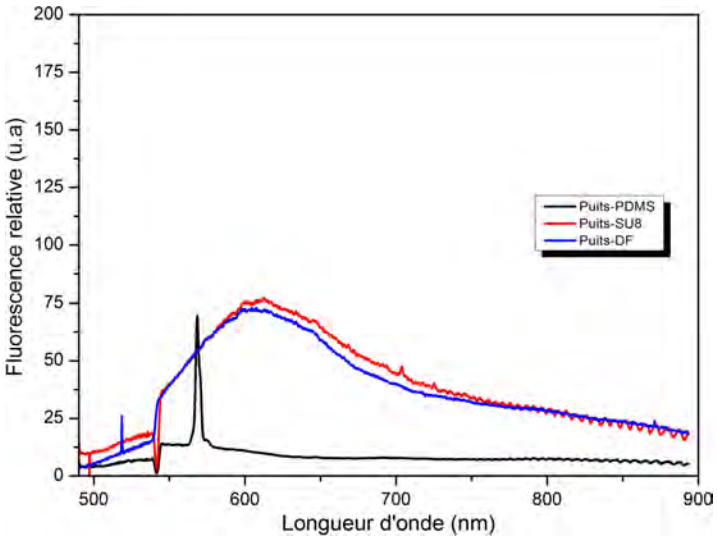

FIGURE 3.52 – Spectre d'autofluorescence des différents matériaux à travers les puits des puces PDMS/Verre, SU8/Verre et DF/Verre. L'excitation a été faite à 545nm et la détection a été enregistrée entre 500 et 900nm

Malgré le fait que nous ne sachions pas expliquer précisément les écarts entre puces SU8 et DF, nous disposons d'un capteur sensible et fiable.

Chapitre 4

Cas d'étude d'une application toxicologique

Sommaire

4.1 Introduction **84**

4.2 Application toxicologique **84**

4.2.1 Protocole expérimental 84

4.2.2 Souche *E.coli* 86

4.2.3 Souche *Pseudomonas aeroginosa* 89

4.2.4 Souche *Rhizobium radiobacter* 89

4.2.5 Conclusion 92

4.3 Vers une application sur le terrain **93**

4.3.1 Protocole expérimental 93

4.3.2 Mélangeur fluidique 97

4.4 Conclusion **101**

4.1 Introduction

Nous avons vu au premier chapitre que la qualité des eaux pouvait être suivie au travers de nombreux indicateurs.
Dans cette étude, nous mettons l'accent sur la détection de pesticides dans l'eau qui peuvent être dangereux pour la santé et l'environnement. Ce chapitre illustre l'utilisation du capteur à résazurine dans une problématique particulièrement importante : détection de molécules toxiques dans les eaux.
Nous avons choisi, pour cette étude, les herbicides qui sont très utilisés en agriculture pour empêcher la croissance des mauvaises herbes. Ceux-ci pénètrent facilement dans les sols et sont alors transportés dans les rivières. Ainsi, les pesticides représentent une menace pour les microorganismes et la santé des hommes. Un suivi de la quantité de ces produits toxiques est donc primordial.
Le pesticide utilisé dans notre étude est le Pentachlorophenol (PCP). Il est utilisé pour la préservation du bois, dans l'industrie textile et aussi en agriculture. Sa concentration maximale acceptable dans l'environnement est de 0,06 mg/L et pour la protection de la vie aquatique, il est recommandé d'avoir une concentration de 0,5 μg/L.
Le système miniaturisé que nous avons développé s'étant montré fiable, nous avons voulu l'exploiter pour une application autre que celle de la biodégradation : en l'occurence, la détection de substances toxiques. En effet, notre capteur fonctionne sur la base d'un indicateur de la respiration bactérienne : la résazurine. Les pesticides agissent directement sur les activités métabolique et respiratoire des bactéries. Ces perturbations peuvent donc être traduites par des variations de l'intensité du signal de fluorescence de la résorufine. Une étude bibliographique a été faite afin de choisir un pesticide ne réagissant pas directement avec l'indicateur choisi.
Dans ce chapitre, afin d'analyser l'effet induit sur les bactéries par le pesticide utilisé, nous avons testé les spécificités de trois différentes souches par le polluant. L'utilisation de plusieurs souches bactériennes permet l'augmentation du nombre d'analyses et ainsi d'avoir une réponse plus complète de l'effet du polluant sur les microorganismes.

4.2 Application toxicologique

4.2.1 Protocole expérimental

Notre choix s'est porté sur le Pentachlorophenol (PCP), un toxifiant qui n'interagit pas avec la résazurine [125]. Il s'agit d'un pesticide utilisé en agriculture. Il est considéré comme un polluant de l'environnement en raison de sa large toxicité et de sa persistance dans le sol et les eaux.
Le protocole expérimental du suivi du PCP se présente en trois étapes principales : une étape de culture qui s'effectue en deux temps, une étape de lavage des bactéries et la préparation de l'échantillon.

Les expériences, dans cette section, ont été effectuées avec des bactéries fraîches, cultivées sur des boîtes de pétri selon le protocole présenté en annexe B. Une colonie est récupérée de la boîte de Pétri, puis nous la mettons dans 8 ml de milieu LB dans un tube à essai. La souche bactérienne est mise en culture à 30°C sous agitation de 250 rpm durant 18 heures dans un agitateur incubateur Innova 42/42R de la société New Brunswick®.
Après l'étape de pré-culture, l'échantillon est dilué en mesurant la densité optique (100μL de bactéries et 900μL de milieu LB). Une réajustement de la DO_{620nm} à 0,05 par dilution est faite avec le milieu LB en appliquant la formule $C_i * V_i = C_f * V_f$ et une deuxième culture est relancée. La mesure de la densité optique a été faite avec le spectromètre $UVmc^2$ de la société SAFAS®. Un suivi régulier de la densité optique se fait durant cette étape de culture jusqu'à ajuster celle-ci à 0,45.
Lorsque la densité optique souhaitée est atteinte, le milieu bactérien est centrifugé dans des falcons® de 50ml à 6000g pendant 5 minutes et à 4°C (centrifugeuse Elmi® Skyline). Le culot bactérien récupéré est lavé trois fois avec une solution de $MgSO_4$ avec les mêmes paramètres de centrifugation. Le culot bactérien est enfin mélangé au milieu LB.
Une solution mère de PCP est préparée dans du $MgSO_4$ à une concentration de 10g/L. A partir de cette concentration mère, trois concentrations différentes ont été préparées : 20mg/L, 50mg/L et 200mg/L.
Les suspensions bactériennes en milieu LB sont mélangées aux solutions de PCP. Quatre échantillons sont préparés : le premier est un témoin négatif avec du $MgSO_4$ seulement et les trois autres correspondent aux 3 concentrations différentes en PCP. Les échantillons sont par la suite incubés pendant 40 minutes à 30°C : cette phase est appelée phase d'exposition au PCP.
Après la phase d'exposition, la résazurine est rajoutée et la mesure est effectuée en parallèle avec le microsystème et un appareil de mesure de fluorescence de la société Tristar.
L'échantillon analysé est composé de 9,09% de résazurine, 9,09% de suspension bactérienne et de 81,81% de solution de PCP. La concentration bactérienne finale de l'échantillon correspond à une densité optique de 0,1 à 620nm.
La biopuce comporte huit puits, deux puits sont utilisés pour une même concentration. Le même échantillon est mis aussi dans deux puits de la microplaque du système de lecture Tristar. La contenance des puits des biopuces et de la microplaque est de 24μL et 200μL, respectivement.
La mesure est lancée sur une heure avec une mesure toute les cinq minutes. Le temps d'intégration pour les deux systèmes est de 100ms. Les longueurs d'ondes d'excitation et de détection sont respectivement 560nm et 590nm pour les deux systèmes également.
Des tests ont été faits en suivant ce protocole sur trois souches bactériennes différentes : *E.coli*, *R.radiobacter* et *P.aeroginase*. Il s'agit de souches à activité métabolique hétérotrophe isolées de boues activées. Dans les sections suivantes, nous détaillerons les résultats trouvés avec les différentes souches bactériennes.

4.2.2 Souche *E.coli*

La première souche testée est la souche de l'*E.coli* K12MG1655. Le protocole expérimental détaillé à la section (4.3.1) est suivi. Les courbes de la figure 4.1 illustrent les cinétiques du signal de fluorescence de la résorufine en fonction de la concentration en PCP pour le minisystème et le microsystème.
Nous remarquons à travers ces courbes une nette influence de la concentration en PCP sur la respiration bactérienne. En effet, pour une grande concentration en PCP (200mg/L), la respiration bactérienne est très faible. Cette dernière augmente lorsque la concentration en PCP diminue. La courbe noire correspond au témoin négatif, notre contrôle de la respiration bactérienne.

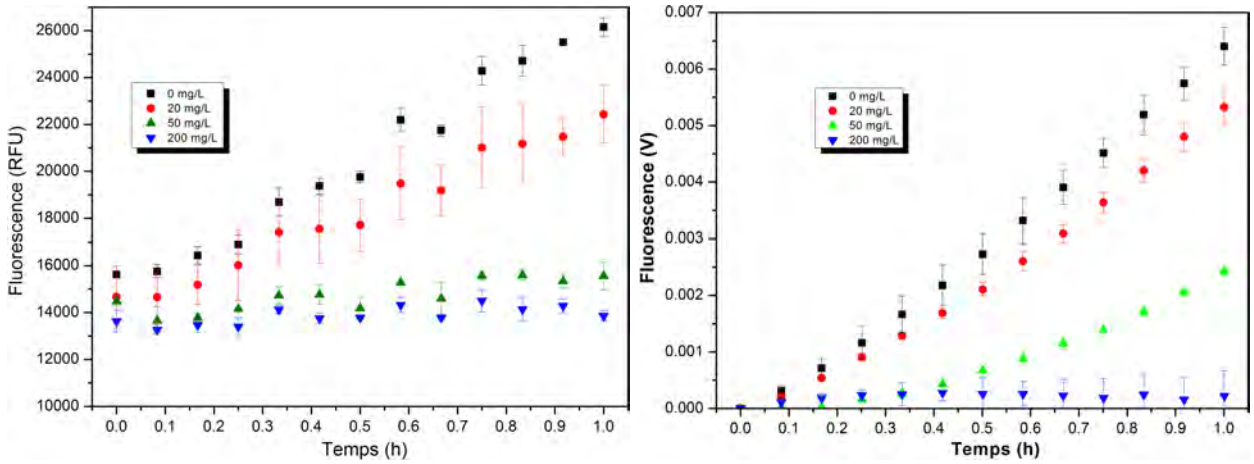

FIGURE 4.1 – Les cinétiques de la respiration d'*E.coli* en fonction de la concentration en PCP : à gauche pour le minisystème et à droite pour le microsystème

A partir de ces courbes, nous avons calculé la pente à l'origine pour les deux systèmes et pour chaque concentration en pesticides. Le tableau 4.1 présente les valeurs de ces pentes.

	Témoin (0 mg/L)	**20mg/L**	**50mg/L**	**200mg/L**
Microsystème	0,0068	0,0057	0,0028	8,17E-5
Minisystème	12336	8632	2052	730

TABLE 4.1 – Respiration de l'*E.coli* en mg/L/h pour le microsystème et RFU/h pour le minisystème pour chaque concentration en PCP (de 0 à 200 mg/L)

La pente maximale de la respiration bactérienne est celle du témoin avec du $MgSO_4$ sans addition du PCP. En fonction de la concentration en PCP, les pentes à l'origine diminuent.
Pour évaluer l'effet du PCP sur la respiration de l'*E.coli*. Nous avons calculé le taux d'inhibition à l'aide de l'équation suivante :

$$Tauxd'inhibition(\%) = 1 - (\frac{pente_{Ci}}{pente_{control}}) \tag{4.1}$$

Où $pente_{control}$ présente la pente du témoin négatif et $pente_{Ci}$ est la pente pour les différentes concentrations en PCP (20, 50 et 200 mg/L).
Les valeurs du taux d'inhibition, calculées à partir l'équation 4.1, sont reportées dans la figure 4.2 et dans le tableau 4.2.

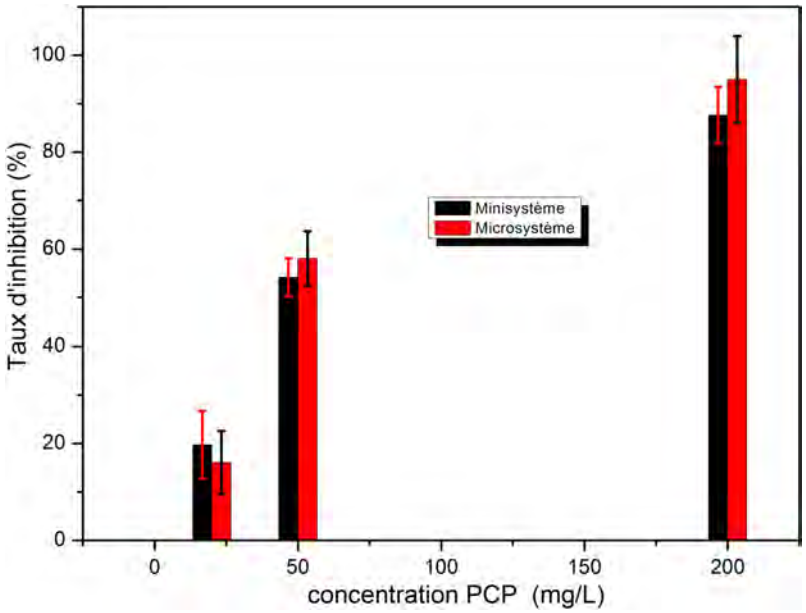

FIGURE 4.2 – Taux d'inhibition du PCP pour l'*E.coli* en fonction de la concentration en PCP pour les mini et microsystèmes

	Témoin (0 mg/L)	**20mg/L**	**50mg/L**	**200mg/L**
Microsystème	0	16	58	95
Minisystème	0	19	54	87

TABLE 4.2 – Taux d'inhibition (%) du PCP sur la respiration bactérienne de l'*E.coli* mesuré par les micro et mini systèmes

Le taux d'inhibition pour la concentration de 200mg/L de PCP justifie l'absence de la respiration bactérienne. Nous remarquons aussi une bonne corrélation entre le mini et le microsystème. En effet, pour chaque concentration en pesticides, la variation entre le deux systèmes est minime. La courbe de corrélation du taux d'inhibition du PCP sur la respiration de l'*E.coli* est présentée par la figure 4.3.
Nous notons une relation quasi-linéaire entre les deux systèmes avec une pente de 0,90 et donc une très bonne corrélation entre les deux systèmes. Les bactéries ne sont pas affectées par le système de mesure. En effet, les deux systèmes fournissent la même information sur la respiration de l'*E.coli* induite par le PCP.

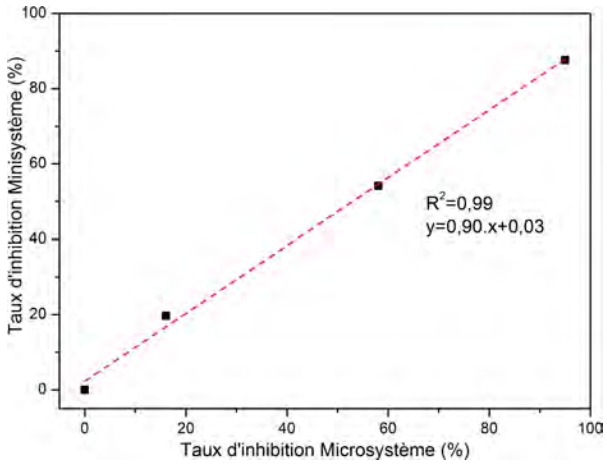

FIGURE 4.3 – Courbe de corrélation entre mini et micro systèmes

La figure 4.4 présente la courbe d'étalonnage du signal de fluorescence du microsystème en fonction de celui du minisystème, tracée pour différents réplicats avec différentes concentrations en PCP et pour plusieurs expériences. Un coefficient de corrélation de 0,88 démontre la répétabilité des mesures (d'un puits à un autre) et aussi la reproductibilité des mesures (d'une expérience à une autre).

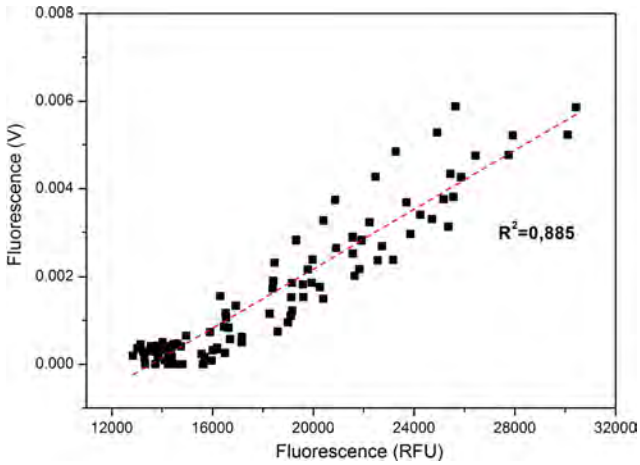

FIGURE 4.4 – Courbe d'étalonnage entre les deux systèmes de mesure utilisés

Le graphe de la figure 4.4 peut être traité par zone : une première zone entre 12000 et 16000 RFU et une deuxième à partir de 16000 RFU. Dans la première zone, le microsystème est moins sensible sur la détection de valeurs basses de concentration en PCP. Au contraire, sur la deuxième zone, la corrélation linéaire est meilleure.
Ces résultats nous ont permis de valider l'approche microsystème sur des tests de toxicologie sur l'*E.coli* avec des mesures sur une heure seulement.

4.2.3 Souche *Pseudomonas aeroginosa*

La souche bactérienne *Pseudomonas aeroginosa* appelée aussi bacille pyocyanique est une bactérie du genre pseudomonas très résistante.
La culture sur boîte de pétri suit le protocole exposé en annexe B. Afin de tester l'effet du PCP sur cette souche bactérienne, nous avons reproduit le protocole expérimental détaillé en section 4.3.1.
La mesure est faite sur une durée d'une heure avec une lecture toutes les cinq minutes. Les cinétiques des courbes pour les deux systèmes sont présentées dans la figure 4.6.

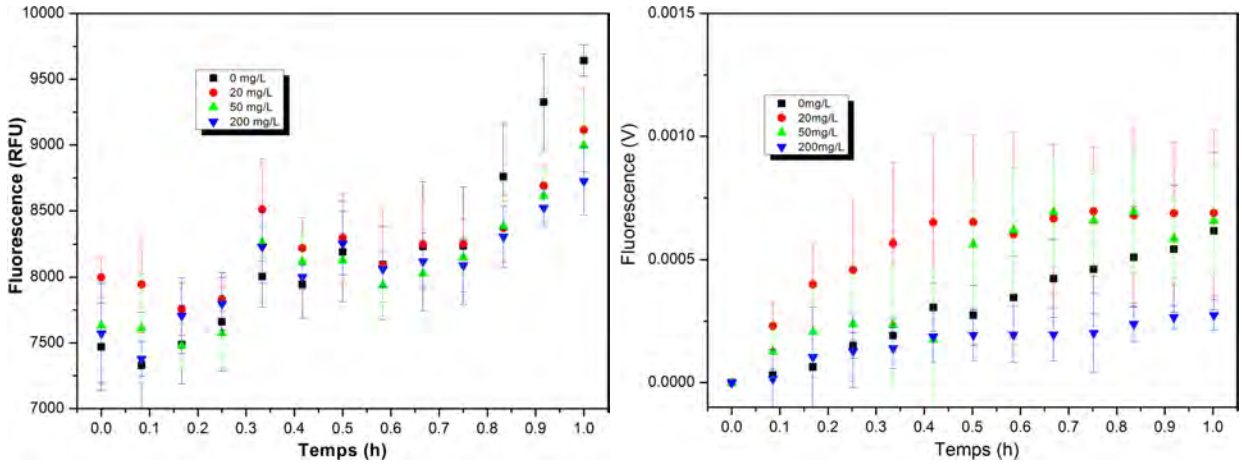

FIGURE 4.5 – Cinétique de la respiration de *R.Radiobacter* en fonction de la concentration en PCP : à gauche minisystème et à droite microsystème

On remarque que le signal est faible et l'influence de la concentration en PCP sur la respiration bactérienne est peu visible pour les deux systèmes. Ces résultats ont été obtenus pour une densité optique de 0,1 à 620nm.
La même expérience a été refaite avec une concentration bactérienne cinq fois plus grande. Les résultats sont restés inchangés.
Cette absence de l'influence du pesticide sur le signal de fluorescence est due à la lenteur du métabolisme de cette souche bactérienne. En effet, la *P.aeroginosa* est une bactérie résistante avec un métabolisme complexe et lent. La rapidité du métabolisme bactérien joue un grand rôle dans la rapidité de la mesure. Cette souche tend à former un film à la surface du récipient qui la contient [126, 127]. Ce film limite son contact avec le milieu.

4.2.4 Souche *Rhizobium radiobacter*

La souche bactérienne *Rhizobium Radiobacter* est une bactérie à gram négatif ayant une activité hétérotrophe. Nous effectuons l'isolement de cette dernière sur boîte de pétri et avons préparé l'échantillon comme décrit précédemment.
Les résultats de la mesure pour cette souche sont illustrés sur la figure 4.6. Sur une heure de mesure, une nette influence de la concentration en PCP est remarquée. Les cinétiques sont

rapides comme indiqué par le contrôle qui présente le signal le plus intense. Nous remarquons toutefois que pour les valeurs de 50 et 200 mg/L le signal pour les deux systèmes est faible.

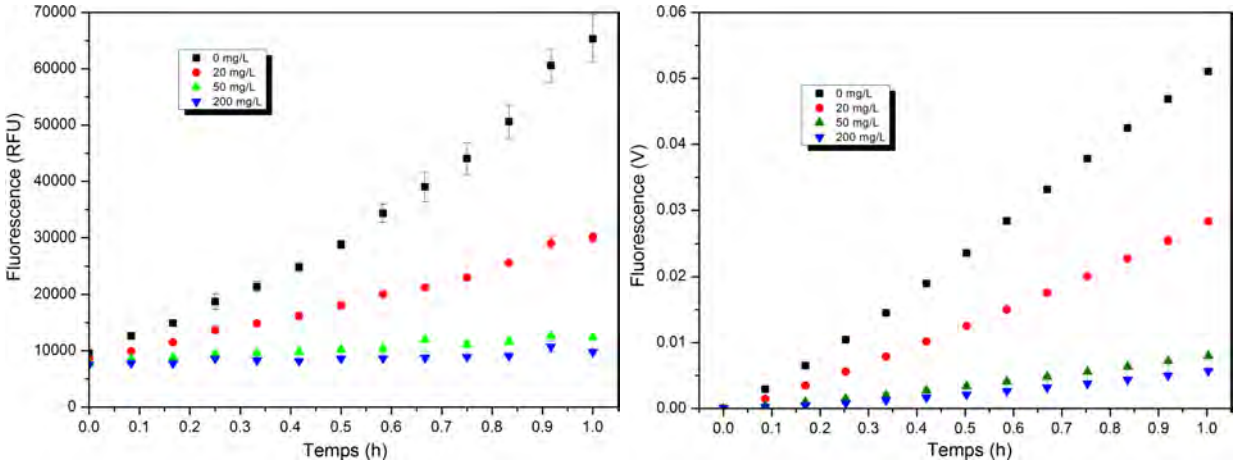

FIGURE 4.6 – Cinétique de la respiration de *R.Radiobacter* en fonction de la concentration en PCP : à gauche minisystème et à droite microsystème

Le traitement de ces données est fait de la même manière que pour la souche d'*E.coli*. Un premier calcul de la respiration bactérienne (pente à l'origine) est effectué.

	Témoin (0 mg/L)	**20mg/L**	**50mg/L**	**200mg/L**
Microsystème	0,053	0,029	0,0084	0,0061
Minisystème	61765	23216	6315	2304

TABLE 4.3 – Respiration de l'*R.radiobacter* en mg/L/h pour le microsystème et RFU/V pour le minisystème pour chaque concentration en PCP (de 0 à 200 mg/L)

La pente maximale de la respiration bactérienne correspond respectivement à 0,053 V/h et 61765 RFU/h pour les micro et mini systèmes. A partir des valeurs du tableau 4.3, nous avons calculé le taux d'inhibition du PCP pour la souche *R.radiobacter*.
La figure 4.7 illustre le taux d'inhibition pour les deux systèmes.

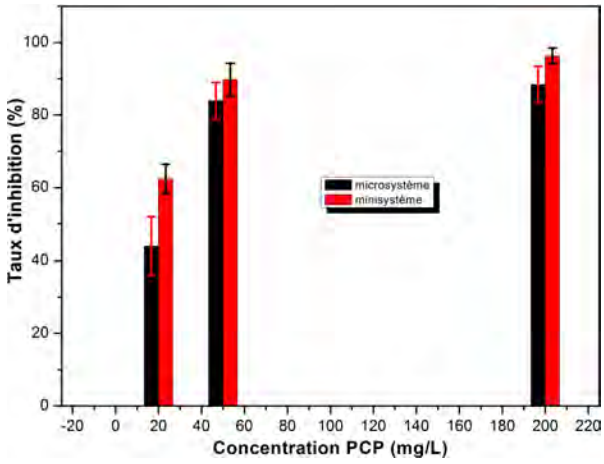

FIGURE 4.7 – Taux d'inhibition du PCP pour *R.Radiobacter* en fonction de la concentration en PCP pour les mini et microsystèmes

Les valeurs du taux d'inhibition sont présentées dans le tableau 4.4

	Témoin (0 mg/L)	**20mg/L**	**50mg/L**	**200mg/L**
Microsystème	0	44	84	89
Minisystème	0	62	89	96

TABLE 4.4 – Taux d'inhibition (%) du PCP sur la respiration bactérienne de la souche *R.radiobacter* pour les micro et mini systèmes

Nous remarquons un taux d'inhibition important à partir de 20mg/L de PCP de l'ordre de 44% pour le microsystème et de 62% pour le minisystème mais aussi une grande inhibition dépassant les 80% pour la concentration de PCP de 50mg/L.
La figure 4.8 présente la corrélation entre les taux d'inhibition du PCP pour les deux systèmes. Un coefficient de corrélation de 0,97 valide la bonne corrélation entre les deux systèmes utilisés et donc la qualité des mesures effectuées à l'aide du microsystème.

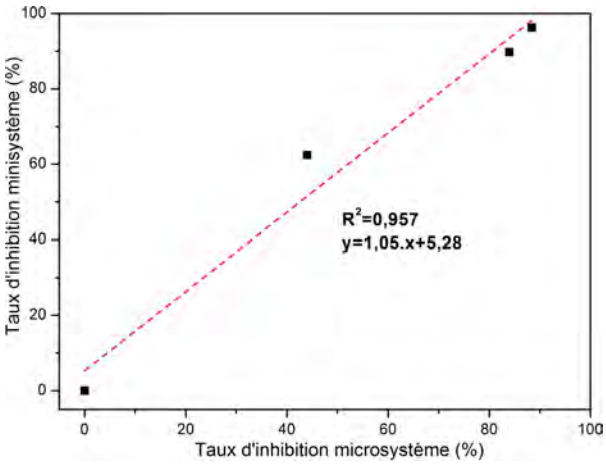

FIGURE 4.8 – Courbe de corrélation entre mini et micro système pour *R. radiobacter*

Une rapidité de la cinétique pour cette souche bactérienne est nettement remarquée.

4.2.5 Conclusion

Afin de comparer les résultats obtenus avec les différentes souches bactériennes, nous avons tracé sur le même graphe les différents taux d'inhibition ainsi que la corrélation entre les deux systèmes pour ces taux (figure 4.9).

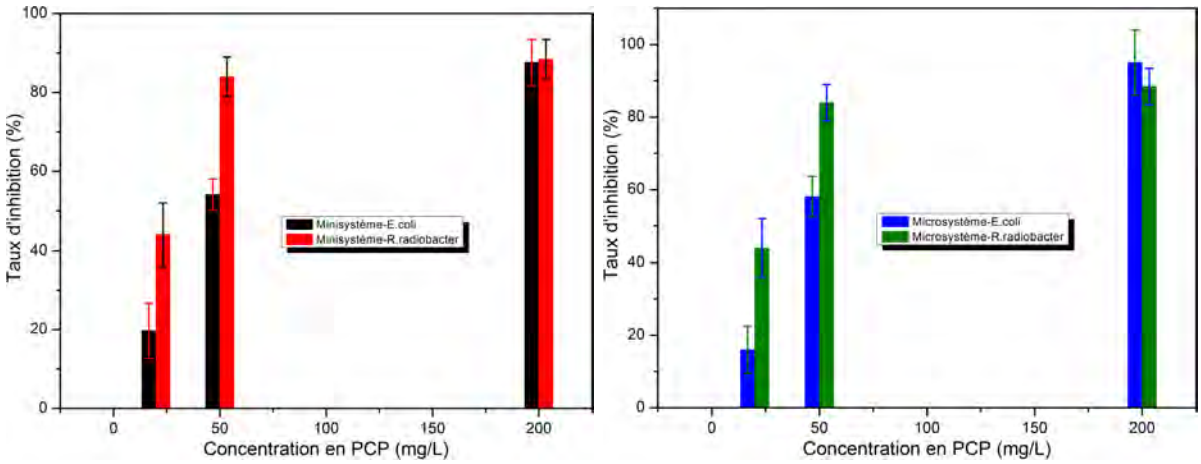

FIGURE 4.9 – Taux d'inhibition (%) pour les souches bactérienne *E.coli* et *R.radiobacter* : à droite pour le microsystème et à gauche pour le minisystème

Nous remarquons que le taux d'inhibition est important sur la souche *R.radiobacter* comparé à la souche *E.coli*. En effet, pour la concentration en PCP de 20mg/L, le taux d'inhibition est de l'ordre de 50% pour l'*E.coli* et de 80% pour la *R.radiobacter*, tandis que pour la concentration de 50mg/L, ces taux sont de l'ordre de 15% et de 50% respectivement pour l'*E.coli* et la *R.radiobacter*.

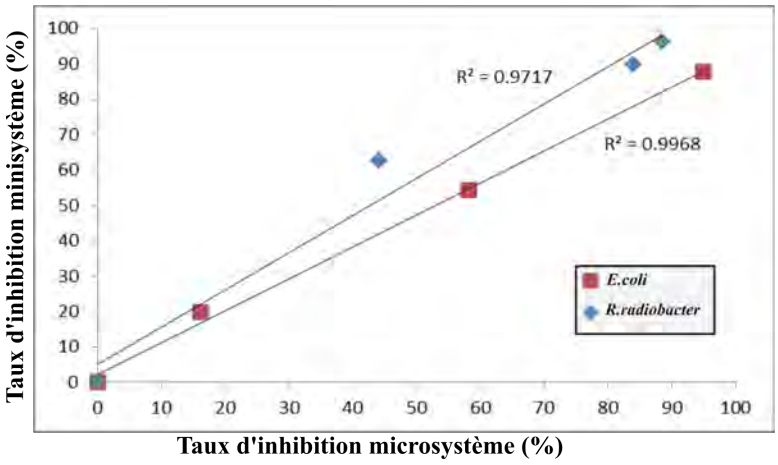

FIGURE 4.10 – Courbe de corrélation entre mini et micro systèmes pour les souches R. radiobacter et E.coli

La souche *R.radiobacter* présente des cinétiques de respiration bactérienne plus rapides que la souche bactérienne *E.coli*. La souche *R.radiobacter* est plus sensible au PCP que l'*E.coli*.
La figure 4.10 valide en premier temps la robustesse et la corrélation des deux systèmes et en deuxième temps la différence de l'influence du PCP d'une souche à une autre. En effet, nous remarquons que la souche bactérienne *R.radiobacter* est fortement impactée par le pesticide comparé à la souche bactérienne *E.coli*.
Les résultats avec la souche bactérienne *P.aeroginosa* ont montré une absence totale de signal et une insensibilité totale à la présence du pesticide.
Ces tests nous ont permis d'avoir une empreinte de toxicité du PCP pour trois souches bactériennes isolées de boues activées : le phénomène de détection croisée (un pesticide détecté par plusieurs souches). Nous avons validé aussi la robustesse et la corrélation du microsystème avec une technique de référence et cela pour des mesures courtes d'une heure de durée.

4.3 Vers une application sur le terrain

Compte-tenu de la qualité des résultats obtenus, nous sommes en mesure de penser que l'approche microsystème est bien adaptée à une mesure de terrain. La problématique posée par celle-ci reste toutefois la préparation de l'innoculum bactérien. En effet, le protocole expérimental de préparation d'échantillon avec des bactéries fraîches est long et se fait en laboratoire avec beaucoup de matériel. La durée moyenne de préparation de l'échantillon, de la pré-culture des bactéries fraîches au mélange de l'échantillon, est de 20 heures.
Le recours à des bactéries lyophilisées pourrait être une alternative intéressante afin d'alléger la partie préparation de l'échantillon dans le cas de mesures sur site.
Afin d'évaluer l'adéquation de notre microsystème à des mesures sur site, nous avons donc testé le capteur avec des bactéries lyophilisées.

4.3.1 Protocole expérimental

Des bactéries *E.coli* lyophilisées ont été utilisées. Ces bactéries sont stockées dans des petites bouteilles en verre au réfrigerateur à -20°C comme illustré sur la figure 4.11.
Une étape de réhydratation des bactéries est nécessaire. À cet effet, nous rajoutons 100μL d'eau distillée dans les bouteilles contenant les bactéries. Une étape d'incubation à 30°C pendant 30 minutes suit l'étape de réhydratation.

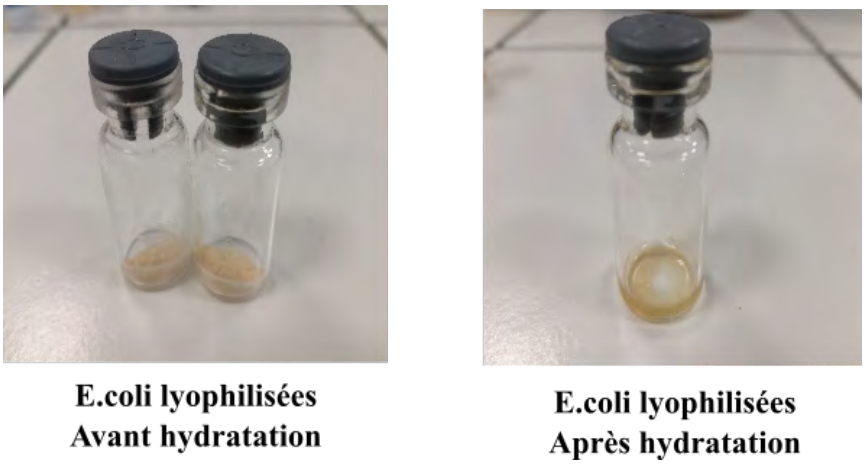

FIGURE 4.11 – Bactéries *E.coli* lyophilisées stockées dans des récipients en verre à -20°C

Après incubation, les bactéries sont prêtes à être mélangées à l'échantillon. A partir de ce stade, nous reprenons le protocole expérimental de la section 4.3.1.
Le suivi du signal de fluorescence de la résorufine est réalisé dans les mêmes conditions que pour les expériences faites avec les bactéries fraîches.
Les cinétiques de réaction sont présentées en figure 4.12 pour les deux systèmes. Le signal de fluorescence le plus fort correspond au témoin sans pesticide et cela pour les deux systèmes. Une nette influence de l'effet du PCP sur la respiration bactérienne est observée. En effet, plus la concentration en PCP est grande plus la respiration bactérienne est freinée. Les courbes bleues de la figure 4.12 montrent une quasi absence de la respiration des bactéries, lorsque la concentration en PCP est de 200mg/L.

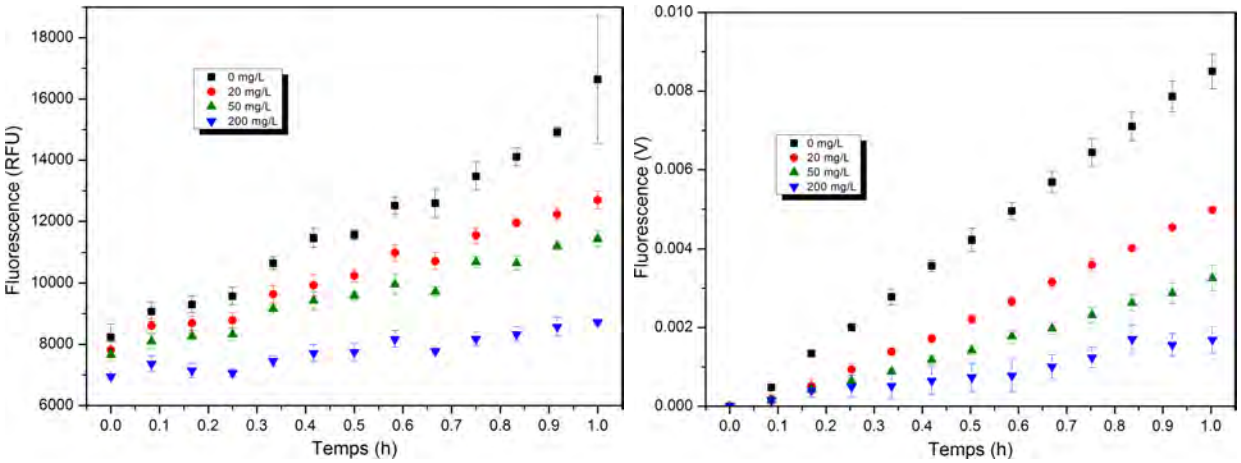

FIGURE 4.12 – Cinétique de la respiration d'*E.coli* lyophilisés en fonction de la concentration en PCP : à gauche minisystème et à droite microsystème

Le traitement des données des cinétiques de la fluorescence présentées précédemment ont été faites de la même manière qu'avec les bactéries *E.coli* fraîches. En premier lieu, la pente à l'origine est calculée pour chaque concentration en PCP pour les deux systèmes de mesure. Les valeurs de ces dernières sont illustrées dans le tableau 4.5.

	Témoin (0 mg/L)	20mg/L	50mg/L	200mg/L
Microsystème	0,0085	0,0052	0,0034	0,0018
Minisystème	7236	4593	3578	1622

TABLE 4.5 – Respiration de l'E.coli lyophilisés en mg/L/h pour le microsystème et en RFU/h pour le minisystème pour chaque concentration en PCP (de 0 à 200 mg/L)

A partir de ces valeurs, le taux d'inhibition du PCP est calculé et présenté par les histogrammes dans la figure 4.13.

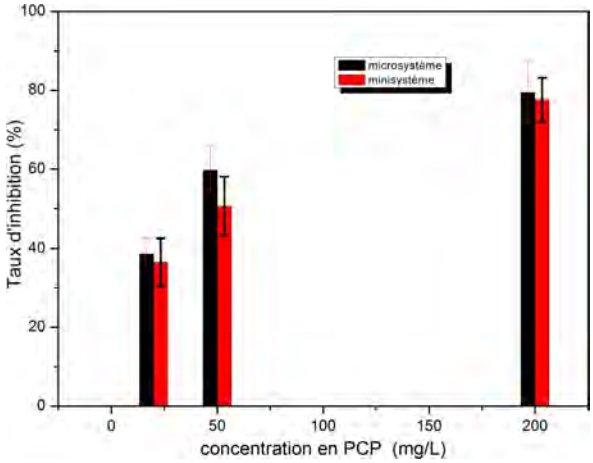

FIGURE 4.13 – Taux d'inhibition du PCP pour l'E.coli lyophilisés en fonction de la concentration en PCP pour les mini et microsystèmes

La figure 4.13 et le tableau 4.6 présentent les différents taux d'inhibition. Les valeurs obtenues pour les deux systèmes sont très rapprochées pour les deux concentrations en PCP de 20 et de 200 mg/L. L'écart entre les deux capteurs est plus important pour la concentration en 50mg/L de PCP. Tout en tenant compte des barres d'erreurs, il est possible de conclure que les taux d'inhibition sont très proches.

	Témoin (0 mg/L)	20mg/L	50mg/L	200mg/L
Microsystème	0	39	60	79
Minisystème	0	37	51	78

TABLE 4.6 – Taux d'inhibition (%) du PCP sur la respiration bactérienne de l'E.coli lyophilisés pour les micro et mini systèmes

Le coefficient de corrélation entre les mini et micro systèmes est de l'ordre de 0,98 (figure 4.14), ce qui est excellent. Avec des bactéries lyophilisées, nous avons pu faire des tests de toxicologie avec du PCP sur une durée de mesure d'une heure. Cette série d'expériences valide l'utilisation de bactéries lyophilisées et encore une fois la robustesse de notre système.

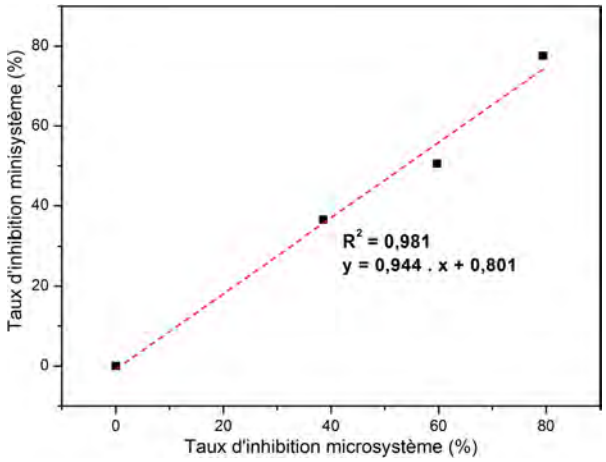

FIGURE 4.14 – Courbe de corrélation entre mini et micro systèmes pour E.coli lyophilisés

La lyophilisation des bactéries a été testée dans le but de simplifier le protocole expérimental et de gagner du temps. Afin de valider l'utilisation des bactéries lyophilisées, nous avons comparé les résultats des taux d'inhibition sur les bactéries fraîches et les bactéries lyophilisées (*E.coli*).

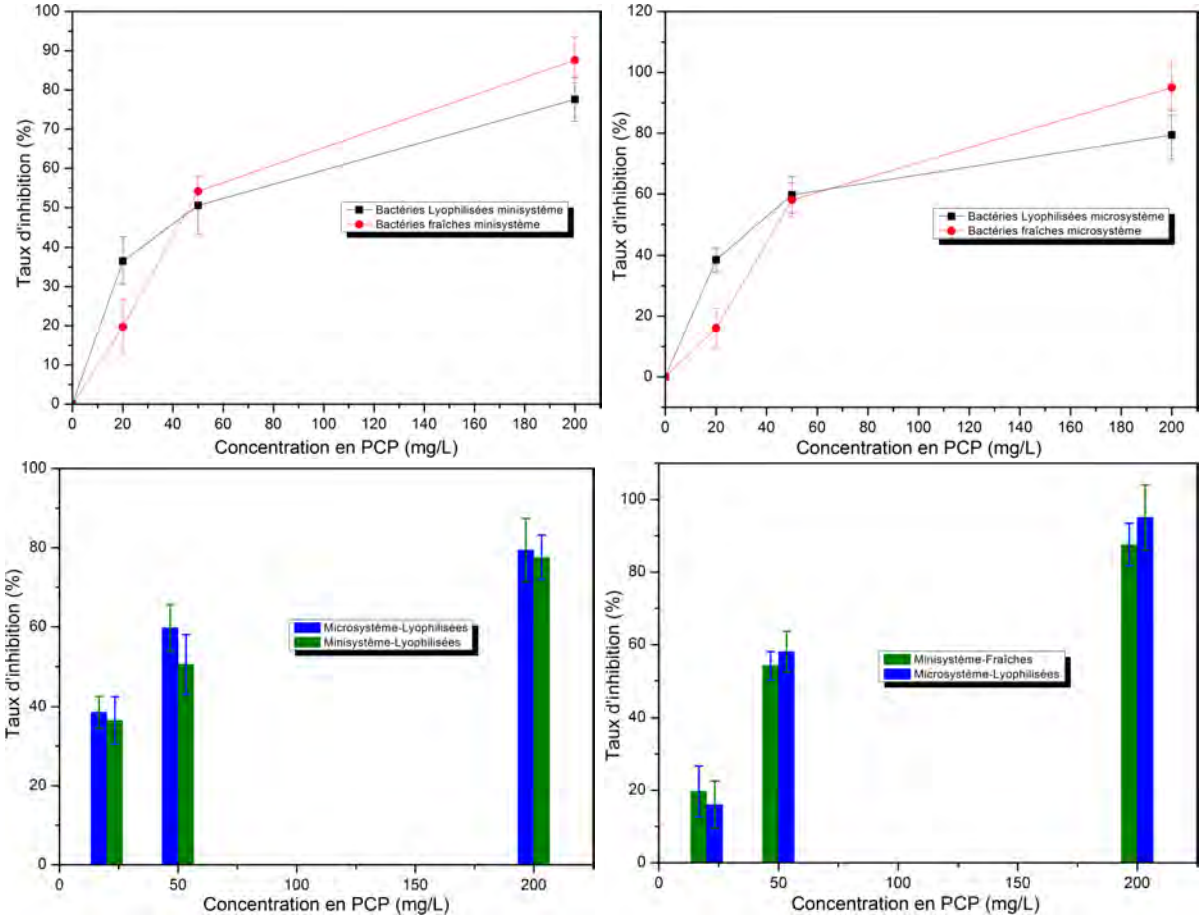

FIGURE 4.15 – Taux d'inhibition du PCP : en haut souches lyophilisées et fraîches à droite pour le minisystème et à gauche pour le microsystème, en bas mini et microsystème à droite pour souches fraîches et à gauche pour souches lyophilisées

La figure 4.15 illustre les taux d'inhibition pour les deux types de bactéries utilisées et pour les deux systèmes. L'évolution des taux d'inhibition est la même pour les deux systèmes.
Les taux d'inhibition observés pour les bactéries fraîches et les bactéries lyophilisées sont sensiblement similaires pour la concentration de 50mg/L en PCP. Une diminution du taux d'inhibition est remarquée pour la concentration 200mg/L et l'inverse pour la concentration de 50mg/L de PCP.
Globalement, les bactéries lyophilisées sont plus sensible au PCP que les bactéries fraîches. Cette sensibilité est liée au stress que les bactéries lyophilisées subissent durant le protocole de lyophilisation. En effet, elle sont soumises à des contraintes mécaniques qui peuvent endommager les membranes cellulaires.
Cette première phase de l'étude a permis de comprendre plusieurs points. Tout d'abord, l'utilisation de bactéries lyophilisées a apporté de nombreux avantages. En effet, un gain de temps important est assuré à travers cette étape. La lyophilisation apporte également un bénéfice quant à la sensibilité des souches bactériennes vis à vis du PCP. Finalement, cette étape de lyophilisation nous a permis de valider la portabilité de notre système : en passant de 20 heures de protocole à 30 minutes.

4.3.2 Mélangeur fluidique

Un des objectifs de nos travaux est d'assurer des mesures sur site en ayant un système de mesure portable. La première étape permettant la facilité de la mesure sur site est l'utilisation de bactéries lyophilisées.
Une réflexion sur les contraintes expérimentales pour des mesures sur site a été faite. Nous avons remarqué que la dernière étape du protocole expérimental, la préparation de l'échantillon, nécessite une optimisation afin de faciliter les mesures par une personne non qualifiée.

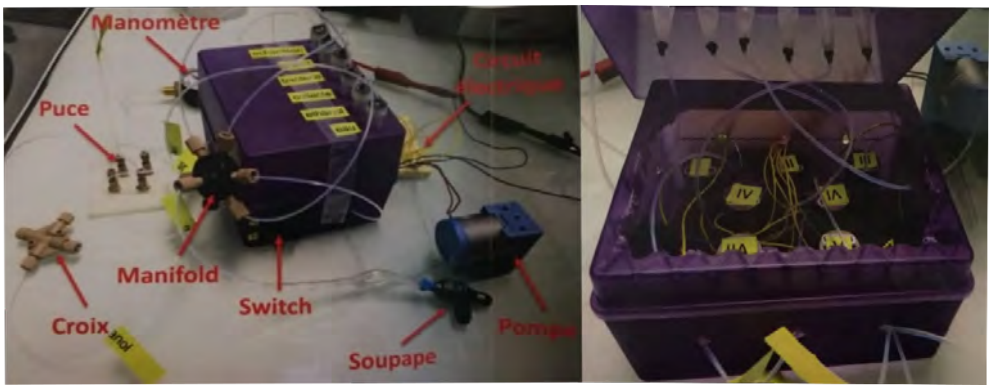

FIGURE 4.16 – A gauche le circuit complet et à droite le boitier du mélangeur ouvert

Un système fluidique permettant le mélange et le remplissage des puces, avec les proportions données par le protocole expérimental, a été développé par l'équipe de Gérald Thouand au GEPEA de la Roche -Sur-Yon.
Le système fluidique est simple : il est composé de trois réservoirs pour les trois éléments de

l'échantillon, une puce de mélange, des électrovannes, des switchs pour l'activation des électrovannes et une pompe à air.
Les électrovannes utilisées sont à 3 voies universelles. Lorsque la pompe à air est en marche, nous activons les switch des trois électrovannes en même temps permettant ainsi le transport des fluides jusqu'à la puce de mélange.
Les figures 4.16 et 4.17 regroupent des photos de ce dernier ainsi qu'un schéma fonctionnel simplifié.

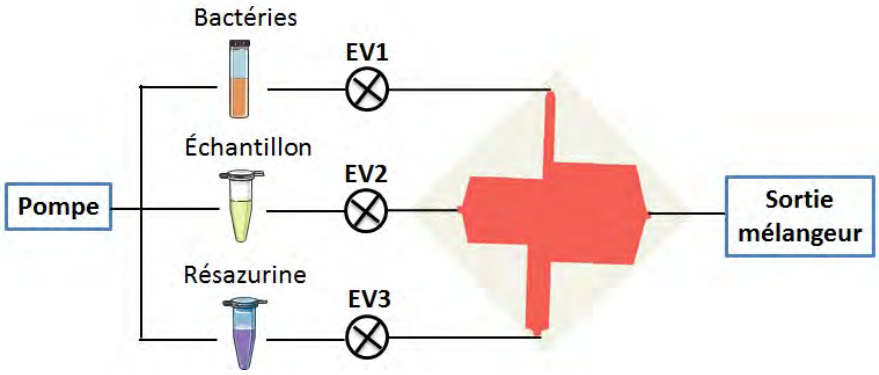

FIGURE 4.17 – Schéma simplifié du mélangeur

La puce de mélange utilisée est de technologie Verre/Verre et présente le design de la figure 4.18. Cette puce comporte 3 entrées fluidiques : la première pour la résazurine (entrée 1), la deuxième pour les bactéries (entrée 2) et la troisième pour l'échantillon à analyser (entrée 3). A la sortie de la puce, nous récupérons le mélange des trois éléments en entrée.

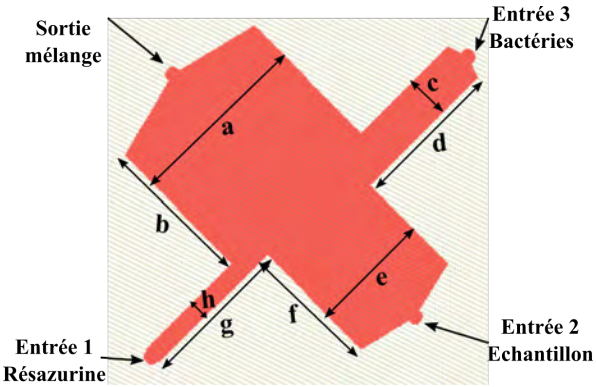

FIGURE 4.18 – Schéma de la puce microfluidique de mélange

Les dimensions des différentes canalisations de la puce de mélange sont présentées dans le tableau 4.7. La hauteur des canalisations est de 50μm.

	a	b	c	d	e	f	g	h
Longueur canaux	1,2 cm	1 cm	2,8 mm	1 cm	0,8 cm	0,88 cm	1 cm	1,2 mm

TABLE 4.7 – Longueurs des différents canaux de la puce microfluidique

Afin de tester les performances de ce mélangeur, nous avons appliqué le protocole expérimental avec des bactéries *E.coli* lyophilisées détaillé à la section 4.3.1. A la dernière étape du protocole, le mélange, nous avons rempli les réservoirs du mélangeur fluidique par la résazurine, les bactéries et l'échantillon. Nous avons utilisé deux solutions à la place de l'échantillon : une première sans aucun pesticide et une deuxième à 200mg/L de PCP.
Nous avons activé la pompe à air puis activé les trois swichs (qui manipulent les électrovannes). Les différents fluides circulent dans les tuyaux fluidiques jusqu'à atteindre la puce de mélange.

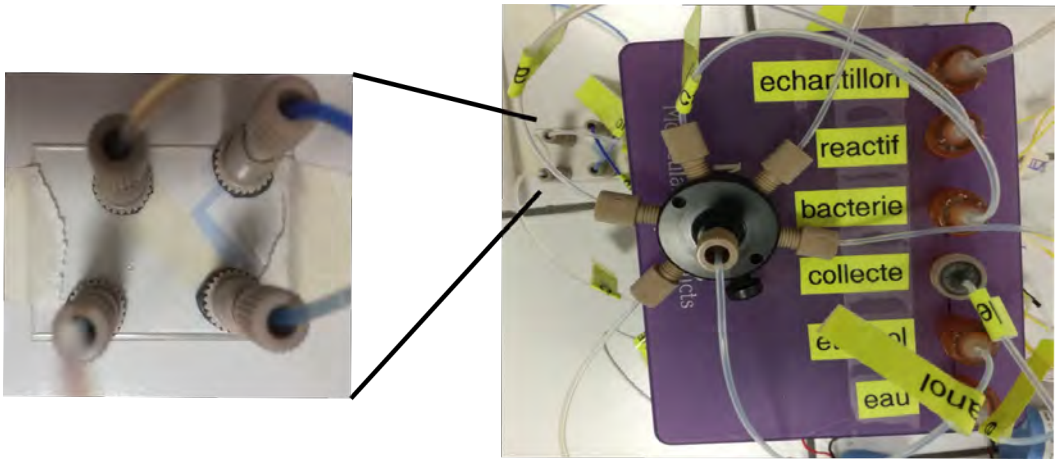

FIGURE 4.19 – Á gauche le boitier du mélangeur fluidique développé et à droite la puce de mélange

Les figures 4.19 et 4.20 montrent les différents éléments de l'échantillon dans la puce de mélange. Le mélange récupéré à la sortie de la puce a servi pour remplir les puits de la microplaque du minisytème (skalar) et de la biopuce du microsystème (à résazurine).

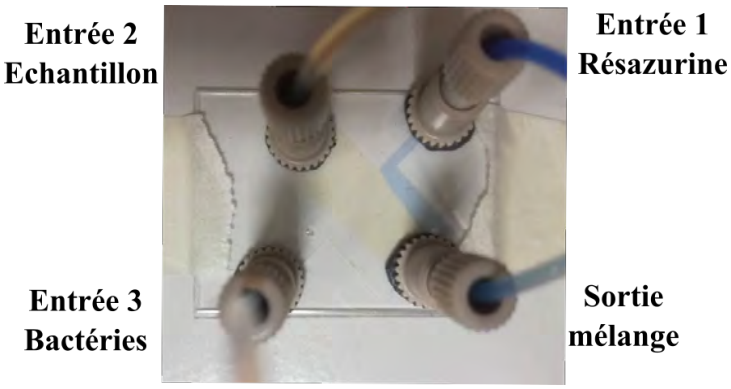

FIGURE 4.20 – Puce microfluidique de mélange

La fluorescence de la résorufine est mesurée en temps réel avec le minisystème et le microsystème. Les conditions expérimentales sont :

— Une mesure est prise toutes les 5 minutes pendant une heure.
— Deux concentrations de PCP : 0mg/L et 200mg/L.

— La température de la malette est de 30°C.

Les résultats des expériences sont présentés dans la figure 4.12. Nous remarquons que les cinétiques de la respiration bactérienne sont très rapprochées entre un mélangeur fluidique et un mélange manuel (avec micropipette).

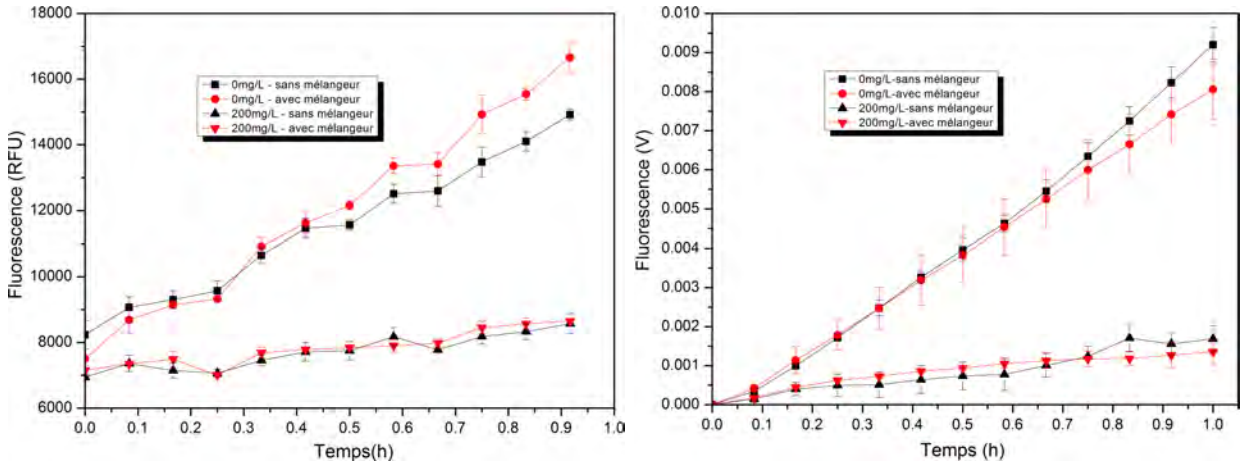

FIGURE 4.21 – Cinétique de la respiration de l'*E.coli* lyophilisés avec et sans mélangeur en fonction de la concentration en PCP : à gauche minisystème et à droite le microsystème

A partir des résultats du signal de fluorescence présentés à la figure 4.21, nous avons calculé le taux d'inhibition pour la concentration 200mg/L en PCP. Le tableau 4.8 présente le taux d'inhibition pour la concentration 200mg/L avec les deux systèmes de mesure.

	Minisystème		**Microsystème**	
	Sans mélangeur	Avec mélangeur	Sans mélangeur	Avec mélangeur
0 mg/L	-	-	-	-
200 mg/L	77	83	81	84

TABLE 4.8 – Taux d'inhibition du PCP en (%) avec et sans mélangeur pour les deux systèmes de mesure

Une corrélation est encore une fois établie entre les deux systèmes de mesure. Les cinétiques de la respiration sont quasi-confondues pour les deux méthodes de mélange. Cette première version de mélangeur fluidique a donné des résultats prometteurs très comparables avec le mélange manuel.

Cependant, pour la répétition de mesure, ce mélangeur présente des contraintes. Ces dernières sont liées au nettoyage/rinçage du mélangeur après utilisation et aussi à la contrainte d'utiliser une seule concentration de l'échantillon à la fois. En effet, pour faire les deux expériences avec et sans pesticide, nous avons effectué une première expérience. Pour réaliser une deuxième expérience, nous avons rincé les réservoirs et les canalisations trois fois avec de l'éthanol puis rempli

les réservoirs.
Une manipulation peu pratique à faire d'une expérience à une autre. Une optimisation de cette version de mélangeur pourra prendre en compte un multi-remplissage de réservoirs avec multi-souches et multi-concentrations.

4.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons effectué une étude de faisabilité d'une application toxicologique. L'objectif était de détecter l'effet d'un molécule toxique sur la respiration bactérienne. La preuve de concept a été faite et un cas d'étude a été validé avec différentes souches bactériennes.
L'utilisation de bactéries lyophilisées a donné d'excellents résultats et se montre prometteuse pour des mesures sur site.
Une première version de mélangeur fluidique a été tester afin d'accroitre la portabilité du système. Des résultats prometteur été obtenus même si des améliorations doivent être apportées à cette version. Une éventuelle duplication de ce système, dans le but de faire des mesures multi-souches et multi-concentrations, peut être envisagée. Aussi, un système de rinçage simple doit être prévu comme extension afin de rendre l'opération de mélange pratique et utilisable par toute personne.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons démontré l'intérêt des biocapteurs bactériens pour le suivi de la qualité des eaux. Nous avons développé une plateforme, portable et performante, pour l'estimation de la concentration en glucose et la mesure de l'effet toxique induit par le PCP. Les objectifs de cette thèse ont été triples :

- Développer des protocoles expérimentaux faciles et rapides permettant des mesures sur site.
- Mettre en place des procédés technologiques respectant les contraintes de biocompatibilité, perméabilité, reproductibilité, fiabilité et coût de fabrication.
- Explorer les propriétés du capteur pour différentes souches bactériennes et différents polluants.

Après avoir examiné les possibilités offertes par les systèmes de transduction disponibles, nous avons convergé vers le développement de deux capteurs optiques. Le premier met en oeuvre des optodes sous deux configurations, un macro système et un système avec puce microfluidique. Les performances du macrosystème ont été validées sur une gamme de détection de 0 à 32 mg/L de carbone organique, très réduite en rappel de l'application visée. Le microsystème a montré des performances insuffisantes, il n'a été validé que pour des conditions expérimentales spécifiques. Nous avons conclu que ce type de capteur était limité dans sa gamme de détection et ne répondait à la problématique posée par le suivi de la biodégradation dans les eaux usées.
Le second capteur est un capteur à résazurine. Il s'agit d'un indicateur rédox facilement intégré dans le protocole de préparation de l'échantillon. Ce fluorophore qui traduit les perturbations de l'activité respiratoire des bactéries induite par les polluants avec une bonne sensibilité. Le capteur se révèle d'utilisation simple.
Nous avons démontré que notre système intégré peut être utilisé pour le suivi de la biodégradation du glucose ainsi que le suivi de l'effet toxique du PCP. L'*E.coli* a été utilisé pour les tests de biodégradation des polluants organiques et un panel de trois souches bactériennes a été testé pour la détection de molécules toxiques.
Le choix de la molécule toxique s'est porté sur un pesticide, le PCP. Il s'agit d'un pesticide fortement utilisé par l'industrie et en agriculture qui est très présent dans l'environnement. Aussi, ce pesticide ne réagit pas avec le fluorophore utilisé et ne perturbe pas la réaction.
Une puce fluidique multi-puits permettant de faire plusieurs mesures en parallèle avec différentes souches bactériennes et différentes concentrations en polluants a été fabriquée. Une première

génération de biopuce, avec du Verre/PDMS, a montré des limitations de porosité. Deux générations de biopuces ont été mises en oeuvre utilisant des résines photosensibles : résine SU8 et film DF. Avec cette deuxième version du capteur, nous avons mis en évidence la diminution du signal de fluorescence en présence du pesticide PCP. Un effet d'inhibition dépendant de la concentration en PCP a été démontré pour trois souches bactériennes différentes. Une trés bonne corrélation avec une méthode de référence a été validée. L'utilisation de bactéries lyophilisées a également été testée. Elle allège considérablement le protocole expérimental principalement en durée et aussi en portabilité. En effet, la préparation d'échantillon ne prend que 30 minutes contre 18 heures avec le protocole de bactéries fraîches. Afin d'accroître encore plus la portabilité du système, un mélangeur fluidique a été testé. Cette première version de mélangeur a été validé. L'ensemble de ces développements a montré que notre système de détection est bien adapté à des analyses sur site.
Différentes catégories de polluants peuvent être ainsi détectées en observant les changements métaboliques qu'ils apportent.

Caractéristiques	Notre capteur (Résazurine)	[89]	[107]
Transduction	optique	électrochimique	optique
Gamme de détection (mg/L)	0-200	0-100	0-300
Sensibilité	0,48 mV/[mgGluc/L]	NA	NA
Portabilité	++++	+	-
Reproductibilité	+++	+	+
Dimensions	+++	++++	+
Facilité mise en oeuvre	++++	++	+
Temps de mesure	- 10 h : biodégradation -1h : Toxicité	300min : biodégradation	180min : biodégradation
Durée protocole	30 min-Bactéries lyophilisées 18h-Bactéries fraîches	NA	NA
Souches bactériennes	multi-souches lyophilisées/fraîches	souche unique fraîche	souche unique fraîche

Table 4.9 – Comparaison de notre capteur avec deux capteurs miniaturisés dans la littérature

Le tableau 4.9 illustre une comparaison et positionnement de notre capteur avec deux biocapteurs développés dans la littérature.
Par ailleurs, comme nous l'avons vu, le mélangeur fluidique allège considérablement le protocole de mesure sur site. Le mélangeur conçu présente toutefois des contraintes de manipulations et de rinçage. Nous pourrons imaginer des fonctionnalités à intégrer sur une puce microfluidique

c'est-à-dire assurant la réhydratation des bactéries lyophilisés, puis la préparation de l'échantillon dans les proportions voulues et le remplissage des puits de mesure.
Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives. L'approche multi-puits en particulier autorise la parallélisation des mesures mais permet également une analyse multi-souches d'un même échantillon. Comme nous l'avons vu, chaque souche bactérienne répond de façon différente à la présence des substances toxiques. Nous pouvons donc imaginer, en associant un traitement du signal adapté, acquérir des spectres de réponses, et définir de signatures propres à chaque polluant. Ceci permettait d'augmenter considérablement la sélectivité des analyses.

Glossaire

- **DBO** Demande Biochimique en Oxygène
- **BRGM** Le bureau de recherche géologique et minère
- **EU WFD** Europe Water Framework Directive
- **APHA** Association américaine de la santé publique
- **MEST** Matières en suspension totale
- **LB** Milieu Luria Bertani
- **DO** Densité optique
- **PDMS** Polydiméthylsiloxane
- **PSM** Poste de sécurité microbienne
- **PEB** Post exposure bake
- **RFU** Relative fluorescence unit

Annexes

A Milieux de culture et produits chimiques

A.1 Stérilisation du matériel

Afin de limiter la contamination des solutions chimiques et des milieux de culture, les bouteilles de stockage, les tubes en verre et le système microfluidique de mesure (l'ensemble des connecteurs et des tubes tygon...) sont autoclavés durant 20 minutes à 100°C avant chaque expérience.

A.2 Milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés lors de nos travaux sont de nature liquide et/ou gélose. Ils ont été autoclavés à 121°C pendant 15 minutes.

- **Milieu Luria Bertani (LB) :** milieu de culture Luria Bertani de la société Fisher Scientific® composé de 10g de tryptone, 10g d'extrait de levure et 5g de NaCl pour un litre d'eau distillée. Ce milieu peut être conservé à 4°C pendant un mois dans des bouteilles en Verre fermées hermétiquement.
- **Milieu LB Gélose :** milieu LB avec la même composition que le milieu LB cité ci-dessus mais avec 15g/L de plus de gélose. Ce milieu sert à stocker les bactéries dans des boîtes de pétri.
- **Milieu M9 :** milieu « minimum »basique composé de sels minéraux qui permet de freiner et de suspendre la croissance bactérienne. Le milieu M9 déjà prêt vient de la société BD difco® concentré 5 fois. Il est composé de 33,9g/L de phosphate disodique (Na_2HPO_4), 15g/L de phosphate monopotassique (KH_2PO_4), 2,5g/L de chlorure de sodium (NaCl) et 5g/L de chlorure d'ammonium (NH_4Cl). Pour un litre d'eau DI, on rajoute 15,61g du mélange du fournisseur (concentré 5x).
- **Solution de $MgSO_4$:** Une préparation d'une solution de $MgSO_4$ à 10^{-2}M a été faite afin de laver les bactéries. 2,46g de $MgSO_4$, $7H_2O$ de la société Fisher Scientific® sont dissous dans un litre d'eau distillée.
- **Solution de Glucose :** La préparation est faite dans de l'eau distillée et filtrée par un filtre 0,2 μM. Le glucose monohydraté 99 % extra pur est fourni par la société Acros ORGANICS®. Une préparation d'une solution mère est faite à chaque mesure. A partir de cette dernière, une gamme de concentration en suivant un protocole par dilutions successives selon le pas choisi est préparée.

B Préparation de la souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée au cours de ces travaux est l'Escherichia coli **K12MG1655** de référence ATCC®700926 [128]. Il s'agit d'une souche commune qui représente peu de mutations et qui s'approche beaucoup de la souche sauvage de l'E.coli. La culture bactérienne se fait en deux principales étapes : une première culture durant une nuit (12 heures) et une deuxième culture pour reprendre les bactéries en phase exponentielle (section C).

B.1 Conservation des souches bactériennes

Pour conserver les souches bactériennes, nous utilisons deux méthodes de stockage : la première sur boîte de pétri et la deuxième par congélation à -80°C.

— **Stockage sur boîte de pétri :** Il s'agit d'une boîte en plastique transparent avec couvercle pour protéger le contenu d'une éventuelle contamination. Après stérilisation, les boîtes sont remplies avec de la solution LB gélosée chaude (à la sortie de l'autoclave 50°C) jusqu'à obtention d'une épaisseur de 0.5 cm environ au fond de la boîte (figure 22). Nous remettons le couvercle et laissons refoidir à température ambiante une trentaine de minutes le temps de la solidification de la solution LB gélosée. Les boîtes de pétri sont stockées par la suite au réfrigérateur à 4°C (pendant deux mois) et prêtes à l'ensemencement par les bactéries.

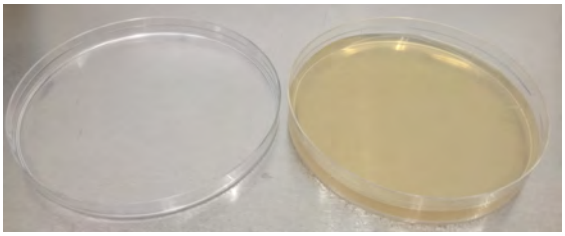

FIGURE 22 – Boîte de petri à LB gélosé

.

Le remplissage et le refroidissement des boîtes de pétri se font sous PSM (Poste de Sécurité Microbienne) afin d'éviter d'éventuelles contaminations.
L'ensemencement des bactéries dans la boîte de Pétri se fait à l'aide de la méthode des cadrans par contact direct à travers des stries multiples avec une anse en plastique stérile (figure 23).

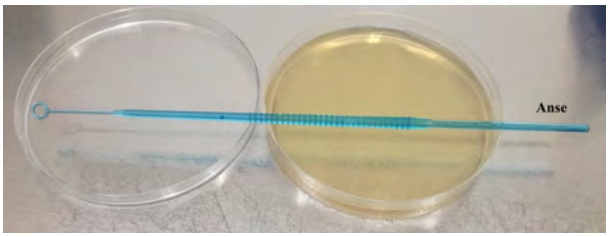

FIGURE 23 – Boîte de petri d'E. coli strillée avec une anse en plastique

.

La boîte de pétri avec les bactéries est incubée par la suite pendant 24h dans une étuve à 30°C (figure 24).

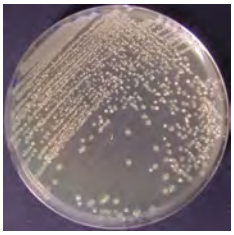

FIGURE 24 – E. coli isolées sur boîte de pétri après 24 heures d'incubation

.

Ensuite, la boîte est parafilmée et stockée au réfrigérateur à 4°C pendant deux semaines au maximum.

— **Congélation à -80°C :** Afin de conserver les souches bactériennes plus longtemps, ces dernières sont stockées à -80°C pendant 2 à 3 ans. Nous utilisons des systèmes de stockage de bactéries Microbank de la société Pro-LAB®. Le mode opératoire se fait en quatre étapes principales :

1. Une culture pure pendant 24h sur boîte de pétri.
2. Mélange des billes et du cryopréservateur fourni par Microbank, puis aspiration du surplus de ce dernier à l'aide d'une pipette.
3. Récupération des bactéries isolées sur boîte de pétri après incubation avec une anse et mélange avec les billes et le cryopréservateur.
4. Billes prêtes à être congelées et utilisées pour inoculer des milieux solides ou liquides.

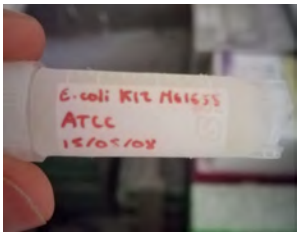

FIGURE 25 – Congélation en billes de l'E.coli

.

B.2 Cinétique et suivi de la croissance bactérienne

Pour suivre une croissance bactérienne, deux méthodes principales sont utilisées : par mesure de l'absorbance et/ou par la méthode de dénombrement (Colony Forming Unit).

Méthode de mesure de l'absorbance : La mesure de l'absorbance est un moyen rapide et efficace pour mesurer la concentration bactérienne d'une culture. Durant ces travaux, la mesure de l'absorbance est faite avec le colorimètre numérique de la société Fisher scientific® à 590 nm. L'échantillon à mesurer est mis dans une cuve à 1ml de dimensions 12,5 x 12,5 x 45 mm de la société BRAND®, le milieu de culture est mis dans une autre cuve qui servira comme référence. En respectant la gamme de linéarité de la loi de Beer-Lambert, l'absorbance est mesurée entre 0 et 0,8. Pour des concentrations élevées (supérieures à 0.8 de DO), il faut alors diluer l'échantillon ainsi que la référence et cela surtout après une étape longue de pré-culture.

Méthode de CFU (Colony Forming Unit) : Méthode de quantification de colonies sur boîtes de pétri. Des dilutions sont effectuées à partir de l'échantillon avec des rapports allant de 10^{-1} à 10^{-7} et étalées par la suite sur boîtes de pétri, incubées pendant 24 heures à 30°C.
Le dénombrement des colonies est fait sur la boîte où l'observation macroscopique est favorable et cela à travers la formule suivante (équation 2) :

$$CFU/ml = \frac{NbreColonies.10}{FacteurDilution} \tag{2}$$

Corrélation entre nombre de colonies et densité optique : La première étape réalisée au cours de ces travaux a été d'établir une corrélation entre la concentration bactérienne avec la méthode de quantification (CFU) et l'absorbance (densité optique : DO) mesurée pour la souche E.coli K12MG1655. La figure 26 présente le graphique du nombre de colonies en fonction de la densité optique.

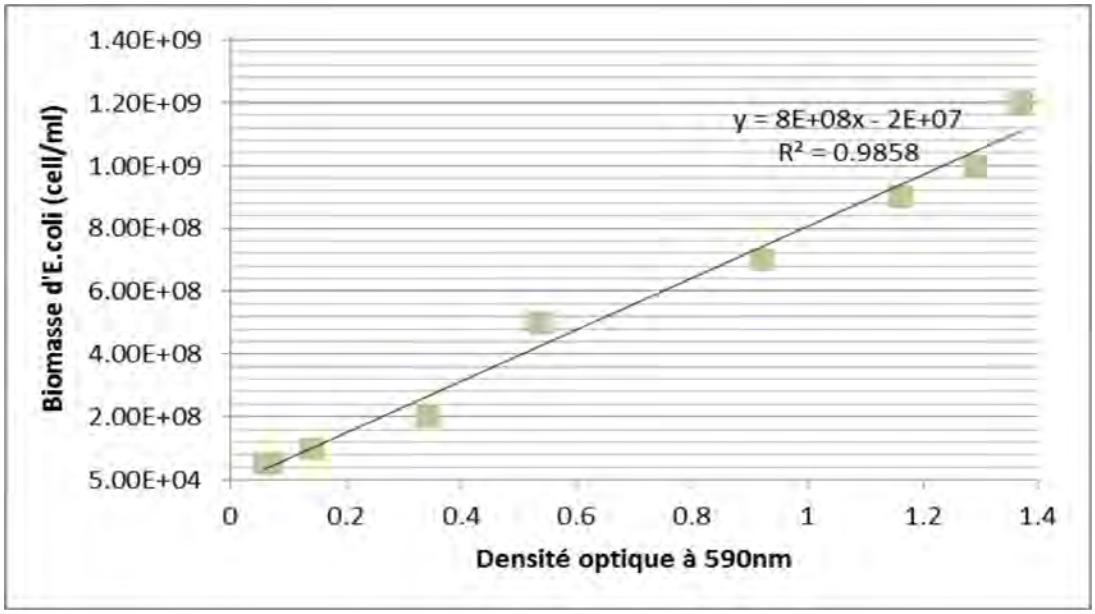

FIGURE 26 – Corrélation entre la densité optique mesurée à 590nm et le nombre de colonies par ml.

Cinétique de croissance de l'E.coli Le suivi de la croissance de l'E.coli se fait pendant la phase de culture après la phase de pré-culture et cela en mesurant l'absorbance (la densité optique) toutes les demi-heures. La cinétique présentée par la figure (27) illustre la croissance de l'E.coli (l'absorbance et le log de l'absorbance) pendant 7 heures.

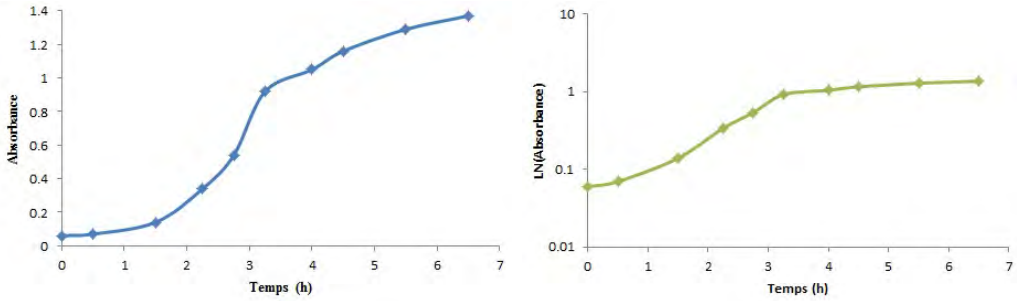

FIGURE 27 – Suivi de croissance de l'E.coli

.

La figure (27) illustre les différentess étapes d'une croissance bactérienne à savoir :

— **La phase de latence :** Elle représente la première demi heure de la croissance pour notre souche. La durée de cette dernière dépend des microorganismes (âge des bactéries, densité cellulaire...) et aussi de la composition des milieux. Il s'agit d'une phase de familiarisation des bactéries avec l'environnement qui correspond à la phase de l'adaptation enzymatique.

— **La phase de croissance exponentielle :** C'est la phase de multiplication des bactéries à une vitesse maximale. Dans notre cas, cette phase dure deux heures et demi environ. Elle dépend énormement de la température.

— **La phase stationnaire :** Elle correspond à la phase d'épuisement des nutriments où l'équilibre entre les bactéries qui naissent et qui meurent est atteint. Cette phase est vue sur notre graphe de croissance de l'E.coli entre trois heures et sept heures de croissance.

— **La phase de décroissance :** Cette phase ne figure pas sur notre courbe. Les bactéries ne se divisent plus durant cette phase, ce qui est dû à une lyse bactérienne par augumentation de déchets toxiques, facteur limitant de nutriments.

C Protocole bactérien de préparation de l'échantillon

C.1 Etape de pré-culture

Une colonie de la boîte de Pétri ou bien une bille des bactéries congelées à -80°C sont réccupérés, puis mises dans 5 ml de milieu LB dans un falcon® de 50ml. La souche bactérienne est mise en culture à 30°C sous agitation de 350 rpm durant 12 heures (une nuit) dans un agitateur incubateur Professional-3500 de la société VWR®.

C.2 Etape de culture

Après l'étape de pré-culture de 12 heures, la densité optique est mesurée après dilution de l'échantillon (car on ne peut pas mesurer des échantillons très concentrés avec le spectrophotomètre). La DO_{590nm} à 0,05 est réajustée par dilution avec le milieu LB en appliquant la formule $C_i * V_i = C_f * V_f$. Une deuxième culture est lancé pendant deux heures sous agitation 350 rpm à 30°C. Un suivi de la densité optique jusqu'à avoir la densité cellulaire souhaitée ($Absorbance_{590nm} = 0,25$) est fait.

C.3 Etape de lavage des bactéries

Lorsque la densité optique souhaitée est atteinte, le volume de bactéries (10ml de suspension bactérienne) est centrifugé dans des falcons® de 50ml à 5000g pendant 4 minutes et à 4°C (centrifugeuse Elmi® Skyline) . Le culot bactérien récupéré est lavé trois fois avec la solution de $MgSO_4$ avec les mêmes paramètres de centrifugation. Le culot d'E.coli lavé est mélangé par la suite à 10ml de milieu M9 refroidi. Un ajustement de la densité optique est fait par la suite à la valeur souhaitée par le milieu M9 ($\text{Absorbance}_{590\text{nm}} = 0,25$: valeur à laquelle notre système de mesure est optimal).

C.4 Préparation de l'échantillon

Les suspensions bactériennes dans le milieu M9 sont prêtes à être mélangées avec l'échantillon à analyser. Les bactéries sont mélangées à une gamme de plusieurs concentrations en matière organique avec des proportions 90% bactéries dans le milieu M9 et 10% matière organique.

D Chaîne instrumentale du capteur à Résazurine

Le banc d'essai a été réalisé au cours de la thèse de Loic Recoules [14]. Il est composé d'un étage d'excitation et d'un étage de détection. En se référant au pics d'excitation de la résazurine (571 nm) et d'émission de la résorufine (584nm), un choix des composants des deux étages a été fait.

D.1 Etage d'excitation

Un choix s'est porté sur des leds OSRAM LTN91E [129] de dimension 3,2mm x 1,6mm x 1,85mm. Le pic d'intensité de ces Leds est à 530nm pour un courant de polarisation de 20mA.

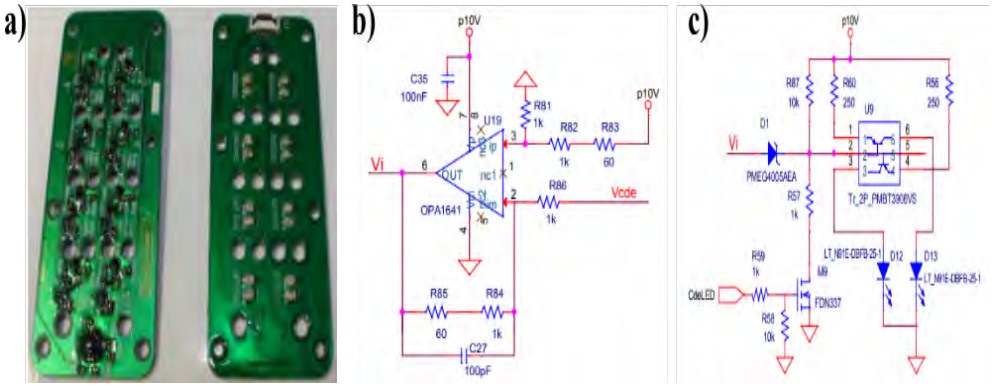

FIGURE 28 – Etage d'excitation du capteur à résazurine [14]

L'étage d'excitation est composé de deux principaux éléments : le module à Leds et les filtres optiques. Les leds excitent avec une lumière verte couvrant la longueur d'onde d'excitation de la résazurine (560nm).

D.2 Etage de détection

Le choix du photodétecteur est porté sur des photodiodes de la société Texas Instruments. La référence de ces dernières est OPT301 [130]. Elles intègrent une pré-amplification et ont une sensibilité de 0,47V/yW à 650nm. Il s'agit d'un circuit intégré optoélectronique sur une seule puce isolée diélectriquement. La surface active de la photodiode est de 2,28 x 2,29 mm^2. Elle fonctionne avec une polarisation nulle et a un faible courant d'obscurité.
L'OPT301 fonctionne sur une large plage d'alimentation (±2,25, ± 18V) et le courant d'alimentation est seulement de 400μA. Elle est emballée dans un emballage métallique hermétique avec une fenêtre en verre.

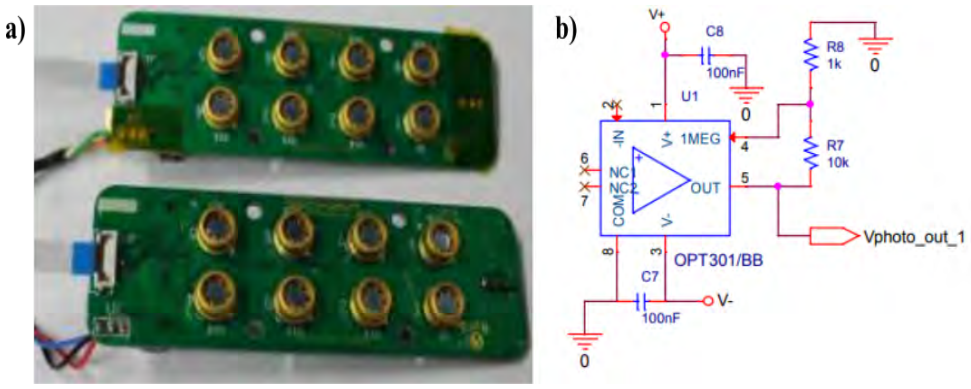

FIGURE 29 – Etage d'émission du capteur à résazurine [14]

E Procédé de fabrication des biopuces Verre/PDMS

Les différentes étapes de réalisation des biopuces sont présentées dans la figure (30) et les détails du procédé dans le tableau (10).
Après avoir nettoyé le substrat en silicium dans un bain de H_2O_2/H_2SO_4, le dépôt d'une couche de photo résine SU8 d'épaisseur 500μm est fait par méthode de spincoating.
Une fois que le dépôt de résine fait, nous procèdons à l'étape de photolithographie avec une puissance lumineuse d'insolation $20mW/cm^2$ pendant 66s.
Le recuit après exposition se fait avec le même cycle de température détaillé dans le procédé de fabrication de biopuces à optode. Suite à cela, nous passons à l'étape de développement suivi par un traitement de surface rendant la surface hydrophobe permettant un démoulage facile du PDMS.
Après démoulage du PDMS, ce dernier garde l'empreinte de la fluidique de la puce, la découpe et le perçage des entrées/sorties des réservoirs est fait.
Le capot et la fluidique sont scellés par plasma O_2 après avoir été nettoyés dans de l'isopropanol dans un bain à ultrasons pendant 5min.

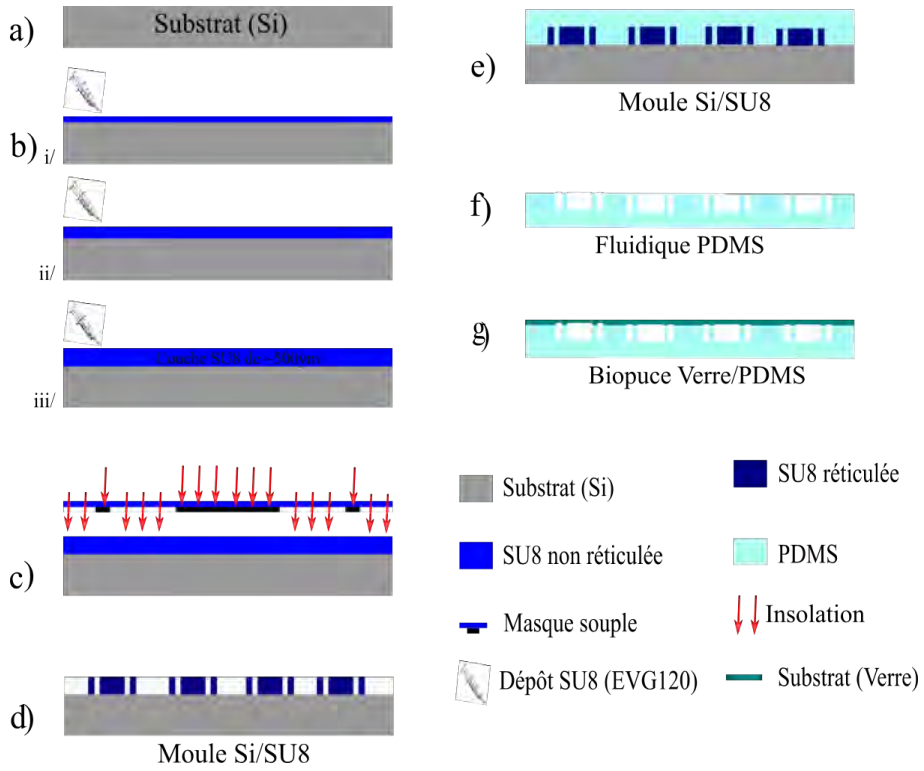

FIGURE 30 – Procédé de fabrication de la biopuce Verre/PDMS à résazurine : Fabrication du moule Si/SU8 (a-d), de la fluidique en PDMS (e-f), du scellement du capot et de la fluidique (g)

Etape	Schéma	Description
1	(a)	Nettoyage substrat (Si)- Bain H_2O_2/H_2SO_4 (2min). Déshydratation 15min.
2	(b) : i-iii	Dépôt SU8-500 μm. Dépôt et enduction 3 fois de suite pendant une nuit avec la machine EVG120.
3	(c)	Photolithographie : Insolation avec masque souple, $\lambda = 365nm$, 20mW.cm^-2, 66s. PEB (rampe) : 95°C, 27min
	(d)	Développement : bain de "développeur SU8" pendant 30min (3 bains)
	-	Recuit (rampe) : 125°C, 2min
4	(e)	Moulage PDMS sur le moule Si-SU8, enduction 4h à 60°C
	(f)	Démoulage fluidique en PDMS, Perçage et découpage de la fluidique des puces
5	(g)	Nettoyage de la fluidique en PDMS et du capot en Verre dans l'Isopropanol 5min au bain ultrason.
6	(h)	Scellement fluidique et capot de la biopuce par plasma O_2 à 0.5mbar pendant 2min30s à 100% de puissance (machine plasma de la société Diener PICO), puis sont mises en contact et placées au four pendant 40min à 60°C.

TABLE 10 – Protocole de réalisation de biopuces Verre/PDMS à résazurine

Bibliographie

[1] « electrochemical device for chemical analysis », brevet us2913386a., 1959.

[2] Dissolved oxygen by the winkler method, brevet 0-8047-3641-3., 1965.

[3] Klimant, Meyer, and Kühl. « fiber-optic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology ». Limnology and Oceanography, 1995.

[4] McDonagh and al. « phase fluorometric dissolved oxygen sensor ». Sensors and Actuators B : Chemical, 2001.

[5] Noor and al. « characterization of optical fiber dissolved oxygen sensor for aquaculture sensing and monitoring ». Procedia Chemistry, 2016.

[6] Société marcherey-nagel. http ://www.mn-net.com, 06-2018.

[7] K. Rabaey and al. « microbial fuel cells : novel biotechnology for energy generation ». 23(6) :291–298, Trends in Biotechnology, 2005.

[8] Chan and al. « designing an amperometric thick-film microbial BOD sensor ». 15(7) :343–353, Biosensors and Bioelectronics, 2000.

[9] Ben-Yoav and al. « a whole cell electrochemical biosensor for water genotoxicity biodetection ». 54(25) :6113–6118, Electrochimica Acta, 2009.

[10] Liu and al. « short-term BOD (BODst) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process : Part II : Instrumentation of integrated flow injection analysis (FIA) system for BODst estimation ». 20(3) :571–578, Biosensors and Bioelectronics, 2004.

[11] J. Liu and al. « short-term BOD (BODst) as a parameter for on-line monitoring of biological treatment process : Part i. a novel design of BOD biosensor for easy renewal of bio-receptor ». 20(3) :562–570, Biosensors and Bioelectronics, 2004.

[12] A. Torrents and al. « design of a microfluidic respirometer for semi-continuous amperometric short time biochemical oxygen demand (BODst) analysis ». 66 :27–37, Biochemical Engineering Journal, 2012.

[13] H. Nakamura and al. « a chemiluminescence biochemical oxygen demand measuring method ». 602(1) :94–100, Analytica Chimica Acta, 2007.

[14] L. Recoules. « biocapteur pour la surveillance de la qualité de l'eau. application aux eaux pluviales et de stations d'épurations », these, 2015.

[15] pyro-science. https ://www.pyro-science.com, 26-06-2018.

[16] Thermo fisher scientific. https ://www.thermofisher.com, 17-10-2018.

[17] ISO 5813 :1983. « water quality - determination of dissolved oxygen - iodometric method, n.d ». 1983.

[18] ISO 5814 :1990. « water quality - determination of dissolved oxygen - electrochemical probe method, n.d ». 1990.

[19] Le bureau de recherche géologiques et minère. http ://www.brgm.fr/, 07-05-2018.

[20] Europe water framework directive. http ://ec.europa.eu/environment/water.htm, 07-05-2018.

[21] United states environmental protection agency. https ://www.epa.gov/, 07-05-2018.

[22] American Public Health Association (APHA). « standard methods for the examination of water and wastewater »(18th ed.), american water works association, water environment federation, washington, dc (1992).

[23] R. Lalauze. *« Capteurs chimiques, biocapteurs et biopuces », 2012.* Lavoisier.

[24] B. Nechad and al. « calibration and validation of a generic multisensor algorithm for mapping of total suspended matter in turbid waters ». 114(4) :854–866, Remote Sensing of Environment, 2010.

[25] Water quality monitoring : A practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes. ballance, richard and bartram, jamie. 1998.

[26] L. Jarup. « hazards of heavy metal contamination ». 68(1) :167–182, British Medical Bulletin, 2003.

[27] P. Crouzet and al. *« Nutrients in European ecosystems », 1999.*

[28] R. J. Gilliom and al. « pesticides in the nation's streams and ground water », 1992-2001.

[29] *électrochimie.*

[30] J. Wang. « electrochemical glucose biosensors ». 108(2) :814–825, Chemical Reviews, 2008.

[31] D. A. Noren and al. « clarifying the butler volmer equation and related approximations for calculating activation losses in solid oxide fuel cell models ». 152 :175–181, Journal of Power Sources, 2005.

[32] K. Riedel and al. « microbial sensors on a respiratory basis for wastewater monitoring ». In *History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation*, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, pages 81–118. Springer, Berlin, Heidelberg.

[33] A. Sakumoto and al. « treatment of waste water by a combined technique of radiation and conventional method ». 24(1) :99–115, Radiation Physics and Chemistry, 1984.

[34] A. Jang and al. « state of the art lab chip sensors for environmental water monitoring ». 22(3) :032001, Measurement Science and Technology, 2011.

[35] R. D. Swisher. *« Surfactant Biodegradation », Second Edition,.* CRC Press, 1986.

[36] S. Jouanneau and al. « methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD) : A review ». 49 :62–82, Water Research, 2014.

[37] W. Xu and al. « oxygen sensors based on luminescence quenching : Interactions of metal complexes with the polymer supports ». 66(23) :4133–4141, Analytical Chemistry, 1994.

[38] A. K. McEvoy and al. « dissolved oxygen sensor based on fluorescence quenching of oxygen sensitive ruthenium complexes immobilized in sol gel derived porous silica coatings ». 121(6) :785–788, Analyst, 1996.

[39] X. Xiong and al. « dissolved oxygen sensor based on fluorescence quenching of oxygen sensitive ruthenium complex immobilized on silica ni p composite coating ». 117(1) :172–176, Sensors and Actuators B : Chemical, 2006.

[40] Système de tests en cuve LCK - hach, 14-06-2018.

[41] ISO 5815-1 :2003. Water quality - determination of biochemical oxygen demand after n days (bodn) - part 1 :dilution and seeding method with allylthiourea addition. 2003.

[42] N. Yoshida and al. « a mediator type biosensor as a new approach to biochemical oxygen demand estimation ». 125(12) :2280–2284, Analyst, 2000.

[43] T. Kalab and al. « evaluation of mediators for development of amperometric microbial bioelectrodes ». 6(11) :1004–1008, Electroanalysis, 2005.

[44] S. A. Learoyd and al. « an investigation of dye reduction by food-borne bacteria ». 72(6) :479–485, Journal of Applied Bacteriology, 1992.

[45] G. M. Delaney and al. « electron transfer coupling in microbial fuel cells. 2. performance of fuel cells containing selected microorganism mediator substrate combinations ». 34(1) :13–27, Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology, 2008.

[46] H. P. Bennetto and al. « anodic reactions in microbial fuel cells ». 25(2) :559–568, Biotechnology and Bioengineering, 2004.

[47] N. Pasco and al. « biochemical mediator demand â a novel rapid alternative for measuring biochemical oxygen demand ». 53(5) :613–618, Applied Microbiology and Biotechnology, 2000.

[48] M. Grzebyk and al. « microbial fuel cells (MFCs) with interpolymer cation exchange membranes ». 41(3) :321–328, Separation and Purification Technology, 2005.

[49] B. H. Kim and al. « novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell ». 25(7) :541–545, Biotechnology Letters, 2003.

[50] M. Di Lorenzo and al. « a single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters ». 43(13) :3145–3154, Water Research, 2009.

[51] I. S. Chang and al. « continuous determination of biochemical oxygen demand using microbial fuel cell type biosensor ». 19(6) :607–613, Biosensors and Bioelectronics, 2004.

[52] I. S. Chang and al. « improvement of a microbial fuel cell performance as a BOD sensor using respiratory inhibitors ». 20(9) :1856–1859, Biosensors and Bioelectronics, 2005.

[53] A. Kumlanghan and al. « microbial fuel cell-based biosensor for fast analysis of biodegradable organic matter ». 22(12) :2939–2944, Biosensors and Bioelectronics, 2007.

[54] J. Liu and al. « microbial BOD sensors for wastewater analysis ». 36(15) :3786–3802, Water Research, 2002.

[55] I. Karube and al. « microbial electrode BOD sensors ». 19(10) :1535–1547, Biotechnology and Bioengineering, 1977.

[56] M. Farré and al. « pesticide toxicity assessment using an electrochemical biosensor with pseudomonas putida and a bioluminescence inhibition assay with vibrio fischeri ». 373(8) :696–703, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002.

[57] M. Farré and al. « toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor ». 426(2) :155–165, Analytica Chimica Acta, 2001.

[58] E. Mauriz and al. « determination of carbaryl in natural water samples by a surface plasmon resonance flow-through immunosensor ». 21(11) :2129–2136, Biosensors and Bioelectronics, 2006.

[59] F. Lagarde and al. « cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment ». 400(4) :947, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011.

[60] N. Maximova and al. « a set up of a modern analytical laboratory for wastewaters from pulp and paper industry ». 36(8) :1323–1349, Chemical Society Reviews, 2007.

[61] R. W. Bogue. « biosensors for monitoring the environment ». 23(4) :302–310, Sensor Review, 2003.

[62] J. Wang and al. « DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. a review ». 347(1) :1–8, Analytica Chimica Acta, 1997.

[63] M. Di Lorenzo and al. « a small-scale air-cathode microbial fuel cell for on-line monitoring of water quality ». 62 :182–188, Biosensors and Bioelectronics, 2014.

[64] A. Kumlanghan and al. « microbial BOD sensor for monitoring treatment of wastewater from a rubber latex industry ». 42(6) :483–491, Enzyme and Microbial Technology, 2008.

[65] M. Raud and al. « comparative study of semi-specific aeromonas hydrophila and universal pseudomonas fluorescens biosensors for BOD measurements in meat industry wastewaters ». 50(4) :221–226, Enzyme and Microbial Technology, 2012.

[66] M. Raud and al. « bioelectronic tongue and multivariate analysis : A next step inÂ BOD measurements ». 47(7) :2555–2562, Water Research, 2013.

[67] Ch. Chan and al. « measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast arxula adeninivorans for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl) sulfonate (PCS) part i : construction and characterization of the microbial sensor ». 14(2) :131–138, Biosensors and Bioelectronics, 1999.

[68] M. Lehmann and al. « measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast arxula adeninivorans for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl)sulfonate (PCS) : Part II : application of the novel biosensor to real samples from coastal and island regions ». 14(3) :295–302, Biosensors and Bioelectronics, 1999.

[69] Sh. Oota and al. « development of mediated BOD biosensor system of flow injection mode for shochu distillery wastewater ». 26(1) :262–266, Biosensors and Bioelectronics, 2010.

[70] J. Jia and al. « co-immobilized microbial biosensor for BOD estimation based on solâgel derived composite material ». 18(8) :1023–1029, Biosensors and Bioelectronics, 2003.

[71] N. Kwok and al. « an optical biosensor for multi-sample determination of biochemical oxygen demand (BOD) ». 110(2) :289–298, Sensors and Actuators B : Chemical, 2005.

[72] L. Liu and al. « organic inorganic hybrid material for the cells immobilization : Long-term viability mechanism and application in BOD sensors ». 25(2) :523–526, Biosensors and Bioelectronics, 2009.

[73] Z. Liu and al. « microbial fuel cell based biosensor for in situ monitoring of anaerobic digestion process ». 102(22) :10221–10229, Bioresource Technology, 2011.

[74] D. Chen and al. « a BOD biosensor based on a microorganism immobilized on an al_2o_3 solâgel matrix ». 372(5) :737–739, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2002.

[75] Z. Yang and al. « disposable sensor for biochemical oxygen demand ». 46(1) :10–14, Applied Microbiology and Biotechnology, 1996.

[76] C. Preininger and al. « optical fiber sensor for biological oxygen demand ». 66 :1841–1846, Analtical Chemistry, 1994.

[77] L. Xin and al. « an optical biosensing film for biochemical oxygen demand determination in seawater with an automatic flow sampling system ». 18(9) :2878, Measurement Science and Technology, 2007.

[78] J. Liu and al. « immobilised activated sludge based biosensor for biochemical oxygen demand measurement ». 14(12) :883–893, Biosensors and Bioelectronics, 2000.

[79] Y. Li and al. « study of BOD microbial sensors for waste water treatment control ». 28-29(1) :855–863, Applied Biochemistry and Biotechnology, 1991.

[80] M. Kim and al. « klebsiella BOD sensor ». 80(1) :9–14, Sensors and Actuators B : Chemical, 2001.

[81] L. Suriyawattanakul and al. « the use of co-immobilization of emphasis trichosporon cutaneum and emphasis bacillus licheniformis for a BOD sensor ». 59(1) :40–44, Applied Microbiology and Biotechnology, 2002.

[82] G. Chee and al. « development of highly sensitive BOD sensor and its evaluation using preozonation ». 394(1) :65–71, Analytica Chimica Acta, 1999.

[83] V. Arlyapov and al. « biosensor analyzer for BOD index express control on the basis of the yeast microorganisms candida maltosa, candida blankii, and debaryomyces hansenii ». 50(4) :215–220, Enzyme and Microbial Technology, 2012.

[84] Sh. Rastogi and al. « development and characterization of a novel immobilized microbial membrane for rapid determination of biochemical oxygen demand load in industrial wastewaters ». 18(1) :23–29, Biosensors and Bioelectronics, 2003.

[85] G. Chee and al. « biosensor for the estimation of low biochemical oxygen demand ». 379(1) :185–191, Analytica Chimica Acta, 1999.

[86] M. Reiss and al. Determination of BOD-values of starch-containing waste water by a BOD-biosensor1this paper was presented at the fifth world congress on biosensors, berlin, germany, 3â5 june 1998.1. 13(10) :1083–1090, Biosensors and Bioelectronics, 1998.

[87] P. Villalobos and al. « a BOD monitoring disposable reactor with alginate-entrapped bacteria ». 33(8) :961–970, Bioprocess and Biosystems Engineering, 2010.

[88] J. Wang and al. « an innovative reactor-type biosensor for BOD rapid measurement ». 25(7) :1705–1709, Biosensors and Bioelectronics, 2010.

[89] H. Nakamura and al. « a spectrophotometric biochemical oxygen demand determination method using 2,6-dichlorophenolindophenol as the redox color indicator and the eukaryote saccharomyces cerevisiae ». 369(2) :168–174, Analytical Biochemistry, 2007.

[90] H. Nakamura and al. « a new BOD estimation method employing a double-mediator system by ferricyanide and menadione using the eukaryote saccharomyces cerevisiae ». 72(1) :210–216, Talanta, 2007.

[91] N. Pasco and al. « development of a ferricyanide-mediated rapid biochemical oxygen demand method using an immobilised proteus vulgaris biocomponent ». 20(3) :524–532, Biosensors and Bioelectronics, 2004.

[92] K. Catterall and al. « the use of microorganisms with broad range substrate utilisation for the ferricyanide-mediated rapid determination of biochemical oxygen demand ». 55(6) :1187–1194, Talanta, 2001.

[93] K. Baronian and al. « detection of two distinct substrate-dependent catabolic responses in yeast cells using a mediated electrochemical method ». 60(1) :108–113, Applied Microbiology and Biotechnology, 2002.

[94] Y. Yashiki and al. « extracellular reduction of menadione and ferricyanide in yeast cell suspension ». 82(3) :319–321, Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996.

[95] L. Rotariu and al. « yeast cells sucrose biosensor based on a potentiometric oxygen electrode ». 458(1) :215–222, Analytica Chimica Acta, 2002.

[96] L. Rotariu and al. « new potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages ». 513(1) :119–123, Analytica Chimica Acta, 2004.

[97] J. K. Jang and al. « construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell ». 39(8) :1007–1012, Process Biochemistry, 2004.

[98] M. Kim and al. « immobilization of enzymes for klebsiella BOD sensor ». 98(1) :1–4, Sensors and Actuators B : Chemical, 2004.

[99] R. A. Dobbs and al. « the use of ultra-violet absorbance for monitoring the total organic carbon content of water and wastewater ». 6(10) :1173–1180, Water Research, 1972.

[100] A. Bari and al. « measurement of wastewater treatment efficiency by fluorescence and UV absorbance ». 5(4) :423–434, Environmental Monitoring and Assessment, 1985.

[101] M. Mrkva. « evaluation of correlations between absorbance at 254 nm and COD of river waters ». 17(2) :231–235, Water Research, 1983.

[102] D. M. Reynolds and al. « rapid and direct determination of wastewater BOD values using a fluorescence technique ». 31(8) :2012–2018, Water Research, 1997.

[103] T. M. Lai and al. « estimating the biodegradability of treated sewage samples using synchronous fluorescence spectra ». 11(8) :7382–7394, Sensors, 2011.

[104] J. Hur and al. « estimation of biological oxygen demand and chemical oxygen demand for combined sewer systems using synchronous fluorescence spectra ». 10(4) :2460–2471, Sensors, 2010.

[105] Jin Hur and Jinwoo Cho. « prediction of BOD, COD, and total nitrogen concentrations in a typical urban river using a fluorescence excitation-emission matrix with PARAFAC and UV absorption indices ». 12(1) :972–986, Sensors, 2012.

[106] A. C. Tizzard and al. « a resazurin-based biosensor for organic pollutants ». 22(5) :759–763, Biosensors and Bioelectronics, 2006.

[107] Y. Dudal and al. « a fluorescence-based microplate assay to quantify DOM-induced catabolic activity ». 384(1) :175–179, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006.

[108] D. Grieshaber and al. « electrochemical biosensors - sensor principles and architectures ». 8(3) :1400–1458, Sensors, 2008.

[109] S. Liu and al. « advances in pesticide biosensors : current status, challenges, and future perspectives ». 405(1) :63–90, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013.

[110] E. Eltzov and al. « whole-cell aquatic biosensors ». 400(4) :895–913, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011.

[111] A. F. Collings and al. « biosensors : recent advances ». 60(11) :1397, Reports on Progress in Physics, 1997.

[112] A. C. Tizzard and al. « bacterial oxygenases : In vivo enzyme biosensors for organic pollutants ». 22(11) :2400–2407, Biosensors and Bioelectronics, 2007.

[113] D. M. Schmitt and al. « antibacterial activity of resazurin-based compounds against neisseria gonorrhoeae in vitro and in vivo ». 48(4) :367–372, International Journal of Antimicrobial Agents, 2016.

[114] M. Cregut and al. « high throughput and miniaturised systems for biodegradability assessments ». 21, Environmental Science and Pollution Research, 2013.

[115] S. Jouanneau and al. « online detection of metals in environmental samples : Comparing two concepts of bioluminescent bacterial biosensors ». 46(21) :11979–11987, Environmental Science & Technology, 2012.

[116] L. Recoules and al. « a mems approach to determine the biochemical oxygen demand (bod) of wastewaters ». 27, J. Micromech. Microeng, 2004.

[117] A. Mills and al. « use of luminescent gold compounds in the design of thin-film oxygen sensors ». 69(14) :2842–2847, Analytical Chemistry, 1997.

[118] Semrock : FF01-542/50. https ://www.semrock.com/FilterDetails.FF01-542/50-25, 17-10-2018.

[119] Semrock - part number : BLP01-568r. https ://www.semrock.com/FilterDetails.BLP01-568R-25, 17-10-2018.

[120] Semrock : FF01-535/50. https ://www.semrock.com/FilterDetails.FF01-535/50-25, 17-10-2018.

[121] Chayma Haloui. « développement d'un banc de mesure á base de lecteurs de fluorescence miniaturisés », rapport sateg m2, institut national des sciences appliquées toulouse, 2015.

[122] Meriem Djouaher. « optimisation chaîne instrumentale », rapport stage licence 3, ecole polytechnique de montréal, 2016.

[123] LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit for microscopy - thermo fisher scientific. https ://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7007, 23-10-2018.

[124] R. Courson and al. « low-cost multilevel microchannel lab on chip : DF-1000 series dry film photoresist as a promising enabler ». 4(97) :54847–54853, RSC Advances, 2014.

[125] Pentachlorophenol sodium salt. https ://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/76480, 17-12-2018.

[126] P. Amézaga-Madrid and al. « TEM evidence of ultrastructural alteration on pseudomonas aeruginosa by photocatalytic TiO2 thin films ». 70(1) :45–50, Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology, 2003.

[127] P. Amézaga-Madrid and al. « photoinduced bactericidal activity against pseudomonas aeruginosa by TiO_2 based thin films ». 211(2) :183–188, FEMS Microbiology Letters, 2002.

[128] Escherichia coli ATCC. https ://www.lgcstandards-atcc.org/Products.fr, 08-08-2018.

[129] LT n91e-DBFB-25-1 OSRAM - opto semiconductors. https ://www.mouser.fr/ProductDetail/720-LTN91EDBFB251, 09-10-2018.

[130] OPT301 integrated photodiode and amplifier in hermetically sealed package. http ://www.ti.com/product/OPT301, 17-10-2018.