

Développement de biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection de polluants organiques en phase aqueuse

Anh Tuan Mai

▶ **To cite this version:**

Anh Tuan Mai. Développement de biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection de polluants organiques en phase aqueuse. Matériaux. Université Claude Bernard - Lyon I, 2004. Français. NNT : . tel-00007508

HAL Id: tel-00007508
https://theses.hal.science/tel-00007508

Submitted on 24 Nov 2004

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

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

N° d'ordre : 194-2004 Année 2004

THESE EN CO-TUTELLE

Présentée devant

l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITY CLAUDE BERNARD LYON I ET DE L'INSTITUT POLYTECHNIQUE DE HA NOI

Spécialité: chimie

(Arrêté du 25 avril 2002)

Par **Anh Tuan MAI**

DEVELOPPEMENT DES BIOCAPTEURS ELECTROCHIMIQUES A BASE DE TYROSINASE POUR LA DETECTION DES POLLUANTS ORGANIQUES EN PHASE AQUEUSE

Soutenue le 9 Novembre 2004 devant la composition d'examen

Mme. N. JAFFREZIC	Président
M.VACHAUD	Rapporteur
Mme. M.C. PHAM	Rapporteur
M. J.M. CHOVELON	directeur de thèse
M. D.C. NGUYEN	co-directeur de thèse
M. S. V. DZYADEVYCH	examinateur

A la mémoire de mon grand-père
A Thuy

Remerciements

Je voudrais remercier tout d'abord M. Georges Vachaud, Professeur à l'Université Joseph Fourrier pour la coordination dans le cadre du programme 'qualité de l'eau au Viet Nam' et pour avoir accepté de juger ce travail

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Application de la Chimie à l'Environnement (LACE), l'Université Claude Bernard Lyon I, dirigé par Monsieur Jean-Marie Herman et à l'Institut International de Formation de Science en Matériaux (ITIMS), l'Ecole Polytechnique de Hanoi-Vietnam, dirigé par M. Than Duc Hien auxquels je voudrais m'adresser mes remerciements.

M. Jean-Marc Chovelon, directeur de thèse, a assuré l'encadrement, au LACE, de ce travail pendant trois ans. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir guidé et prodigué des conseils sans lesquels je ne pourrais pas compléter cette thèse. Mes remerciements vont également à M. Nguyễn Đức Chiến, co-directeur de thèse.

Ma gratitude s'adresse à Mme. Pham Minh Chau, Professeur à l'Université Paris 7 pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie vivement Madame Nicole Jaffrezic-Renault, directeur de recherche à l'Ecole Centrale de Lyon et M. Seirgei V. Dzyadevych, directeur de recherche à l'Institute Molecular Biology and Genetics, National Acedemy of Sciences of Ukraine pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je tiens à remercier également M. Jean-Pierre Deloume, Mme. Corinne Emmelin, Corinne Ferronato, et M. Christian Georges au LACE pour m'avoir beaucoup aidé au cours de la thèse.

Je voudrais remercier mes amis du 4ème étage du bâtiment J. Raulin, M. POMIER, Tamara, Céline, Fabrice, Philippe, Davy, Emmanuelle, Imen: bonne chance à tous et à toutes.

Je voudrais remercier également à tous mes amis à Lyon en particuliers les étudiants vietnamiens à la DOUA.

Je m'adresse mes remerciements aux collègues à l'ITIMS en particulier à N. N. Toàn, P. D. Thành, N.T.M. Hải.

Je remercie sincèrement à D.V. Anh à Tewnte University, The NeitherLand pour son soutien de fabrication des capteurs, N.D. Lâm à l'Université Paris Sud pour son aide de la soudure de capteurs et Nicolas Prieur pour avoir prélevé les échantillons et réalisé des enquêtes avec moi sur les sites réels.

Je voudrais réserver mes remerciements à mes parents, Giang qui m'ont toujours soutenu pendant les études. En fin je m'adresse mes remerciements très spéciaux à Thuy dont le soutien est toujours spécieux et indispensable à la réussite de ce travail.

Lyon Novembre 2004

Mai Anh Tuan

TABLE DES MATIERES

Remerciements
INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES BIOCAPTEURS 5

Les biocapteur 5
1.1. Définition 6
1.2. Les transducteurs 7
1.2.1. Capteur thermique 7
1.2.2. Capteur optoélectronique 10
1.2.3. Capteur à effet piézoélectrique 12
1.2.4. Capteurs électrochimiques 13
1.3. Biorécepteurs enzymatiques 23
1.3.1. Enzymes: les biocatalyseurs 24
1.3.2. Classification des enzymes 24
1.4. La cinétique enzymatique 26
1.4.1. Cinétique enzymatique 26
1.4.2. Activité enzymatique et concentration d'une enzyme 29
1.4.3 La dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis de la température et du pH 30
1.5. Les techniques d'immobilisation des enzymes 32
1.5.1. L'adsorption 33
1.5.2. L'inclusion ou piégeage 33
1.5.3 Le couplage covalent 34
1.5.4. La réticulation et la co-réticulation 34
Conclusion 36

CHAPITRE 2 : FABRICATION DES CAPTEURS A ITIMS 44

Introduction 44
2.1. Fabrication des ISFETs 45
2.1.1. Phase 1-préparation du substrat – SC 46
2.1.2. Phase 2 – Oxydation 49
2.1.3. Phase 3 – Formation d'anneau de garde 50
2.1.4. Phase 4 – Formation Source/Drain 55
2.1.5. Phase 5 – Formation de la porte 57
2.1.6. Phase 6 – Pulvérisation de Tantale 58
2.1.7. Phase 7 – Ouverture de trous de contact (contact hole) 59
2.1.8. Phase 8 – Oxydation du Tantale 61
2.1.9. Phase 9 – Métallisation 61
2.1.10 Les dernières étapes de fabrication des ISFETs 64
2.2. Fabrication des microélectrodes 69
2.2.1. Phase 1- Préparation du substrat – SC 70
2.2.2. Phase 2 – Oxydation 70
2.2.3. Phase 3 – Lithographie (technique 'Lift-off') 70
2.2.4. Phase 4 – Pulvérisation cathodique 72
2.2.5. Phase 5 – Retrait de la résine 72
2.2.6. Encapsulation des capteurs conductimétriques 73

Conclusion 74

CHAPITRE 3 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DES CAPTEURS 76

3.1. La conductimétrie 76
3.1.1. Principe de la mesure 77
3.1.2. Instrumentation 80
3.2. Les mesures avec les ISFETs 82
3.2.1. Les MOSFETs 82
3.2.2. Les ISFETs 85
3.2.3. Principe de la mesure 87
3.2.4. Les ENFETs 89
3.2.5. Système de mesure du capteur ISFET 90
3.2.5.1. Mesure simple 90
3.2.5.2. Système de mesure différentielle 93
Conclusion 96

CHAPITRE 4 : DETECTION DE DERIVES PHENOLIQUES 99

4.1. Les chlorophénols 99
4.2. Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions. 100
4.2.1. Experimental 103
4.2.2. Results ans discussions 105
4.2.3. Conclusion 110
4.3. Compléments d'information sur la membrane enzymatique 112
4.4. Etude de l'influence de la température 114

CHAPITRE 5 : DETECTION DES PESTICIDES EN PHASE AQUEUSE 119

5.1. Détection de pesticides par inhibition de la tyrosinase 119
5.2. Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites 120
5.2.1. Introduction 121
5.2.2. Experimentals 124
5.2.3. Results and discussion 126
5.2.4. Conclusion 132
5.3. Etude des interférents 133

CONCLUSION GENERALE 139

ANNEXE 141

Les instruments classiques d'analyse pour la détection d'une espèce (bio)chimique sont généralement complexes, coûteux, volumineux et souvent difficiles à mettre en œuvre. De plus, les phases de préparation des échantillons, d'incubation, et d'exploitation des résultats augmentent souvent très fortement la durée totale d'analyse.

Depuis une trentaine d'années, ils font face à l'avènement des capteurs biochimiques appelés plus couramment biocapteurs [1]. Ceux-ci sont des dispositifs souvent simples et compacts transformant le signal (bio)chimique en un signal électrique facilement exploitable. Ils sont pour la plupart issus des techniques de la microélectronique. Ils sont en général seulement constitués d'une partie biosélective (couche sensible), et d'un système transducteur transformant en signal électrique les modifications physicochimiques induites par la reconnaissance dans la couche sensible. Ils disposent aussi d'un environnement d'exploitation qui permet notamment le traitement électrique des signaux.

Ces dernières années, le domaine des biocapteurs a connu un développement remarquable sous la pression de trois facteurs principaux:

- le besoin en capteurs fiables qu'entraîne la croissante sévérité des normes dans le domaine biochimique (pharmacie, monitoring médical);
- la généralisation de l'automatisation dans le génie des procédés;
- la recherche du moindre coût dans le domaine de l'analyse biomédical ou environnemental. L'utilisation des techniques de la microélectronique dans le domaine des biocapteurs permet en particulier d'envisager des productions massives à faible coût.

Cependant, l'intense activité de recherche n'a induit à ce jour que peu de réalisations commerciales, en raison de la sévérité des contraintes de la fonctionnalisation d'un transducteur par une molécule biospécifique. Mais les dernières barrières qui empêchent un développement commercial généralisé des biocapteurs ne vont certainement pas manquer de s'écrouler sous la forte pression

que constitue l'attrait d'un équipement d'analyse de taille réduite, permettant des tests simples et rapides, et nécessitant une préparation limitée des échantillons.

Les biocapteurs utilisent 3 grands types de biomolécules comme éléments de reconnaissance : les enzymes, les immunoespèces, et les acides nucléiques. Dans le cas des biocapteurs enzymatiques, la mesure de l'analyte se fait par détection d'un produit de la réaction chimique (impliquant l'analyte) provoquée par l'enzyme immobilisée, ou par détection d'une conséquence physique de cette réaction. Les biocapteurs basés sur des immunoespèces (immunocapteurs) détectent l'analyte par l'intermédiaire d'une des modifications physiques de la couche sensible, induites par la formation des complexes immuns (effets géométrie, de masse, modification de propriétés électriques…).

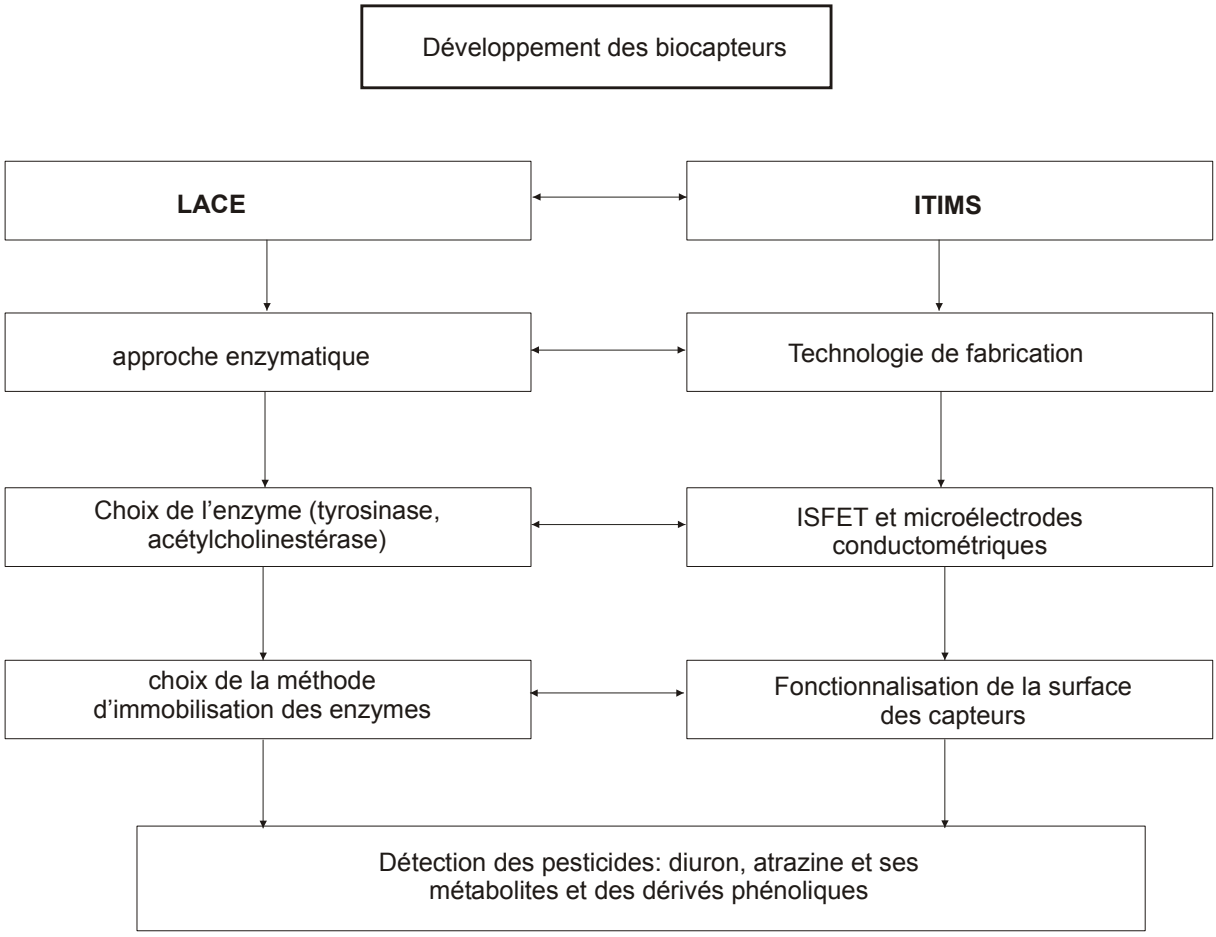


Figure* 1*. Diagramme du développement des biocapteurs au LACE et à l'ITIMS

Le but de ce travail a été de développer deux types de biocapteurs: les ISFETs (Ion Sensitive Field Effect Transistor) et des conductimètres en utilisant l'enzyme tyrosinase pour la détermination de polluants dans l'eau. La fabrication des capteurs a été réalisée à l'Institut International de Formation en Science de Matériaux (ITIMS)- Viet Nam. La mise au point de biocapteurs a été effectuée au Laboratoire d'Application de la Chimie à l'Environnement (LACE). Le développement des biocapteurs dans ce travail peut être schématisé par la figure 1.

Dans le premier chapitre, nous présenterons une étude bibliographique sur les biocapteurs. Nous présenterons ensuite, dans le deuxième chapitre, la fabrication des ISFETs et des capteurs conductimétriques à l'ITIMS. Puis, nous décrirons dans le troisième chapitre le principe de fonctionnement de ces capteurs.

La mise au point d'un capteur ISFET à base de tyrosinase, immobilisée par la méthode de co-réticulation avec l'albumine de sérum bovin (BSA) en présence de glutaraldéhyde, pour la détection de dérivés phénoliques sera discutée dans le chapitre 4. Dans le dernier chapitre nous allons présenter la détection de l'atrazine et du diuron en utilisant les capteurs conductimétriques. L'influence des interférences dans le milieu de mesure est enfin discutée.

Référence Bibliographique

[1]. Clark, L.C., and Lyons, C. (1962). Ann. N.Y. Acad. Sci. 102, 29

CHAPITRE 1.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES BIOCAPTEURS

TABLE DES MATIERES

	Les biocapteur	5
1.1.	Définition	6
1.2.	Les transducteurs	7
1.2.1.	Capteur thermique	7
1.2.2.	Capteur optoélectronique	10
1.2.3.	Capteur à effet piézoélectrique	12
1.2.4.	Capteurs électrochimiques	13
1.3.	Biorécepteurs enzymatiques	23
1.3.1.	Enzymes: les biocatalyseurs	24
1.3.2.	Classification des enzymes	24
1.4.	La cinétique enzymatique	26
1.4.1.	Cinétique enzymatique	26
1.4.2.	Activité enzymatique et concentration d'une enzyme	29
1.4.3.	La dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis de la température et du pH	30
1.5.	Les techniques d'immobilisation des enzymes	32
1.5.1.	L'adsorption	33
1.5.2.	L'inclusion ou piégeage	33
1.5.3.	Le couplage covalent	34
1.5.4.	La réticulation et la co-réticulation	34
	Conclusion	36

Les biocapteurs

Depuis le premier biocapteur développé par Clark et Lyon au début des années 1960s [1], la recherche sur leur développement a connu ces dernières années un effort considérable en raison de leurs nombreuses applications potentielles, que ce soit dans le domaine médical, agro-alimentaire, ou du contrôle environnemental. Dans ce dernier cas, les biocapteurs sont considérés comme une solution alternative particulièrement intéressante, aux techniques analytiques traditionnelles telles que la chromatographie ou la spectrométrie (la chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie liquide haute performance (HPLC), couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS), la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) ou encore la technique Inductively Coupled Plasma (ICP-MS). De plus, leur petite taille, leur facilité d'utilisation ou

encore la possibilité qu'ils offrent de réaliser des mesures sur site en font des outils particulièrement intéressants.

Ce chapitre présente les différents composants d'un biocapteur et son principe de fonctionnement.

1.1. Définition

Un biocapteur est un dispositif analytique conçu pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable. Il combine un composant biologique appelé "biorécepteur" et un "transducteur" représentant le mode de détection [2].

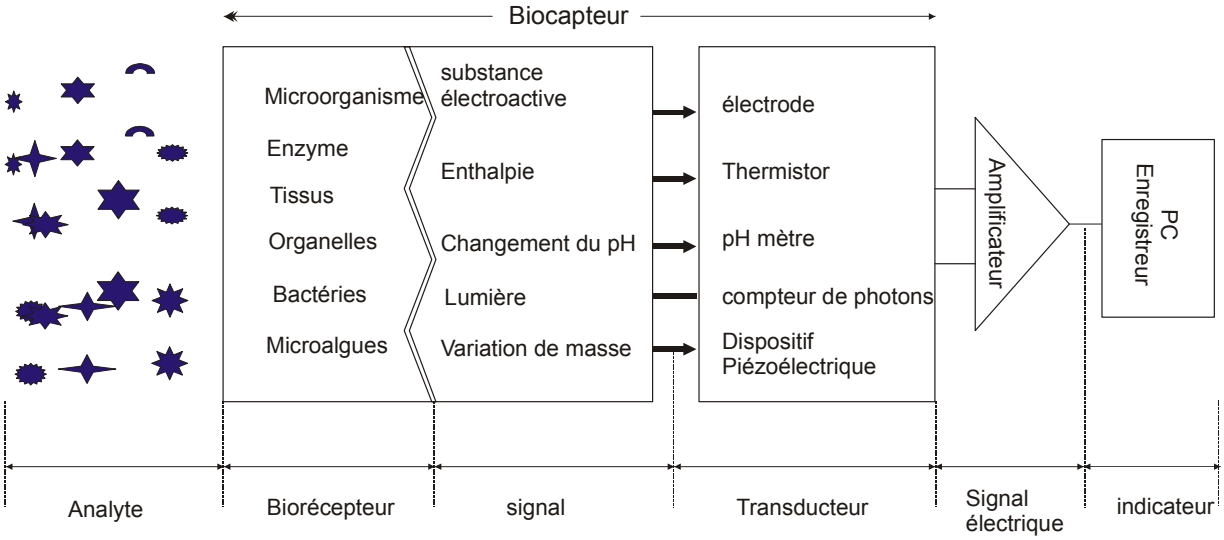


Figure 1.2. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur

La figure 1.1 présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans un échantillon, toute information utile à son évaluation. Cette donnée pourra être traitée, enregistrée, stockée pour utilisation ultérieure.

Le biorécepteur (enzymes, organites cellulaires, cellules, tissus…) catalyse des réactions biochimiques de substrats, ou interagit avec des structures complémentaires (antigène, anticorps, ADN ou récepteur-hormones) conduisant à des changements de propriétés physiques, chimiques ou optiques des substrats.

Quant au transducteur, il convertit ce changement en signaux électriques mesurables. Enfin, les signaux électriques sont amplifiés et traités par des circuits électroniques.

Les biocapteurs dits "biocapteurs d'affinité" sont fondés sur de simples interactions entre les analytes chimiques en solution et le biorécepteur. L'analyte à détecter n'est pas détruit.

Les biocapteurs dits "biocapteurs métaboliques" reposent sur une réaction spécifique entre l'analyte en solution et le biorécepteur. La molécule recherchée est alors dégradée. La diminution de la concentration d'un réactif ou la formation de produits est alors détectée [3].

1.2. Les transducteurs

Le transducteur est l'élément physique qui sert à exploiter la modification biochimique issue d'une interaction entre un analyte et le biorécepteur pour la transformer en signal électrique. Le type de transducteur sera choisi en fonction des modifications biochimiques se produisant au niveau du biorécepteur. Cette adéquation entre le transducteur et l'élément biologique permettra d'obtenir un signal sensible, facilement exploitable et avec un minimum de bruit de fond. Plus le bruit de fond sera faible, plus il assurera un seuil de détection bas et améliorera les performances du biocapteur [2,3]. Cette étude est principalement consacrée aux biocapteurs à base d'enzymes.

1.2.1. Capteur thermique

Les capteurs thermométriques appelés aussi capteurs enthalpimétriques sont destinés à déterminer la concentration d'un substrat par la variation d'enthalpie associée à la réaction enzymatique [4]. Cette méthode fait essentiellement appel aux réactions exo ou endothermiques. Le changement de température, ΔT, est déterminé par un microcalorimètre et est relié aux variations d'enthalpie, ΔH, et la capacité de chaleur du réacteur, Cp par la relation suivante:

$$\Delta T = \frac{n\Delta H}{C_P} \tag{1.1}$$

avec n étant le nombre de moles de substrat ayant réagit.

Pour ce type de biocapteur, il n'est pas nécessaire de mesurer le produit de la réaction, seule la chaleur dégagée au cours de la réaction est utilisée dans la mesure. Les enthalpies molaires de certaines réactions enzymatiquement catalysées sont présentées dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1. Enthalpies de certaines réactions catalysées par une enzyme [5]

Enzyme	**No. E.C**	**Substrat**	**-ΔH (KJ.mol-1)**
Uréase	3.5.1.5	Urée	6,6
Trypsine	3.4.21.4	Benzoyl-L-arginine amide	27,8
Uricase	1.7.3.3	Acide urique	49,1
β-lactamase	3.5.2.6	Pénicilline G	67,0
Lacta-déshydrogénase	1.1.1.27	Pyruvate	62,1
Hexokinase	2.7.1.1	Glucose	27,6
Glucose oxydase	1.1.3.4	Glucose	80,0
Cholestérol oxydase	1.1.3.6	Cholestérol	52,9
Catalase	1.11.1.6	H_2O_2	100,4

Dans des premières études sur les biocapteurs thermiques [6,7], l'enzyme (récepteur) était fixée directement sur un thermistor, puis ce capteur était plongé dans un échantillon. Les difficultés rencontrées au cours des mesures sont des bruits de fond provenant des variations thermiques du milieu.

Pour résoudre ce problème, Danielsson et ses collègues [8] ont développé un système de mesure dans lequel se trouvent deux capteurs, sur un des deux capteurs est immobilisée une enzyme et on suit le changement thermique créé par la réaction enzymatique par rapport à un autre capteur de référence qui ne porte pas d'enzyme. Dans ce cas, l'enzyme est immobilisée à l'intérieur d'un réacteur, qui se présente en générale sous la forme d'une colonne enzymatique [9], le thermistor est placé en dehors de cette colonne, figure 1.2. Les échantillons sont injectés dans les réacteurs par l'intermédiaire de micropompes situées à l'extérieur. Les perturbations thermiques dues à la convection sont limitées par une enveloppe en polyuréthane. Jusqu'à maintenant, cette structure est encore étudiée et en voie de développement.

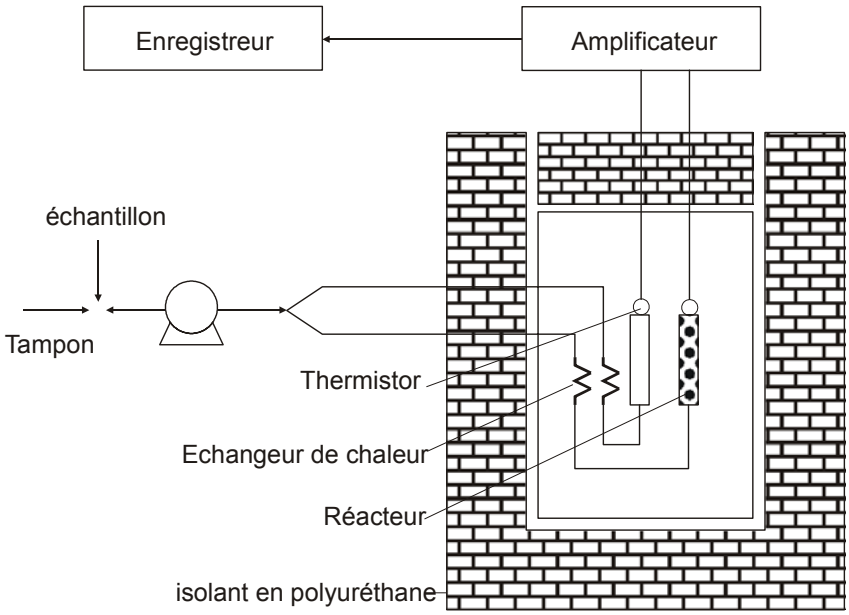


Figure 1.3. Schéma d'un biocapteur thermique (adapté de [10])

La plupart des biocapteurs thermiques trouvent leurs applications dans les domaines pharmaceutique et clinique pour la détection de la pénicilline [11-13], du glucose [11, 14-17]; l'application de ce type de capteur dans le domaine environnemental pour la détermination des métaux lourds et des pesticides est moins courante. Par exemple les travaux de Mattiasson, Preininger et Danielsson ont décrit la détection des ions de métaux lourds – Hg^{+2}, Cu^{+2} et Ag^{+} [18, 19] en utilisant l'uréase comme biorécepteur. De même, Mattisson et Danielsson ont détecté la présence de pesticides en utilisant l'acétylcholinestérase immobilisée dans la colonne. La concentration en pesticides est calculée par le changement de chaleur causé par l'inhibition de l'acétylcholinestérase par le pesticide [18].

Ces biocapteurs sont adaptés aux mesures en continu, et en outre ils ne sont pas sensibles à la lumière. Cependant, à cause de la difficulté à les mettre en œuvre, ces appareils sont très chers, ils ne sont pas couramment utilisés.

1.2.2. Capteur optoélectronique

La reconnaissance biologique à la surface du transducteur se traduit par des changements des propriétés optiques de celui-ci. Ces appareils sont constitués d'une ou plusieurs fibres optiques pour le rayon incident et pour le faisceau lumineux qui sera mesuré, figure 1.3.

Le principe de fonctionnement des capteurs à fibre optique sont décrits dans certains ouvrages [20; 21].

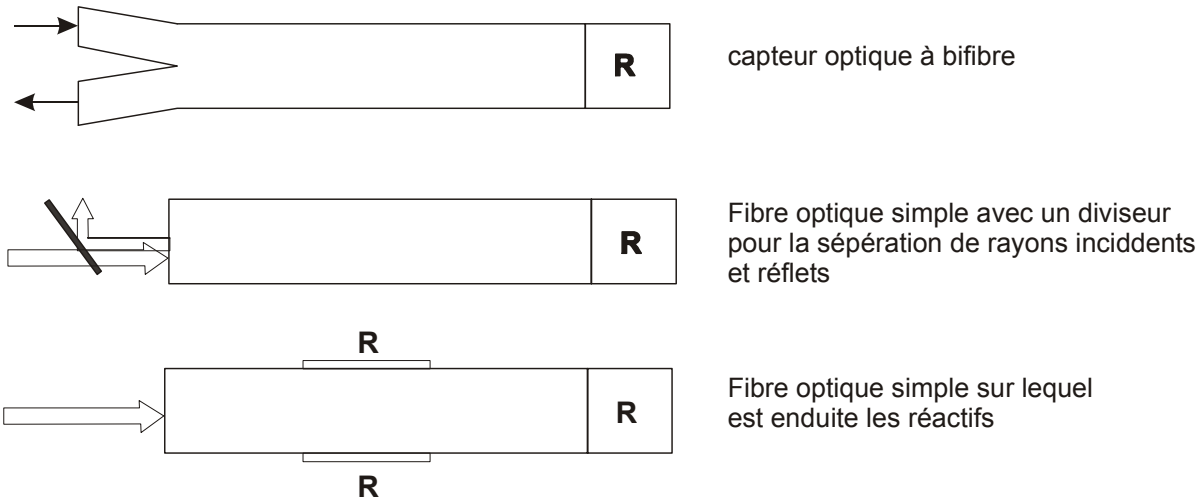


Figure 1.4. Schéma des capteurs optiques

Les capteurs à fibre optique se divisent en deux catégories:

- *les capteurs intrinsèque* qui mettent en jeu les caractéristiques propres de la fibre. Ce sont, par exemples, des capteurs interferométriques qui exploitent les changements de phase de la lumière transmise. Ces capteurs peuvent détecter les variations de pression, de température ou de champ magnétique.

- *les capteurs extrinsèques* qui utilisent un élément sensible externe à la fibre: par exemple, un réactif immobilisé dont l'interaction avec le composé à doser change ses propriétés optiques (l'absorption, la fluorescence et la chimi/bioluminescence). Dans ce cas, la fibre sert au transport de la lumière vers l'élément sensible et son retour vers l'appareil de mesure. Ce sont en général les capteurs extrinsèques qui servent de base à la réalisation de biocapteurs. La plus importante application de ce type de biocapteur à fibre optique est la détection des ADNs par des interactions entre des protéines [22-26].

Les biocapteurs à fibre optique sont également utilisés pour la détection des polluants en phase aqueuse. Les exemples des travaux sur ces capteurs sont donnés dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2. Exemples d'applications des biocapteurs optiques

Dispositif	changement de signal	élément immobilisé	Molécule à doser [limite de détection- ppm]	Réf.
Montage spécifique	Adsorption de lumière	AcChE	Captan, paraoxon [--]	27
LED	fluorescence	Uréase	Cu^{++}, Cd^{++}, Pb^{++}, Zn^{++}, Ni^{++}	28
Fibre Optique	Luminescence	Anti-Atrazine modifié	Atrazine [0,1]	29
RIFS	Interférence	Atrazine-acide caproïque	Atrazine [0,2]	30
Guide d'onde M-Z	Changement de phase	Atrazine-albumine	Atrazine [0,1]	31
Montage spécifique	fluorescence	Anti-2,4-D modifié	2,4-D [-]	32
"Resonant Mirror'	Changement de phase	Atrazine-albumine	Atrazine [-]	33
TIRF	fluorescence	DN1 ZABA IP5	2,4-D [0,7] Simazine [0,3] Isoproturon [0,1]	34

Abréviation dans le tableau 1.2 : LED: light emetting diode, RIFS: 'Reflectometric Interference Spectroscopy', M-Z: Mach-Zhender, TIRF: 'Total Internal Reflection Fluorescence', DN1:Dichloaniline-acide glutarique, ZABA: Atrazine-4-acide aminobenzoïque, IP5: 4-isopropylaniline.

Les biocapteurs à fibre optique offrent de nombreux avantages; ils ne sont pas influencés par le champ électrique, ils sont utilisables pour les mesures en continu, et ils maintiennent les propriétés chimiques des échantillons pendant la mesure, ils ne demandent ni signal de référence ni armature électrique. De plus, leur sensibilité est facilement adaptable à la gamme de mesure désirée. Mais ils sont perturbés par la lumière naturelle, ils sont alors normalement mis en œuvre à l'obscurité. Ce type de biocapteur permet de détecter de nombreux pesticides (cf. tableau 1.2) en utilisant des enzymes différentes. Toutefois, la gamme de détection de ces pesticides n'est pas encore très intéressante de l'ordre de la dizaine de ppm à la centaine de ppm. Il est nécessaire donc de les développer davantage pour une bonne application dans l'environnement.

1.2.3. Capteur à effet piézoélectrique

Les transducteurs piézoélectriques mesurent des variations de masse à leur surface. Le principe de ces transducteurs repose sur les propriétés piézoélectriques des matériaux utilisés. L'effet piézo direct correspond au phénomène qui a lieu lorsqu'un solide cristallin est soumis à une contrainte mécanique appliquée sur ses faces: la déformation du cristal s'accompagne d'une polarisation électrique dont l'amplitude est proportionnelle à la contrainte appliquée.

La piézoélectricité traduit donc l'interdépendance des propriétés électriques et mécaniques de certains matériaux. A l'inverse, si une différence de potentiel est appliquée entre les faces d'un matériau piézo, cela fait apparaître des contraintes au sein du matériau qui induit sa déformation: c'est l'effet piézo inverse, à la base du fonctionnement des transducteurs piézo.

L'application d'un champ électrique alternatif au sein d'un cristal de quartz provoque sa déformation, le cristal se met à vibrer et une onde acoustique est générée au sein du matériau. Quand le quartz est inséré dans un circuit électronique approprié, la vibration peut être entretenue. Des variations de masse à la surface du cristal vont modifier la fréquence de vibration selon l'équation Sauerbrey [35,36] et ces vibrations de fréquence (Δf) seront enregistrées.

$$\Delta f = -2.3 * 10^{-6} * F^2 \frac{\Delta m}{A} \qquad (1.2)$$

où f est la fréquence de résonance (en Hz), F la fréquence fondamentale du cristal (en Hz), Δm la variation de masse (en g), A la surface de l'électrode (en cm^2).

En général, le capteur à effet piézoélectrique comprend un cristal en quartz (généralement un disque de 10 à 16 mm de diamètre avec une épaisseur d'environ 0,15 mm), résonant à des fréquences différentes; 5, 9, 10 ou 15 MHz (QCR). On dépose, de part et d'autre de ce cristal, une couche mince métallique (argent, or ou aluminium) suivie d'une couche contenant le biorécepteur, comme par exemple un brin d'ADN [37].

P. Skádal a utilisé un capteur de ce type pour la détection du virus de l'hépatite type C. Son capteur utilise une électrode résonant à 10 MHz. Le biorécepteur utilisé ici

est un brin d'ADN [38]. En utilisant des électrodes similaires, d'autres auteurs se sont intéressés à détecter d'autres types de virus [39,40].

Ce type de capteur a également été utilisé pour la détermination des anti-gènes ou des anticorps. Ils fonctionnent à la suite de l'interaction entre les analytes de cibles et les biorécepteurs [41-45].

Dans les études de contrôle environnemental, les biocapteurs enzymatiques à effet piézoélectrique servent à détecter indirectement des pesticides ou des métaux lourds dans les eaux par inhibition de l'activité enzymatique en présence de ces polluants [46,47]. Par exemple le système utilisé dans le travail de Alexander Makower et ses collègues permet de détecter 2 ppm de DiisopropulFluoroPhosphate (DFP) [48].

1.2.4. Capteurs électrochimiques

Nous allons classer les capteurs électrochimiques selon leur mode de transduction: potentiométrique, conductométrique ou ampérométrique comme dans la figure 1.4.

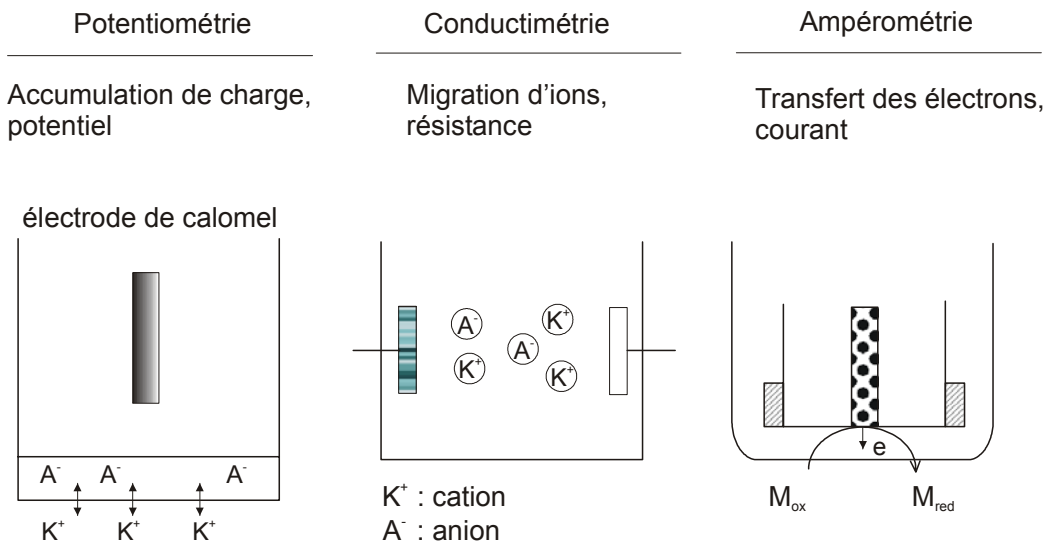


Figure 1.5. Détection électrochimique

Les capteurs pontentiométriques et ampérométriques sont les plus répandus mais il y a peu de travaux portant sur les capteurs conductimétriques. Toutefois, depuis les années 1980s, les capteurs conductimétriques commencent à être à leur tour de plus en plus utilisés compte tenu de leur facilité d'élaboration.

1.2.4.1. Capteurs ampérométriques

L'ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé. Elle est fonction de la concentration des corps électroactifs qui seront oxydés ou réduits à une électrode indicatrice, la seconde étant en général une électrode de référence. Il est donc possible, après étalonnage, de déterminer la concentration de certains corps présents, par la mesure de l'intensité.

Il existe trois générations de biocapteurs ampérométriques.

Dans la première génération de biocapteurs ampérométriques développé par L. Clark, l'analyte enzymatiquement généré est directement oxydé ou réduit au niveau de l'électrode. Par exemple dans le cas où le biorécepteur est la glucose oxydase (GOD), la réaction rédox du glucose est donnée par l'équation 1.3.

$$\beta.D-Glu\cos e+O_2+H_2O\xrightarrow{Glu\cos eoxydase}acide-gluconique+H_2O_2 \qquad (1.3)$$

D'après cette réaction on voit que, le capteur peut mesurer soit la consommation d'oxygène, figure 1.5.a. soit la production d'eau oxygénée, figure 1.5.b. [1,49]. De tels systèmes sont encore exploités et développés bien que certains problèmes persistent, figure 1.6.

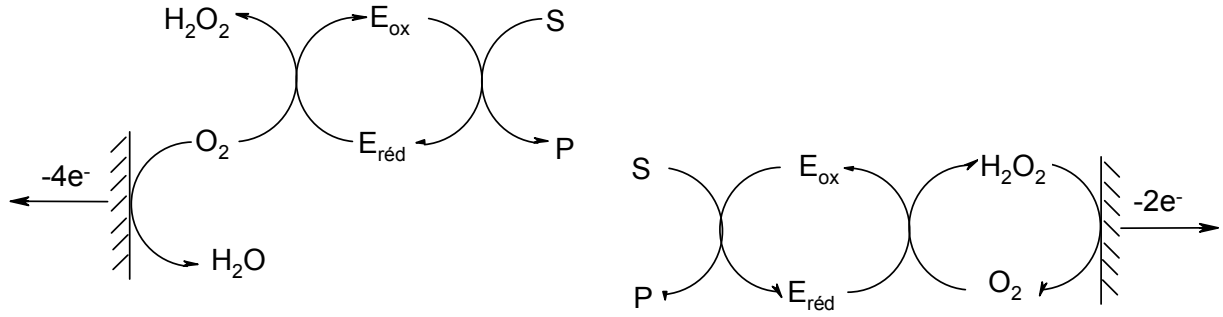


Figure 1.6. Capteurs ampérométriques de première génération

En effet, la réponse du biocapteur vis-à-vis du glucose est tributaire de la pression partielle en oxygène et de ses fluctuations. Quant à la mesure en eau oxygénée, de nombreuses substances électroactives comme l'acide ascorbique, l'acide urique, le glutathion ou les catécholamines sont aussi co-oxydées au potentiel anodique à + 0,65 V par rapport à l'électrode au calomel saturé (ECS), potentiel de l'oxydation de

H_2O_2. Cela interfère avec la réponse du biocapteur et se traduit par une mesure non sélective.

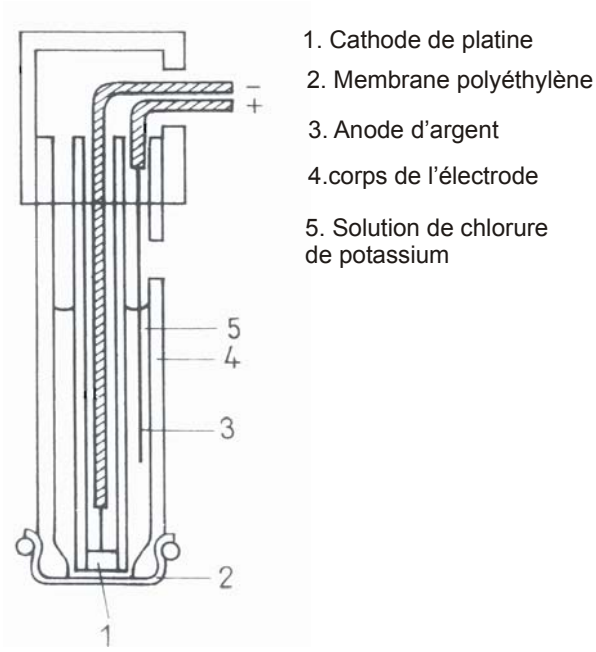


Figure 1.7. Schéma d'un biocapteur de type de Clark (adapté de [50])

La deuxième générations de biocapteurs ampérométriques, figure 1.7, a été développée pour réduire les phénomènes d'interférences en abaissant le potentiel de détection des espèces électroactives.

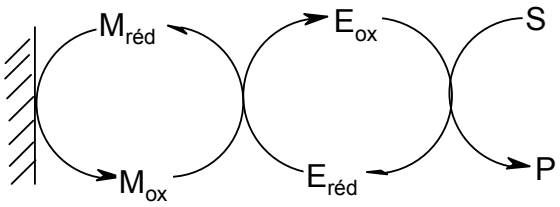


Figure 1.8. Biocapteur ampérométrique de deuxième génération.
M est le médiateur sous forme oxydée (ox)ou réduite(réd)

Pour ce faire on utilise des médiateurs rédox artificiels [51, 52] comme le ferrocène, les quinones, le ferricyanure, le phénazine-méthosulfate, le tétrathiafulvalène (TTF), et le tétracyanoquinodiméthane (TCNQ), figure 1.8. Ces médiateurs peuvent être simplement absorbés à la surface de l'électrode, emprisonnés dans les mailles du polymère [53,54], du sol-gel [55,56] ou greffés sur celui-ci.

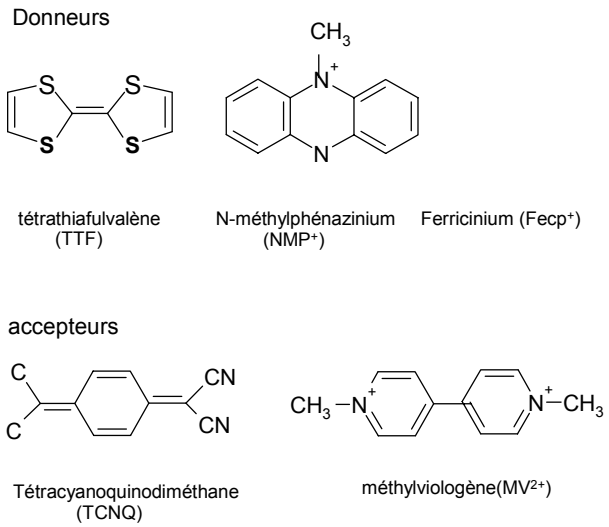


Figure 1.9. Médiateur sous forme réduite (donneur) ou oxydée (accepteur)

Enfin, une troisième génération de biocapteur est à l'étude, figure 1.9. Dans cette génération, l'enzyme est directement connectée à l'électrode afin de simplifier le transfert d'électrons. Ce système permet de système permet alors s'affranchir des problèmes d'interférences rencontrés lors de dosage dans des milieux complexe [57,58].

Très récemment L.A. Dang a présenté un nouveau copolymère conducteur multifonctonnel (juglone-co-juglone-3-acide thioacétique ou poly (JUG-co-JUGA)) permettant à la fois le greffage covalent des enzymes (Pyruvate Oxydase (PyOD)) et le transfert d'électrons entre les sites actifs de l'enzyme et l'électrode. Le biocapteur à pyruvate à base de ce copolymère JUG-co-JUGA peut fonctionner à 0,1 V/ECS, un potentiel faible pour que la réponse du biocapteur soit indépendante des interférences en solution conduisant à une bonne sélectivité du biocapteur [59].

Dans le même groupe que L.A. Dang, J. Haccoun a utilisé le même copolymère pour développer le biocapteur ampérométrique à base de la Lactase Oxydase (LOD) pour la détermination du substrat L-Lactate. Le biocapteur à base de ce copolymère conducteur travaillant à très faible potentiel d'oxydation -0,1 V/ECS (le plus bas que tous les médiateurs immobilisés utilisés jusqu'à présent) permet une gamme de détection relativement large de concentration en substrat (0,05 – 0,8 mM) avec une sensibilité très remarquable ($S=110 \pm 20$ $\mu A/mM/cm^2$). De plus, il est peu sensible à la présence d'oxygène en solution [60].

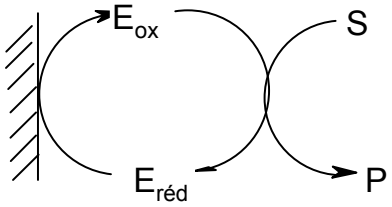


Figure 1. 10. Transfert d'électron du biocapteur enzymatique de troisième génération

L'ampérométrie est le mode le plus utilisé pour les biocapteurs enzymatiques. La majorité des dispositifs commercialisés [61-65] sont des électrodes ampérométriques.

De nombreux brevets ont été déposés sur ce type de biocapteurs et les applications sont très variables [66-69]. Des exemples de biocapteurs ampérométriques à base d'enzymes servant à la détection des polluants dans l'eau sont présentés dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3. Exemples des biocapteurs ampérométriques enzymatiques pour la détection des polluants.

Transducteur	**Enzyme inhibée**	**Produits détectés [limites de détection]**	**Réf.**
SPE (Screen-Printed Electrode)	AcChE BuChE	Organophosphorés [paraoxon 0,1 nM] Carbamates [carbofuran: 0,01 nM]	70 71
Micro-électrode de verre/ SCE/Electrode de Platine (Pt)	Tyrosinase	CP [3,4-dichlorophénol: 0,4 µM], carbamates [chloroisopropylphenylcarbamate] : 2µM, 3-chloroaniline: 2µM	72
Micro-électrode de verre/SCE/Pt		Organophosphorés [diazinon:5µM; dichlovos: 75 nM]	73
SPE (Screen-Printed Electrode)		Diéthyldithiocarbamate [2µM]; 4,6-dinitrocrésol [9µM], acide benzoïque [5µM], 2,4 D [5µM]	74
SPE		Atrazine [5 µM]	75
Micro-électrode de verre/SCE/Pt	Peroxydase	Thiourée [-], éthylènethiourée [-]	76
Electrode d'oxygène de type de Clark	PPD	Organophosphorés [Malathion: 5nM; parathion-méthyl: 2nM; paraoxon: 5nM]	77
Paire de Platine	ADDE	Dithiocarbamate [maneb: 5nM]	78

Abréviation dans le tableau 1.3: SCE: Standard Calomel Electrode, AcChE: cholinestérase, BuChE: ButyrylCholine Estérase, PPD: Phosphatase acide, ADDE: Aldéhyde déshydrogénase, CP: chlorophénol.

1.2.4.2. La détection potentiométrique

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence. La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à doser.

Dans ce type de système, un équilibre local est établi à la surface du capteur et conduit à la génération d'un potentiel proportionnel au logarithme de la concentration (activité) de l'échantillon selon la loi de Nernst (équation 1.4):

$$E_P = E^o_{Ox>\mathrm{Red}} + \frac{RT}{nF} * \ln \frac{a_{Ox}}{a_{\mathrm{Red}}} \qquad (1.4)$$

où E_P représente le potentiel du couple rédox; $E°_{Ox/Red}$ le potentiel normal standard du couple rédox; R la constante des gaz parfaits (8.314 $K^{-1}.mol^{-1}$); a_{Ox}/a_{Red} le rapport de l'activité de l'espèce déterminant le potentiel à l'état oxydé et à l'état réduit; T la température absolue en Kelvin.

Deux méthodologies sont utilisées. *La première* se sert d'une électrode de travail (ISE – Ion Selective Electrode) sur laquelle est fixé un biorécepteur et aussi d'une électrode de référence (une électrode au calomel par exemple). Le potentiel de l'électrode de mesure varie lorsque l'analyte réagit avec le biorécepteur. Les différents transducteurs sont l'électrode conventionnelle pour la mesure du pH [79-81], l'électrode à membrane sensible aux ions [82,83] et les électrodes sélectives aux gaz -pCO_2, pNH_3 [84,85].

L'emploi de transistors à effet de champ (FET-Field-Effect Transistor) constitue *le deuxième* volet des capteurs potentiométriques [86,87]. Ces transistors sont sensibles aux charges sur la surface d'une électrode, appelée grille. En modifiant cette grille en une ISE on obtient un ISFET (ion sensitive field effect transistor) sensible aux

ions. Ce principe a été extrapolé aux capteurs biologiques avec l'intégration d'enzyme; ils sont alors appellés ENFETs (Enzyme FET).

Il est admis que les avantages majeurs de la deuxième méthodologie par rapport à la première méthodologie sont des temps de réponse très cours (entre 5 à 10 minutes) contre 30 minutes environ pour les électrodes ISEs. Ainsi, le temps d'analyse en utilisant les capteurs de type FET est plus intéressant que celui en utilisant les ISEs conventionnelles [88]. De plus, la fabrication en masse des capteurs de type FET permet une fabrication moins coûteuse. Par ailleurs, les ISFETs sont robustes, ont une faible impédance de sortie, sont miniaturisable etc….[89]. Par exemple, le biocapteur à base d'ISFET en utilisant la butyrylcholine estérase décrit par Kai Wan permet de déterminer le trichlorfon à très faible contrentration (26 ppb) [90].

Quelques applications récentes des biocapteurs potentiométriques sont présentées dans le tableau 1.4.

Tableau 1.4. Exemples des biocapteurs potentiométriques appliquées dans le contrôle environnemental.

Transducteur	Enzyme inhibée	Produits détectés limites de détection	Réf.
Capteur pH à FET Electrode de pH modifiée	Organophosphoré hydrolase (OPH)	Organophosphorés Paraoxon: 1μM, Dichlorvos: 1 μM Paraoxon: 1μM	91 92
LAPS	Murine hybridoma clone (P6A7)	Terbuthylazine (TBA) 1,5 μg/l	93
LAPS	E. coli WP2	tryptophan: 0–12μM	94
Electrode de pH	Acétylcholinestérase (AcChE)	Dianizon: 0,2 nM	95
Electrode de pH modifiée	butyrylcholinestérase, choline oxydasse et peroxydase	trichlorfon: 2.10-4 nM	96

Abréviation dans le tableau 1.4; FET: effet de champs (Field Effect), LAPS: Light Addressable Potentiometric Sensor.

En 1996, Andrey L.G. et ses collègues ont présenté un biocapteur dans lequel est immobilisé un mélange de trois enzymes (la peroxydase de raifort EC 1.11.1.7, la choline oxydase EC 1.1.3.17, la choline oxydase EC 3.1.1.8) dans de la pâte de carbone et du polyéthèneimine sur l'électrode de travail sensible aux variations de pH. Une électrode de Ag/AgCl sert de référence. Dans la membrane de trois couches d'enzymes, une couche d'enzyme de BuChE en-dessus permettait d'empêcher la diffusion du substrat dans la membrane en solution et de libérer les produits de réaction vers l'extérieur de la membrane. Grâce à cela, d'après les auteurs, la sélectivité et la sensibilité du biocapteur seraient améliorées. Le système permettait de déterminer 0,0002 nM de trichlofon (soit 0,025 ppb). Le temps d'analyse est de 15 minutes et le biocapteur était très stable après 4 semaines au moins dans un tampon à 4°C [96]. Nous sommes très surpris de ces résultats remarquables. Toutefois, nous n'avons trouvé aucun résultat supplémentaire de cette équipe.

En conclusion les biocapteurs de type FET semblent plus intéressants que les capteurs de type ISE.

1.2.4.3. Les mesures conductimétriques

La conductimétrique est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie [97]. La conductimétrie permet de mesurer les variations (consommation ou production) d'espèces chargées générées au cours des réactions enzymatiques.

La conductance d'un corps est donnée par l'équation 1.5;

$$G = \gamma . \frac{A}{\lambda} \qquad (1.5)$$

la constante γ (en $S.cm^{-1}$) qui est la constante caractéristique d'un produit connu, est la conductance ou conductivité spécifique; A/λ (en cm) la constante géométrique de la cellule.

La mesure de la conductance d'un électrolyte s'effectue en immergeant dans la solution une cellule de mesure comprenant deux électrodes dont la surface A et la

longueur λ sont données. L'étalonnage ou le contrôle de la cellule sont effectués en mesurant sa conductance Ge pour un électrolyte de conductivité γ_e connue : k = Ge/γ_e. Lorsque l'on connaît la constante de conductivité de la cellule k, on peut déterminer la conductivité γ d'un électrolyte quelconque, en mesurant la conductance G de la cellule immergée dans cette électrolyte : $\gamma = G/k$.

La mesure de conductance est considérée comme relativement non-sélective. Cependant, des nombreux brevets récents montrent de nouvelles approches dans le développement des biocapteurs conductimétriques notamment dans le domaine biomédical pour la détermination du glucose dans le sang et l'urine. Par exemple un biocapteur proposé par *Toshiba Corp.* dans lequel on a mis une membrane semi-conductrice de polyacétylène dopé de sels d'iode entre deux électrodes. Dans ce biocapteur, un mélange de deux enzymes de glucose oxydase et de peroxydase ont été immobilisée sur cette membrane polymérique. En présence du glucose, la réaction catalysée par les enzymes conduit à un changement de conductance de la membrane [98]. Par ailleurs, la structure proposée dans le travail de Hu, K. W. J. et Vogelhut utilise une matrice de polypyrrole tetrachlororuthenate étalée sur une électrode en or dans laquelle est immobilisée du glucose oxydase [99]. Le biocapteur de Kuroda et Osaxa utilisant l'enzyme creanine deaminase permet [100] la détermination de la créatinine, un des paramètres qui permet d'estimer le fonctionnement de rein.

A., Senillou et N., Jaffrezic ont proposé une méthode intéressante d'immobilisation d'enzyme pour la détection de l'urée dans laquelle l'uréase est piégée dans un gel d'argile, la Laporite. Le mélange est ensuite coréticulée avec le poly(pyrrole-pyridinium) en présence de vapeurs de glutaraldéhyde. La membrane enzymatique est enfin déposée sur un capteur conductimétrique interdigité. L'avantage de cette méthode est de permettre une location précise de l'enzyme immobilisée sur l'électrode ce qui améliore la stabilité et le temps de stockage du biocapteur [101].

L'application des biocapteurs conductimétriques n'est pas limitée au domaine biomédical. P.C.J. Roach et al., ont réalisé un système comprenant une électrode en diméthyl silicone poreux (10x1 mm de diamètre-épaisseur chez ImmobaSil™, Ashy

Scientific, Coalville, Leics., UK) comme électrode de travail et deux électrodes de platine. On a immobilisée sur l'électrode de travail une membrane *Rhodococcus ruber NCMB 40757*, préparée par un mélange d'acétonitrile, d'hydrochlorure de thiamine, de pantothénate de calcium, d'hydrochlorure de pyridoxine, de *d*-biotine et d'un tampon KH_2PO_4, dans laquelle se trouve l'enzyme *nitrilase*. Le système permet une large gamme de détection très linéaire de l'acrylonitrile: 106 - 2650 ppm [102].

Le système développé par Zhylyak G.A et S. Dzyadevych permet quant à lui de déterminer les métaux lourds avec une gamme de détection très intéressante (Hg^{2+}: 1μM; Cu^{2+} : 2μM; Cd^{2+}: 5μM; Co^{2+}: 10 μM, Pb^{2+}: 20μM; Sr^{2+}:100 μM) en utilisant l'enzyme uréase [103].

On s'intéresse de plus en plus à développer ce type de capteur [104-108]pour la détection de polluants en milieu aqueux [109] car leur fabrication est beaucoup plus simple par rapport aux autres types de capteurs.

1.3. Biorécepteurs enzymatiques

Parmi les biorécepteurs, les enzymes sont très largement utilisées dans le domaine des biocapteurs. Elles sont des biocatalyseurs très spécifiques.

Tableau 1.4. Exemples d'enzymes inhibées par différents inhibiteurs [110]

<table>
<tr><th>Enzyme</th><th colspan="2">Inhibiteur</th></tr>
<tr><td>Cholinestérase, phosphatase alcaline, phosphatase acide, acylase, lipase, chymotrypsine</td><td>Insecticides</td><td>Carbamate et organophosphoré</td></tr>
<tr><td>Tyrosinase, acétolactate synthase, peroxydase</td><td>Herbicides</td><td>Sulfonylurées et Triazines</td></tr>
<tr><td>Aldéhyde déshydrogénase, tyrosinase</td><td>Fongicides</td><td>Dithiocarbamates</td></tr>
<tr><td>Cholinestérase, glycérol-3-phosphate déshydrogénase, L-lactate déshydrogénase, Leucine aminopeptidase, phosphatase alcaline</td><td rowspan="3" colspan="2">Métaux lourds (sel)</td></tr>
<tr><td>L-lactate déshydrogénase, uréase, glucose oxydase, Cholinestérase, phosphatase acide,</td><td>Cadmium</td></tr>
<tr><td>Uréase, L-glycérophosphate oxydase, pyruvate</td><td>Cuivre</td></tr>
</table>

oxydase, L-lactate déshydrogénase, glucose oxydase, invertase, cholinestérase, phosphatase acide	Mercure

Les réactions qu'elles catalysent sont relativement simples: l'hydrolyse, l'oxydation, la décarboxylation de liaisons peptides par exemple.
Les enzymes, jusqu'à maintenant, ont été employées dans les biocapteurs pour la détermination d'environ 80 substrats.

1.3.1. Enzymes : les biocatalyseurs

L'enzyme est une molécule protéinique de structure très complexe constituée d'acides aminés formant des chaînes reliées par des liaisons peptidiques.
Les enzymes jouent le rôle de biocatalyseur et assure le déroulement de toutes les réactions métaboliques. Les enzymes accélèrent 10^3 à 10^6 fois la réaction correspondante qui se déroulerait spontanément. En abaissant l'énergie d'activation de la réaction qu'elle catalyse, une enzyme abaisse le niveau énergétique de l'état de transition et accélère ainsi la réaction. Les enzymes ont une stéréospécificité tellement forte qu'elles effectuent des réactions leur permettant de choisir parmi des différents énantiomères ou de discriminer d'autres groupes pratiquement identiques entre eux.

1.3.2. Classification des enzymes

Les enzymes sont répertoriées en 6 catégories [111] : 1- les hydrolases ; 2- les oxydoréductases ; 3-les transférases ; 4-les lyases; 5-les isomérases et 6 –les liages.
1) les hydrolases scindent divers composés. Elles peuvent se distinguer par
a) - les protéases
   i. les peptidases qui agissent spécifiquement sur les peptides et leurs dérivées mais aucune action sur les protéines;
   ii. les protéinases qui scindent les protéines en chaînes polypeptidiques et en polypeptides;
b)- les estérases qui agissent sur les esters

i. les lipases hydrolysent les esters de la choline ou de la glycérine ou des acides gras;
ii. les phosphatases libèrent l'acide phosphorique de certains esters;
iii. les sulfatases hydrolysent les esters sulfuriques;
iv. les aminases libèrent de l'ammoniac à partir de certaines amines.

c)- les carbohydrases s'attaquent aux glucides. Certaines décomposent les glucides de faible poids moléculaire, d'autres fragmentent les polysaccharides

2) les oxydoréductases sont des enzymes qui transfèrent des électrons, seuls ou accompagnés de protons, d'un donneur à un accepteur, celui-ci peut être de l'oxygène. Dans ce groupe, on différencie 3 catégories:

i. les oxydases oxydent un substrat à l'aide de l'oxygène de l'air;
ii. les peroxydases oxydent les substrats aux dépens des peroxydes, de sorte qu'il ne se dégage jamais d'oxygène dans ces réactions;
iii. les déshydrogénases libèrent l'hydrogène du substrat (donneur) et peuvent le transférer à diverses molécules qui jouent le rôle d'accepteurs comme l'oxygène par exemple.

3) les transférases sont des enzymes (transaméthylase, transcétolase, etc.) qui catalysent le transfert d'un radical, d'un donneur à un accepteur. Le groupe transféré peut être très variable : carboxyl, méthyl, amine, groupement p hosphoré….

4) les lyases catalysent la formation d'une double liaison sur un substrat en déplacement un groupe chimique. La double liaison peut s'établir entre deux atomes de carbone ou avec un atome différent : O, S, N, ou halogène…

5) les isomérases catalysent des réarrangements intramoléculaires. Ces derniers peuvent concerner une stéréoisomérie (forme cis- transformée en trans-), aussi bien qu'une conversion d'un aldéhyde en cétone.

6) les ligases sont des enzymes utilisant l'énergie fournie par l'ATP pour catalyser certaines réactions de synthèse, notamment dans le processus de réparation de l'ADN, pour assurer la fixation covalente d'un brin néoformé.

Les réactions enzymatiques se déroulent dans une "crevasse" asymétrique de la molécule, appelée *site actif*. La conformation et la composition chimique du site actif

fixent la spécificité de la réaction catalysée par l'enzyme. On peut concevoir théoriquement le site actif comme composé d'un *site de liaison*, comprenant les acides aminés venant au contact du substrat, et d'un *site catalytique* composé des résidus jouant le jeu du mécanisme catalytique. Mais, fixation du substrat et rupture de ses liaisons jouent toutes deux un rôle inséparable dans la catalyse enzymatique.

1.4. La cinétique enzymatique.

1.4.1. Cinétique enzymatique

La cinétique enzymatique traite de la vitesse des réactions enzymatiques, fournissant une information indirecte sur le mécanisme d'une réaction, sur la spécificité de l'enzyme ainsi que sur d'autres paramètres précisant les propriétés physiques.

Une réaction enzymatique est caractérisée par ses constantes de vitesse. Prenons comme exemple l'hydrolyse de l'acétate d'éthyle qui est une réaction d'ordre un:

$$CH_3COOC_2H_5 + H_2O \longleftrightarrow CH_3COOH + C_2H_5OH \qquad (1.6)$$

A chaque instant, la vitesse de la réaction est proportionnelle à sa concentration et l'on peut écrire (équation 1.7):

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = k[S] \qquad (1.7)$$

Où [S] est la concentration de l'acétate à chaque instant t; k est la constante de vitesse -d[S]/dt, représente la vitesse de la réaction d'hydrolyse.

Si la réaction est directe on peut calculer la constante de vitesse k en intégrant l'équation suivante:

$$\frac{d[S]}{[S]} = -kdt \qquad (1.8)$$

à un moment t, une concentration x de l'acétate est consommée. Sa concentration à ce moment est égale donc à $[S_o]$- x avec $[S_o]$ la concentration initiale en acétate *;* on a:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{[S_o]}{[S_o] - x} \tag{1.9}$$

En 1913, L. Michaelis et M. Menten ont proposé une théorie pour décrire les réactions enzymatiques. Dans leur théorie, les réactions enzymatiques se déroulent en deux étapes: d'abord, un complexe enzyme-substrat (E-S) se forme rapidement, puis le complexe est lentement converti en produit. Dans l'étape limitante de la réaction on admet que l'enzyme (E) et le substrat (S) restent à tout moment en équilibre thermodynamique avec le complexe E-S. Le schéma cinétique est alors le suivant:

$$E + S \underset{}{\overset{K_s}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P \tag{1.10}$$

La première forme de l'équation Michaelis-Menten permet d'exprimer la vitesse de la réaction en fonction des concentrations de l'enzyme et du substrat.

$$v = k_{cat} * \frac{[E_t][S]}{K_S + [S]} \tag{1.11}$$

où [S] la concentration du substrat

$[E_t]$ la concentration de l'enzyme qui est reliée aux concentrations d'enzyme libre [E] et de complexe enzyme-substrat [ES] par l'équation ;

$$[E]_t = [E] + [ES] \tag{1.12}$$

K_S est la constante de dissociation du complexe ES, ou complexe Michaelis-Menten et est représentée par:

$$K_S = \frac{[E]*[S]}{[ES]} \tag{1.13}$$

k_{cat} la constante catalytique

Cette forme générale de l'équation Michaelis-Menten rend compte de nombreuses réactions enzymatiques. Mais, la condition implicite d'équilibre thermodynamique ne s'appliquent pas à toutes les réactions enzymatiques ; dans une deuxième forme de l'équation de Michaelis-Menten, il a été considéré la constantes de vitesse de

chaque étape de la séquence de réactions, ou *constantes de vitesse microscopiques,* pour la formation aussi bien que pour la disparition du complexe E-S, on obtient :

$$E + S \underset{k_3}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \tag{1.14}$$

L'expression de la vitesse dans la deuxième forme de Michaelis-Menten est présentée par l'équation 1.15.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \tag{1.15}$$

où V_{max} la vitesse maximale de la réaction qui ne dépend plus de la concentration du substrat. V_{max} est défini, dans ce cas, par l'équation 1.16

$$V_{\max} = k_2[E]_t \tag{1.16}$$

K_M la *constante Michaelis-Menten* qui est donné par l'équation 1.17

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \tag{1.17}$$

Cette équation de Michaelis-Menten est utilisée pour décrire l'état stationnaire. L'état stationnaire de la concentration du complexe E-S est atteint très rapidement, après quelques millisecondes de contact entre E et S.

Une troisième forme de l'équation de Michaelis-Menten est utilisée dans laquelle l'on postule la formation d'un complexe covalent entre l'enzyme et le substrat (ES'), avec d'une consommation du substrat (*x*).

$$E+S \overset{K_S}{\rightleftharpoons} ES \underset{X}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} ES' \xrightarrow{k_3} E+P \tag{1.18}$$

L'équation qui décrit l'état stationnaire pour ES' est

$$\frac{d[ES']}{dt} = k_2[ES] - k_3[ES'] = 0 \tag{1.19}$$

Retenons que

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} \tag{1.20}$$

et la concentration totale de l'enzyme est $[E]_t = [E] + [ES] + [ES']$. Puis on a

$$E_t = [ES]\left[\frac{K_S}{[S]} + 1 + \frac{k_2}{k_1}\right] \tag{1.21}$$

La vitesse de formation du produit de la réaction est

$$v = k_2[ES] \tag{1.22}$$

En introduisant la valeur de [ES] de l'équation 1.21 dans l'équation 1.22, on obient la loi des vitesses à l'état stationnaire.

$$v = [E]_t[S]\left[\frac{(k_1k_2)/(k_2 + k_3)}{(K_Sk_3)/(k_2 + k_3) + [S]}\right] \tag{1.23}$$

L'équation est de forme identique à celle de Michaelis-Menten obtenue auparavant, d'où:

$$K_M = K_S\frac{k_3}{k_2 + k_3} \tag{1.24}$$

et:

$$k_{cat} = \frac{k_2k_3}{k_2 + k_3} \tag{1.25}$$

Les trois formulations de l'équation de vitesse de Michaelis-Menten illustrent un principe générale de portée essentielle: de la forme de l'équation de vitesse d'une réaction, on ne peut pas déduire quel est le mécanisme impliqué dans la réaction; des mécanismes différents peuvent présenter une cinétique identique.

1.4.1. Activité enzymatique et concentration d'une enzyme

Nous venons de montrer qu'à saturation, la vitesse de la réaction est indépendante de la concentration du substrat.

$$V_{\max} = k_{cat}[E]_t \tag{1.26}$$

Si la concentration de l'enzyme est exprimée en moles de sites actifs par litre (le produit de la concentration molaire de l'enzyme par le nombre de sites catalytiques d'une molécule), la constante de vitesse d'ordre un (k_{cat}) exprime le '*turnover*' de

l'enzyme. Il s'exprime par l'inverse du temps, *t*, et représente le nombre de molécules de substrat convertis en produit par unité de temps, pour une efficacité maximale de l'enzyme. L'inverse de la constante de vitesse catalytique ($1/k_{cat}$) nous donne le temps nécessaire à l'enzyme pour transformer une molécule de substrat. L'unité internationale d'enzyme est la quantité d'enzyme qui libère une micromole de produit par minute. Le nombre d'unité contenue dans un milligramme d'enzyme définit son activité spécifique.

1.4.3. La dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis de la température et du pH

Influence du pH:

On explique simplement la sensibilité au pH des activités enzymatiques par le fait que les substrats et les sites actifs des enzymes portent souvent des groupes fonctionnels acides ou basiques dont l'ionisation varie avec le pH. Ce dernier peut agir sur les paramètres cinétiques tels que k_{cat}, K_M et k_{cat}/K_M. Ces effets de pH et leur magnitude diffèrent d'une enzyme à l'autre (figure 1.10).

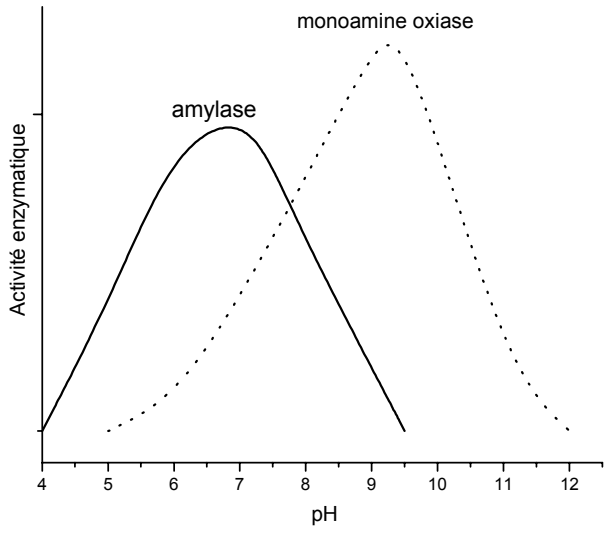
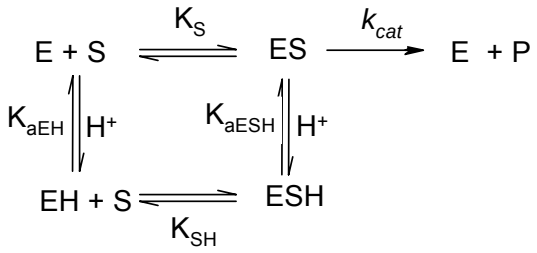


Figure 1.11. L'effet de pH sur deux enzymes différentes

Envisageons l'action des modifications de pH sur la cinétique suivante:



(1.27)

Ce schéma permet de prédire les observations cinétiques de trois types principaux:

1. Si le point dépendant du pH est la vitesse de conversion du complexe E-S en produit, k_{cat} sera influencée. La valeur de k_{cat} dépend, dans ces circonstances, du pK_a du complexe E-S, pK_{aESH}.
2. Le K_M peut varier avec le pH lorsque la dissociation du complexe E-S dépend du pH.
3. Lorsque k_{cat}/K_M varie avec le pH, la vitesse de la réaction dépendra des pK_a aussi bien de l'enzyme libre que du substrat libre. Si le substrat n'est pas ionisable, la variation est, dans la plupart des cas, un reflet assez fidèle du pK_a du site actif de l'enzyme libre.

Influence de la température

Il est connu que la vitesse de la plupart des réactions chimiques s'élève quand la température s'accroît. Les réactions enzymatiques n'échappent pas à cette règle. Une réaction dont l'énergie d'activation est d'environ 12 $kcal.mol^{-1}$ verra sa vitesse à peu près doublée en passant de 25 à 35^0C. Si l'énergie d'activation atteint environ 20 $kcal.mol^{-1}$, cette élévation de température peut jusqu'à tripler la vitesse de la réaction.

L'effet de la température sur la vitesse est illustré dans la figure 1.11 pour deux types d'une réaction avec et sans enzyme. Dans le cas de réaction enzymatique, la vitesse d'une réaction s'élève jusqu'à une valeur maximale, puis décroît rapidement, car la chaleur dénature l'enzyme, et la vitesse de sa dénaturation augmente avec la température.

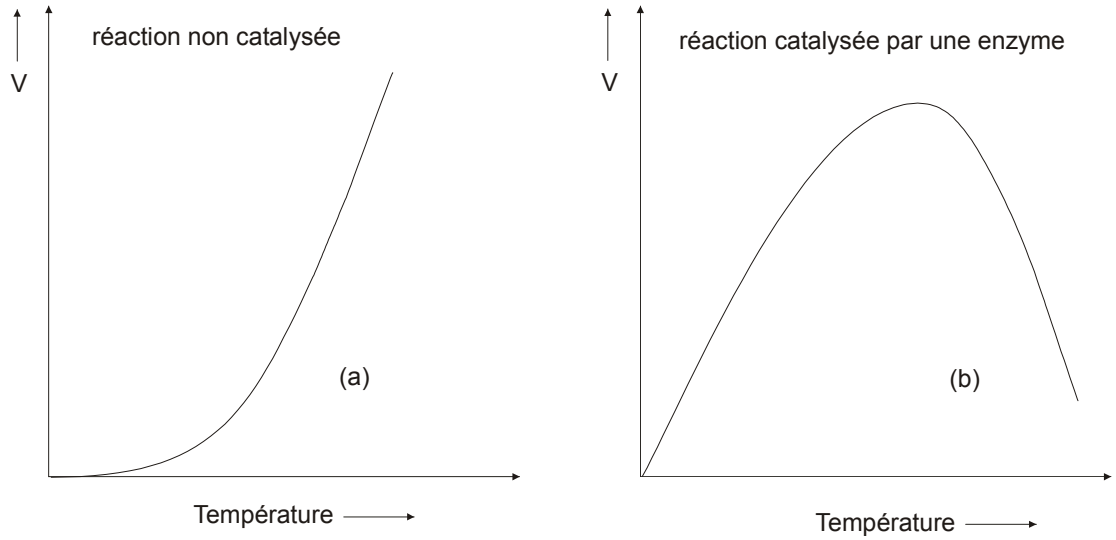


Figure 1.12. Effet de la température sur la vitesse d'une a) réaction non catalysée et b) une réaction enzymatique

Il faut donc optimiser les conditions d'utilisation d'une enzyme dans un environnement donné notamment les changements de pH et de température afin d'obtenir de résultats plus précis sur les composés à analyser.

1.5. Les techniques d'immobilisation des enzymes

L'immobilisation de l'élément biologique, en particulier celle des enzymes, au contact du transducteur ou placé dans une position optimale vis-à-vis du transducteur (par exemple une fibre optique n'est pas forcément en contact avec le biorécepteur mais elle doit être alignée avec celui-ci), est nécessaire à une bonne détection du signal biochimique issu du biorécepteur. Les enzymes peuvent être immobilisées par des méthodes chimiques et/ou physiques. Les qualités demandées à la membrane enzymatique sont nombreuses:

i. stabilité: la capacité à conserver l'activité de l'enzyme pendant un temps nécessaire pendant les mesures;
ii. sélectivité: l'aptitude de l'enzyme à reconnaître un seul analyte défini;
iii. reproductibilité: l'aptitude de l'enzyme à retrouver l'activité initiale après des mesures;
iv. sensibilité: la capacité à détecter une concentration faible de l'analyte;
v. accessibilité de l'espère de reconnaissance: la capacité de l'analyte de passer facilement à travers la couche sensible vers l'enzyme.

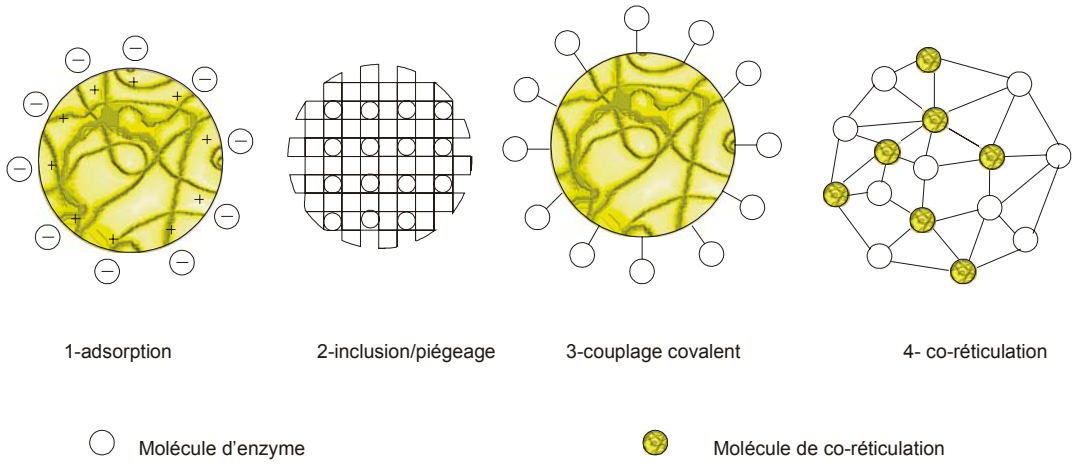


Figure 1.13. Exemples de méthodes d'immobilisation d'enzyme

Plusieurs méthodes d'immobilisation permettent de réaliser une association biorécepteur-transducteur n'empêchant pas l'accès du polluant au biorécepteur [112, 113]. Ces méthodes d'immobilisation (figure 1.12) sont résumées dans les paragraphes suivants.

1.5.1. L'adsorption

L'adsorption est due à des interactions de type ionique, hydrophobe ou encore des liaisons hydrogène entre l'enzyme et la surface du transducteur, figure 1.12.1, par l'intermédiaire d'un matériau actif. Les matériaux actifs peuvent être des résines échangeuses d'ions anionique ou cationique, du charbon de bois actif, des gels de silice, de l'argile, de l'oxyde de l'aluminium, du verre poreux ou des céramiques [114]. Cette technique permet une immobilisation simple et non dénaturante de l'enzyme. Malgré sa simplicité de mise en œuvre, elle demeure peu utilisée pour la conception des biocapteurs parce que les enzymes immobilisées peuvent facilement se désorber sous l'action des variations de pH, de la température, de la concentration en substrat ou de la force ionique [115]. La stabilité et la durée de vie des biocapteurs sont donc diminuées.

1.5.2. L'inclusion ou piégeage

La méthode d'inclusion consiste à incorporer l'enzyme dans un gel insoluble. Ce gel peut être constitué d'une matrice organique (polymère)[116-118] ou inorganique (argiles)[119]. Dans les deux cas, l'enzyme est mélangée au matériau, puis déposé à

la surface d'un biocapteur sous certaines conditions, figure 1.12.2. L'enzyme se trouve piégée mécaniquement à l'intérieur des matrices polymériques ou inorganiques. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention de l'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat jusqu'au site actif de l'enzyme grâce à une porosité du gel suffisante. Toutefois cette technique est parfois limitée par la taille des pores du gel qui favorise le relargage des enzymes de faible poids moléculaire. L'activité de l'enzyme est dépendante du micro-environnement local de l'enzyme immobilisé (pH, force ionique, diffusion moléculaire, etc.)

1.5.3. Le couplage covalent

Le couplage covalent d'enzyme sur un transducteur nécessite la présence d'un groupement fonctionnel sur la surface de celui-ci, figure 1.12.3. Ces groupements sont en général –COOH, -NH_2, -OH, ou –SH ; ils sont peu réactifs chimiquement et il convient de les activer pour qu'il réagissent dans des conditions douces avec des groupements fonctionnels de l'enzyme, n'intervenant pas dans le processus de reconnaissance moléculaire. On peut aussi procéder à la silanisation de support portant des groupements M-OH pour changer la nature des groupements de surface.

1.5.4. La réticulation et la co-réticulation

La réticulation consiste, à l'aide d'un argent réticulant, à créer des liaisons chimiques qui renforcent la cohésion de la membrane, figure 1.12. 4. Quant à la co-réticulation, elle est basée sur le même principe que la réticulation en utilisant à la fois un argent réticulant et une protéine inerte pour faciliter ou améliorer la réticulation. L'utilisation de cette protéine permet, par une meilleure répartition des masses des différentes protéines, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues. Cependant, à cause de la réaction chimique, une perte d'activité enzymatique de la membrane co-réticulée peut être observée pendant les mesures.

Le choix de la technique d'immobilisation dépend du type d'élément biologique utilisé (enzyme, cellule entière…), du transducteur et de l'environnement dans lequel le biocapteur fonctionne. Il dépend aussi des stabilités mécaniques et chimiques de la matrice et de son coût. La 'meilleure' technique, d'après Bowers, n'existe pas [120].

Malgré la perte de l'activité de l'enzyme due à l'altération chimique des sites catalytiques de la protéine observée pour la méthode d'immobilisation par co-réticulation nous avons utilité cette méthode pour fixer la tyrosinase sur un ISFET et un capteur conductimétrique. En effet, cette méthode est facile à mettre en œuvre, elle offre des bonnes liaisons chimiques pour les biomolécules et une bonne stabilité des édifices obtenus.

Conclusion

Malgré le coût relativement important des enzymes, de nombreux biocapteurs enzymatiques ont été développés en laboratoire et certains ont été commercialisés. Chaque type de biocapteur comporte des points forts et des points faibles. Le manque de stabilité durable de ces capteurs est souvent le plus problématique.

Le nombre important d'enzymes commercialement disponibles a contribué au développement des biocapteurs enzymatiques. Leur contribution permet d'élargir l'application des biocapteurs dans des domaines différents.

Nous avons décidé d'utiliser deux types de capteurs, ISFET et conductimétrique, sur lesquels est immobilisée la tyrosinase. Ces capteurs ont été appliqués à la détection des polluants dans l'eau.

La fabrication de ces deux types de capteurs sera discutée dans le prochain chapitre.

Références

[1]. Clark, L.C., Lyon, C., *Electrode system for continuous monitoring of cardivascular surgery*. Ann. NY Acad. Sci. 102(1962) 29-45.

[2]. Tran-Minh, C., 1991, *Les biocapteurs. Principes, constructions et applications,* Masson, Paris.

[3]. Comtat, M., Bergel, A., *Biocapteurs: rêve ou réalité indistruelle?* Biofur. 171 (1997) 33-36

[4]. Kumaran Ramanathan, Bengt Danielsson, *Review. Principles and applications of thermal biosensors*, Biosens. Bioelectron.16 (2001)417-423

[5]. Frieder Scheller and Florian Schubert, *Biosensors: Techniques and instrumentation in analytical chemistry*. Vol. 11: 1992: Elsevier.11.

[6]. Weaver J., Cooney C., Fulton S., Schüder S. and Tannenbaum S., Biochim. Biophys. Acta 452(1976)285

[7]. Smith A.G. and Brooks C.J.W., J. Steroid Biochem. 7(1976)705.

[8]. Danielsson et al., Appl.Biochem.Bioeng., 3(1981)97

[9]. Matiason B.O., Danielsson B. and Mosbach K., *Enzyme thermistor assay of cholesterol glucose, lactose and uric acid in standard solutions as well as in biological samples*. Anal. Letters 9(1976)217-234

[10]. Danielsson B., Matiason B.O., and Mosbach K., Appl. Biochem. Bioeng. 3(1981)97

[11]. Danielsson B., and Flygare L., *Performance of a Thermal Biosensor in Organic Sovents*. Sens. Actuators Bl (1990) 523-527

[12]. Rank M., and Danielsson B.**,** *Implementation of a thermalbiosensor in a process environment: on-line monitoring of penicillin V inproduction-scale fermentations*. Biosens. Bioelectron. 7 (1992) 631-635

[13]. Bin Xie and Danielsson B., *Development of a thermal micro-biosensor fabricated on a silicon chip*. Sens. Actuators B, 6 (1992) 127-130

[14]. Xie Bin and Ren Shu, A versatile tizermal biosensor, *Sensors and Actuators, 19 (1989) 53 - 59*

[15]. Kumaran Ramanathan, B.R. Jönsson, Danielsson B., *Sol-gel based thermal biosensor for glucose*. Anal. Chim. Acta 427 (2001) 1-10

[16]. Harborn U., Xie B., Venkatesh R., Danielsson, B., *Evaluation of a miniaturized thermal biosensor for the determination of glucose in whole blood*. Clin. Chim. Acta 267(1997) 225-237.

[17]. Ramanathan K., Jönsson R., Danielsson B., *Sol-gel based thermal biosensor for glucose*. Anal. Chim. Acta B 427(2001)1-10.

[18]. Mattiasson, B., Danielsson, B., Hermannsson, C., Mosbach, K., *Enzyme thermistor analysis of heavy metal ions with use of immobilized urease*. FEBS Lett. 85(1978) 203-206.

[19]. Preininger, C., Danielsson B., *Thermometric determination of copper (II) using acid urease*. Analyst B. 121(1996) 1717-1720.

[20]. Brecht, A., Gauglitz G., *Optical probes and transducer*. Biosens. Bioelectron.10 (1995)923-936

[21]. Bilitewski U., Turner A.P.F., *Biosensor for environmental monitoring*. (Eds.) 2000 Amsterdam, Harwood Academic Publishers.

[22]. Mengsu Yang, Hing Leung Chan, Wing Lam, W.F. Fong, *Cytotoxicity and DNA binding characteristics of dextran-conjugated doxorubicins*. Biochimica et Biophysica Acta 1380(1998) 329-335

[23]. Scheper T., Bückmann A. F., *A Fiber Optic Biosensor based on Fluorometric Detection using Confined Macromolecular Nicotinamide Adenine Dinucleotide Derivatives*. Biosens. Bioelectron. 5 (1990) 125-135

[24]. Per-Olof Markgren, Maria T. Lindgren, Karl Gertow, Robert Karlsson, Markku Hämäläinen, and Danielson U. H., *Determination of interaction kinetic constants for HIV-1 protease inhibitors using optical biosensor technology*. Analytical Biochemistry 291 (2001) 207-218

[25]. Peter M. Schmidt, Christine Lehmann, Eckart Matthes, Bier Frank F., *Detection of activity of telomerase in tumor cells using fiber optical biosensors*. Biosens. Bioelectron. 17 (2002) 1081-1087

[26]. Bo Lin, Jean Qiu, John Gerstenmeier, Peter Li, Homer Pien, Jane Pepper, Brian Cunningham, *A label-free optical technique for detecting small molecule interactions*. Biosensors and Bioelectronics 17 (2002) 827-834

[27]. Jeong-Woo Choi, Young-Kee Kim, Byung-Keun Oh, Sun-Young Song, Won Hong Lee, *Optical biosensor for simultaneous detection of captan and organophosphorus compounds*. Biosens. Bioelectron. 18 (2003) 591-597

[28]. Hsiao-Chung Tsai, Ruey-An Doong, Huai-Chih Chiang, Kun-Tien Chen, *Sol–gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals*. Anal. Chim. Acta. 481 (2003) 75–84

[29]. Oroszlan P., Duveneck G.L., Ehrat M., Widmerr H.M., *Fiber-optic atrazine immunosensor*. Sens. Actuators B. 11(1993)301-305

[30]. Brecht A., Piehler J., Lang G., *A direct optical immunosensor for atrazine detection*. Anal. Chim. Acta. 311(1995)289-299.

[31]. Schipper E.F., Bergervoet A.J.H., Kooyman R.P.H., Greve J., *New detection method for atrazine pesticides with the otical wave guide Mach-Zehnder immunosensor*. Anal. Chim. Acta. 341(1997)171-176

[32]. Meusel M., Trau D., Katerkamp A., Meier F., Polzius R., Camman K., *New ways in bioanalysis. One-way optical sensor chip for environmental analysis*. Sens. Actuators B. 51(1998)249-255.

[33]. Skládal P., Deng A., Kolar V., *Resonant mirror-based optical immosensor: application for the atrazine measurement in soil*. Anal. Chim. Acta. 399(1999)29-36

[34]. Barzen C., Brecht A., Gauglitz G., *Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control*. Biosens. Bioelectron. 17(2002)289-295

[35]. G. Sauerbrey, J. Phys., 155(1959)206

[36]. Ader J.F. and Mc Callum J.J., *Piezoelectric crystal for mass and chemical measurements*. Analyst 108(1983)1169-1189

[37]. Per Dannemand Andersen et al., *Sensor foresight-technology and market*. Technovation 24 (2004) 311–320

[38]. Petr Skládal et al., *Piezoelectric biosensors for real-time monitoring of hybridization and detection of hepatitis C virus*. Journal of Virological Methods 117 (2004) 145-151

[39]. Erich Uttenthaler, Conrad Köblinger, Stephan Drost, *Quartz crystal biosensor for detection of the African swine fever disease.* Anal. Chim. Acta 362 (1998) 91-100

[40]. Xiaodong Zhou, Lijia Liu, Min Hu, Leilei Wang, Jiming Hu, *Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 27 (2002) 341–345

[41]. Tombelli S., Mascini M., Turner A.P.F., *Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on goldcoated piezoelectric quartz crystals.* Biosensors and Bioelectronics 17 (2002) 929-936

[42]. Minunni M., Mascini M., Carter R.M., Jacobs M.B., Lubrano G.J., Guilbault G.G., *A quartz crystal microbalance displacement assay for Listeria monocytogenes.* Anal. Chim. Acta 325 (1996) 169-174

[43]. Carter R.M., Mekalanos J.J., Jacobs M.B., Lubrano G.J., Guilbault G.G., *Quartz crystal microbalance detection of vibrio cholerae 0139 serotype*. Journal of Immunological Methods 187 (1995) 121-125

[44]. Babacan S., Pivarnik P., Letcher S., Rand A.G., *Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application*. Biosens. Bioelectron. 15 (2000) 615-621

[45]. Gi-Ho Kim, Garth Rand A., Stephen V., *Letcher. Impedance characterization of a piezoelectric immunosensor part II: Salmonella typhimurium detection using magnetic enhancement*. Biosens. Bioelectron. 18 (2003) 91-99

[46]. Sara Tombelli, Marco Mascini, Cristiana Sacco, Anthony P.F. Turner, *A DNA piezoelectric biosensor assay coupled with a polymerase chain reaction for bacterial toxicity determination in environmental samples*. Anal. Chim. Acta 418 (2000) 1-9

[47]. Jiří Horáček, Petr Skládal, *Effect of organic solvents on immunoassays of environmental pollutants studied using a piezoelectric biosensor.* Anal. Chim. Acta 412 (2000) 37-45

[48]. Alexander Makower, Jan Hálámek, Petr Skládal, Frank Kernchen, Frieder W. Scheller, *New principle of direct real-time monitoring of the interaction of cholinesterase and its inhibitors by piezolectric biosensor.* Biosens. Bioelectron. 18 (2003) 1329-1337

[49]. Guilbault, G.G., and Lubrano G.J., *An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose.* Anal. Chim. Acta 64(1973)439-455

[50]. Freider Scheller and Florian Schubert, *Biosensors: techniques and instruments in analytical chemistry*. Vol. 11. 1992, Amsterdam: Elservier. 27.

[51]. Cass A.E.G., et al., *Ferrocene-mediated enzyme électrode for amperometric determination of glucose.* Anal.Chem. 56(1984)667-671

[52]. Turner A.P.F., S.P. Hendry and M.F. Cardosi, *Tetrathifulvaline: a new mediator for amperometric biosensor.* World Biotechnol. Rep.1 (1987) 125-127.

[53]. Heller A., *Electrical Connection of enzyme redox centres to electrodes*. J. Phys. Chem., 96(1992)3579-3587

[54]. Koide A., and Yokoyama K., *Electrochemical characterization of an enzyme electrode based on a ferrocene-containing redox polymer*. J.Electronal.Chem., 468(1999)193-201.

[55]. Pankratove I., and Lev O., *Sol-gel derived renewable surface biosensors*. J.Electronal.Chem., 393(1995)35-41

[56]. Walcarius A., *Analytical application of silica-modified electrode-a comprehensive review*. Electroanal. Vol. 10 No. 18 (1998)1217-1235.

[57]. Schuhmann, W., C. Kranz, J. Huber, and Wohlschlager H., *Conducting polymer based amperometric enzyme electrodes: towards the development of miniaturized reagentless biosensors*. Synth. Met. 61(1993)31-35.

[58]. Lötzbeyer, T., Schuhmann W., and Schmidt H.-L., *Electron transfer principles in amperometric biosensors: direct electron transfer between enzymes and electrode surface*. Sens. Actuat. B 33(1996)50-54.

[59]. Lan Anh DANG, *Recyclage d'enzymes oxydoréductases immobilisées sur un polymère conducteur transfert électronique par médiateur rédox et transfert direct*, Thèse de l'Université Paris 7-Denis Diderot. 2004: Paris, France.

[60]. Julien HACCOUN, *Conception et étude d'un biocapteur enzymatique compact à lactate à base de polymère conducteur électronique*, Thèse de l'Université Paris 7-Denis Diderot. 2004: Paris, France.

[61]. Matsushita Ltd (1984), *Quantitative determination of biochemicals with enzyme electrodes*. Japanese Patent Application JP 59217152.

[62]. Matsushita Ltd (1984b), *Biosensor*.Japanese Patent Application JP 59151052.

[63]. Matsushita Ltd (1985a), *Apparatus containing electrodes for determination of ions in fluid samples*. Japanese Patent Application JP 6025448.

[64]. Mitsubishi Ltd (1985e), *Measurement of glucose and a-amylase in a sample*. Japanese Patent Application JP 6093344.

[65]. Kessler, M. and Hoeper J., (1985). *Device for measuring the concentration of substances*. FRG Patent Application DE 3332745.

[66]. Klitgaard P. C. and Pedersen K. G., (1984). *An electrode device for transcutaneously measuring a blood gas parameter and for sensing a bioelectrochemical signal and electrode assembly comprising such an electrode device (Radiometer)*. European Patent Application EP 127148.

[67]. Corenman, J. E., New**,** W., Goodman, D. E. & Yelderman, M. (1985). *Perinatal Oximeter (Nellcor Inc.)*. European Patent Applicatjon EP 135840.

[68]. Kriebisch R., and Netz V., (1985). *Apparatus for measuring blood gas values*. GDR Patent Application DD 218188.

[69]. Chang J. J., and Ramsey M., (1985). *Retreated sensing electrode (Critikon)*. US Patent Application US 4499981.

[70]. Albareda M., Merkoçi A., Aleret S., *Pesticides determination in tap water and juice samples using disposable amperometric bionsensors made using thick-film technology*. Anal. Chim. Acta. 442(2001) 35-44.

[71]. Montesinos T., Pérez-Munguia S., Valdez F., Marty J-L., *Disposable cholinesterase biosensor for the detection of pesticides in water-miscible organic solvents*. Anal. Chim. Acta. 431(2001) 231-237.

[72]. Besombes J.L., Cosnier S., Labbé P., Reverdy G., *A biosensor as warning device for the detection of the cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides*. Anal. Chim. Acta. 311(1995)255-263

[73]. Everett W.R., Rechnitz G.A., *Mediated bioelectrocatalytic determination of organophosphorous pesticides with a tyrosinase-based oxygen biosensor*. Anal. Chem. 70(1998)807-810.

[74]. Wang J., Nascimento V.B., Kane S.A., Roger K., Smyth M.R., Angnes L., *Screen-printed tyrosinase containing electrodes for the biosensing of the enzyme inhibitors*. Talanta 43(1996)1903-1907.

[75]. McArdle F.A., and Persaud K.C., *Development of an enzyme-based biosensor for atrazine detection*. Analyst. 118(1993)419-423

[76]. Adeyoju O., Iwuoha E.I., Smyth M.R., *Teactivities, of amperométric organic phase peroxidase-modified electrodes in the presence and absence of thiourea and ethylenethiourea as inhibitors*. Anal. Chim. Acta. 305(1995)57-64

[77]. Mazzei F., Botrè F., Lorenti G., Simonetti G., Porceli F., Scibona G., Botrè C., *Plant tissue électrode for the determination of atrazine*. Anal. Chim. Acta 316(1995)79-82

[78]. Noguer T., and Marty J.-L., *High sensitive bienzymatic sensor for detection of dithiocarbamate funficides*. Anal. Chim. Acta, 347 (1997)63-70

[79]. Nilsson H., Akerlund A.C. and Mosbach K., *Determination of glucose urea and penicillin using enzyme-pH electrode*. Biochim. Biophysics. Acta 320(1973)529-534

[80]. Tor R., and Freeman A., *New enzyme membrane for enzyme electrodes*. Anal. Chem. 58(1986)1042-1046

[81]. Kulys J.J. et al., *Urea sensor based on differential antimony electrodes*. Biosensors 2(1986)35-44.

[82]. Stefanac Z., and Simon W. Chimica 20(1966)436

[83]. Simon W. GBF monographs 10(1987)13

[84]. Stow R. and Randall B. Am. J. Physiol. 33(1973)97

[85]. Mascini M., and Guilbault G.G., *Urea coupled ammonia electrode for urea determination in blood serum*. Anal. Chem. 145(1983)795-798.

[86]. Hafeman D.G., Parce J.W., and McConnell H.M., Science 240(1988)1182.

[87]. Lundström I., Phys. Scripta, 18(1978)424.

[88]. Campanella L., Colapicchioni C., Favero G., Sammartino M.P., Tomassetti M., *Organophosphorus pesticide (Paraoxon) analysis using solid state sensors*. Sens. Actuators B33 (1996) 25-33

[89]. Jean-Marc CHOVELON, *Préparation de couches minces d'oxynitrure de silicium par PECVD en vue de greffage chimique. Application à un ISFET pH, spécialité électronique*. 1991, Thèse de l'Ecole Centrale de Lyon: Lyon, France

[90]. K. Wan, J.M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, *Enzyme-octadecylamine Langmuir-Blodgett membranes for ENFET biosensors*. Talanta 52 (2000) 663-670

[91]. Schöning M.J., Krause R., Block K., Musahmehc M., Mulchandani A., Wang J., *A dual amperometric/potentiometric FIA-based biosensor for the distinctive detection of organophosphorus pesticides*. Sens. Actuators B 95 (2003) 291-296

[92]. Priti Mulchandani, Ashok Mulchandani, Irina Kaneva, Wilfred Chen, *Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. 1. Potentiometric enzyme electrode*. Biosens. Bioelectron. 14 (1999) 77-85

[93]. Lucia Mosiello, Cristina Laconi, Maddalena Del Gallo, Claudia Ercole, Aldo Lepidi, *Development of a monoclonal antibody based potentiometric biosensor for terbuthylazine detection*. Sens. Actuators B 95 (2003) 315-320

[94]. Atsushi Seki, Kazunari Kawakubo, Mitsuhiro Iga, Satoshi Nomura, *Microbial assay for tryptophan using silicon-based transducer*. Sens. Actuators B 94 (2003) 253–256

[95]. Hye Sung-Lee, Young A Kim, Young Ae Cho, Yong Tae Lee, *Oxydation of organophosphorus pesticides for the sensitive detection by a cholinesterase-based bioisensor*. Chemosphere, 46 (2002) 571-576.

[96]. Andrey L. Ghindilis, Tatyana G. Morzunova, Anatoly V. Barmin and Ilya N. Kurochkin, *Potentiometric biosensors forcholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis*. Biosens. Bioelectron. vol. ll, No. 9(1996) 873-880

[97]. Bard A. J., L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, 1980. J. Willey & Sons

[98]. Hu, K. W. J. & Vogelhut, P. 0. (1985), *Polymer catalyst transducers and their use in test kits for analytical methods (Miles)*. European Patent Application EP 140322

[99]. Toshiba Corp. (1985). *Method and apparatus for the quantitative determination of glucose in blood and urine*. Japanese Patent Application JP 6095343.

[100]. Kuroda, M. & Osawa, H. (1985), *Enzymic determination of creatinine in body fluids for diagnosis of kidney function (Fuji)*. Japanese Patent Application JP 60151560.

[101]. Senillou A., N. Jaffrezic, Martelet C., Cosnier S., *A laponite clay-poly(pyrrole–pyridinium) matrix for the fabrication of conductimetric microbiosensors*. Anal. Chim. Acta 401 (1999) 117-124

[102]. Roach P.C.J., Ramsden D.K., Hughes J., Williams P., *Development of a conductimetric biosensor using immobilized Rhodococcus ruber whole cells for the detection and quantification of acrylonitrile*. Biosens. Bioelectron. 19 (2003) 73-78

[103]. Zhylyak, G.A., Dzyadevich, S.V., Korpan, Y.I., Soldakin, A.P., Elskaya A.V., *Application of urease conductimetric biosensors for heavy metal ion determination*. Sens. Actuators B24-25(1995)145-148

[104]. Warakorn Limbut, Panote Thavarungkul, Proespichaya Kanatharana, Punnee Asawatreratanakul, Chusak Limsakul, Booncharoen Wongkittisuks, *Comparative study of*

controlled pore glass, silica gel and Poraver® for the immobilization of urease to determine urea in a flow injection conductimetric biosensor system. Biosens. Bioelectron. 19 (2004) 813-821

[105]. Frances H. Arnold, Weigong Zheng, Alan S. Michaels, *A membrane-moderated, conductimetric sensor for the detection and measurement of specific organic solutes in aqueous solutions*. Journal of Membrane Science 167 (2000) 227–239

[106]. Norman F. Sheppard, Jr & David J. Mears and Anthony Guiseppi-Elie, *Model of an immobilized enzyme conductimetric urea biosensor*. Biosens. Bioelectron. Vol. 11, No. 10(1996)967-979.

[107]. Piletsky S.A., Piletskaya E.V., Elgersma A.V., Yano K., and Karube I., *Atrazine sensing by molecularly imprinted membranes*. Biosens. Bioelectron.10 (1995)959-964

[108]. Samantha C. Pak, William Penrose, Peter J. Hesketh, *An ultrathin platinum film sensor to measure biomolecular binding*. Biosens. Bioelectron.16 (2001) 371-379

[109]. Alosilja, Evangelyn C., et al. (2003). Conductimetric biosensor device, method and system, United States Patent Application US O7449910

[110]. Bilitewski U., Turner A.P.F., *Biosensor for environmental monitoring*. Eds. 2000, Amsterdam ,Harwood Academic Publishers.

[111]. J. Stolkowski, *Les enzymes, Que sais-je ?* 6ème édition, 1983

[112]. W. Hartmeier., *Immobilized biocatalysts: An introduction*. 1988, Berlin, Springer-Verlag,

[113]. Mulchandani, A. and K.R. Rogers., *Principles of enzyme biosensors*. Dans: MulchandaniA., and K.R. Rogers., *Enzyme and microbial biosensors: techniques and protocols*. Eds. 1998 Totowa, Humana Press.

[114]. Frieder Scheller and Florian Schubert, *Biosensors: Techniques and instrumentation in analytical chemistry*. Vol. 11. 1992: Elsevier.51.

[115]. Car P.V., and Bowers L.D., *Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*. 1980: Willey, NewYork

[116]. Bratov A., Abramova N., Munor J., Carlos Domínguez, Alegret S., andBartrolí J., *Photocurable polymer matrices for potassium-sensitive ion selective electrode*. Anal. Chem. 67(1995)3589-3595

[117]. J. L. Marty, N. Mionetto and R. Rouillon, Anal. letters 25-vol 8(1992)1389-398

[118]. K.Wan, J.M Chovelon, N. Jaffrezic-Renault and Soldatkin A.P., *Sensitive detection of pesticide using ENFET with enzymes immobilized by cross-linking and entrapment method*. Sensors and Actuators B 58(1999)399-408

[119]. J.L. Besombes, Thèse de Doctorat de l'Université de Savoie, spécialité chimie (1994)

[120]. Bowers L.D., *Application of immobilized biocatalysts in chemical analysis*. Anal. Chem. 58 (1986)523-530.

CHAPITRE 2

FABRICATION DES CAPTEURS A ITIMS

TABLE DES MATIERES

	Introduction	44
2.1.	Fabrication des ISFETs	45
2.1.1.	Phase 1-préparation du substrat – SC	46
2.1.2.	Phase 2 – Oxydation	49
2.1.3.	Phase 3 – Formation d'anneau de garde	50
2.1.4.	Phase 4 – Formation Source/Drain	55
2.1.5.	Phase 5 – Formation de la porte	57
2.1.6.	Phase 6 – Pulvérisation de Tantale	58
2.1.7.	Phase 7 – Ouverture de trous de contact (contact hole)	69
2.1.8	Phase 8 – Oxydation Ta	61
2.1.9.	Phase 9 – Métallisation	61
2.1.10.	Les dernières étapes de fabrication des ISFETs	64
2.2.	Fabrication des microélectrodes	69
2.2.1.	Phase 1- Préparation du substrat – SC	70
2.2.2.	Phase 2 – Oxydation	70
2.2.3.	Phase 3 – Lithographie (technique 'Lift-off')	70
2.2.4.	Phase 4 – Pulvérisation cathodique	72
2.2.5.	Phase 5 – Retrait de la résine	72
2.2.6.	Encapsulation des capteurs conductimétriques	73
	Conclusion	74

Introduction

Depuis plusieurs années, la technologie microélectronique se développe et les produits fabriqués s'emploient aussi bien dans la vie quotidienne que pour des applications spécialisées. L'avantage le plus remarquable de cette technologie est la haute résolution obtenue grâce à la photolithographie qui est souvent utilisée pour définir des motifs à l'échelle du micron/ou inférieur dans le substrat permettant la diffusion des dopants, la métallisation, la gravure …

L'objectif de ce travail a été la fabrication et la mise au point de microcapteurs de type ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) et conductimétriques. Ces capteurs ont été comparés avec ceux existants préalablement (en Ukraine, et en Allemagne). L'objectif était d'avoir une source d'approvisionnement locale de façon

à pouvoir travailler de façon autonome et d'envisager éventuellement une commercialisation.

Une partie de ma thèse a donc été consacrée à la fabrication de ces deux types de capteurs.

2.1. Fabrication des ISFETs

La fabrication des ISFETs dans le cadre de cette thèse utilise la technologie SOG (Spin-On-Glass) [1, 2] pour la diffusion du phosphore permettant la formation de la source et du drain. Cette méthode diffère des techniques généralement utilisées, comme l'implantation ionique, mais présente l'avantage d'être moins onéreuse. Il nous reste néanmoins à confirmer qu'elle est adaptable à la fabrication des capteurs à l'ITIMS. D'autres techniques telles que l'oxydation, la gravure et la métallisation sont aussi employées et décrits en détail.

Les ISFET peuvent être fabriqués sur plusieurs types de substrats tels que les wafers de silicium, le verre en pyrex, et les céramiques. Dans notre cas, nous avons choisi les wafers de silicium type P (dopé au bore) orienté <100> dont l'épaisseur et la résistivité sont de 380 micromètres et 5Ω.cm respectivement.

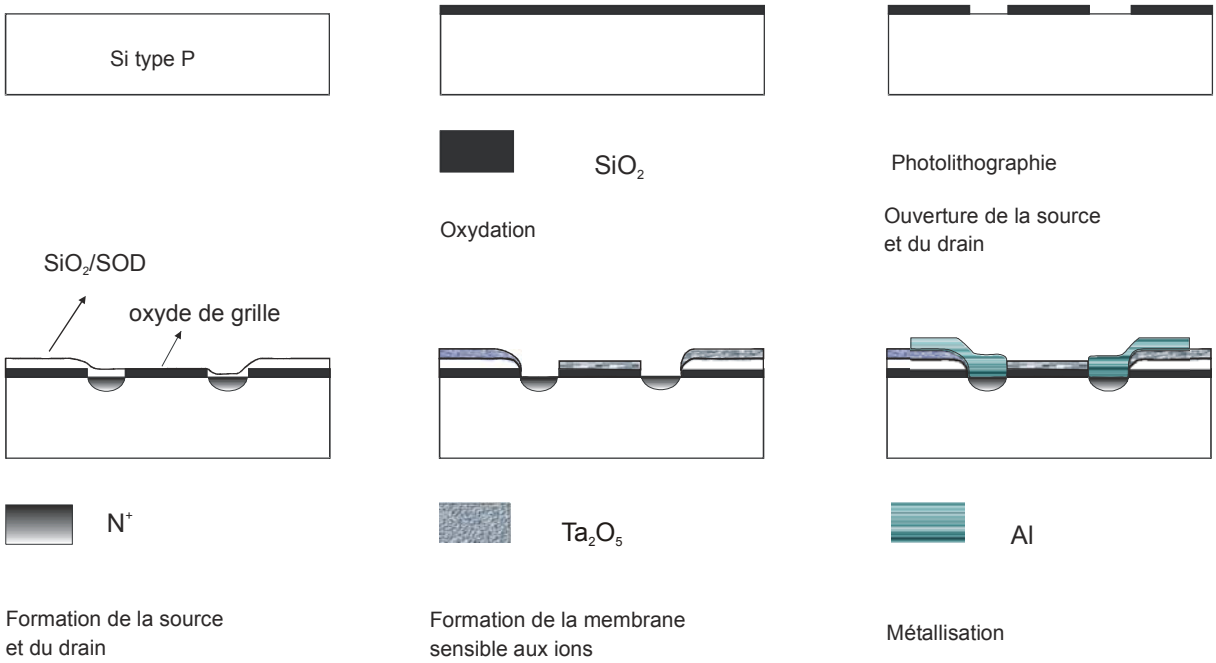


Figure 2.14. Schéma de la fabrication des ISFETs individuels

Les premiers essais de fabrication de capteur (première génération) ont été réalisés , en utilisant le matériau SOD (Spin On Dopant) et la technologie SOG, pour être utilisés en mode individuel c'est-à-dire un seul capteur sur une seule puce. Les principales étapes de fabrication de ces ISFETs sont décrites dans la figure 2.1. Malheureusement, nous avons rencontré des difficultés et des capteurs de mauvaises qualités ont été produits pour les raisons suivantes.

1. La qualité de la couche SiO_2 de la grille: dans la fabrication des ISFET (première génération) le phosphore diffusait dans le substrat de silicium formant les jonctions n-p. En même temps, poussait une couche d'oxyde de silicium (l'oxyde de grille) et les atomes du phosphore y diffusaient. Cela résulte d'une mauvaise qualité de la couche SiO_2 car pour avoir une bonne qualité de SiO_2 de la grille, elle ne doit pas être contaminée par les dopants.

2. La gravure du film de tantale: pour un bon contact de la source et du drain, avant la métallisation nous devons enlever le film de tantale et la couche d'oxyde de silicium contenant le SOD (cf. figure 2.1). La gravure a duré pendant 15 minutes et cela a produit un phénomène dit de "gravure latérale" qui a abîmé la forme de la grille et de la source et du drain défini par le masque [4].

Pour surmonter ce problème de la gravure nous avons imaginé une autre procédure pour la fabrication des ISFETs. La nouvelle procédure de la fabrication sera donc présentée. Pour cette fabrication, 5 masques et 9 phases seront nécessaires, figure 2.2. Elle permet, par ailleurs, de réaliser des capteurs pouvant fonctionner en mode différentiel (deux capteurs sur une seule puce).

2.1.1. Phase 1- Préparation du substrat –SC

On sait que les dispositifs microélectroniques sont très petits si bien qu'une seule poussière à la surface ou au milieu le circuit imprimé peut changer les propriétés du capteur et en même temps les endommager. C'est pourquoi la préparation du substrat joue un rôle très important dans toutes les étapes de la fabrication. Elle influence directement les résultats expérimentaux.

De même, les substrats peuvent être contaminés par des particules organiques et inorganiques. Ils risquent aussi de se re-contaminer pendant le stockage, les

manipulations et les étapes technologiques. Pour ces raisons ils convient de réaliser différents traitements pour la réalisation de ces capteurs dans ces conditions.

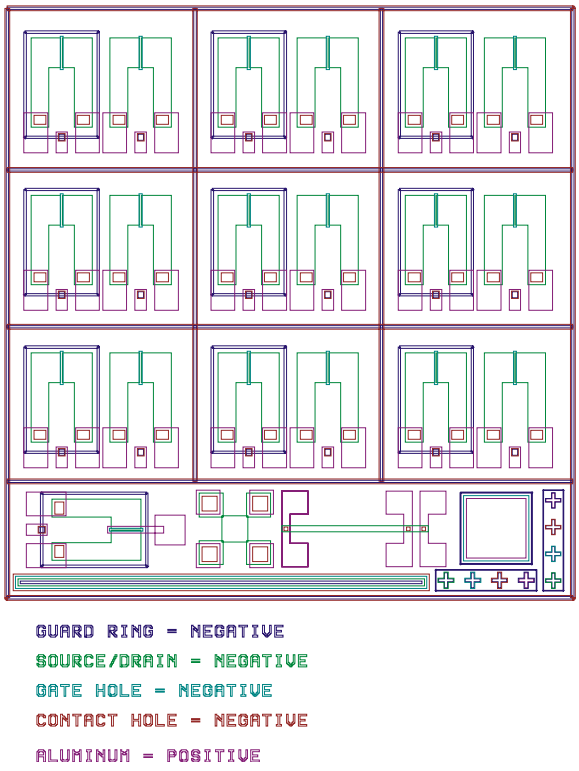


Figure 2.15.Suite de masques complets pour la fabrication des ISFET différentiels

La préparation du wafer commence par 1: une décontamination particulaire par un traitement physique ; 2: un traitement chimique.

Pour la décontamination particulaire nous avons utilisé le jet d'azote sec filtré suivi d'un jet d'eau déionisée.

Le traitement chimique de surface du substrat, peut s'effectuer soit par voie humide soit voie sèche (plasma, "ultra violet ozone cleaning" (UVOC)). Il implique la succession de 5 étapes élémentaires:

1. diffusion des réactants vers la surface à traiter
2. adsorption des réactants sur la surface à traiter
3. réaction chimique en surface
4. désorption des produits de la réaction
5. diffusion des produits de la réaction dans le milieu extérieur

Au cours de ces traitements, deux situations peuvent se rencontrer : 1. le traitement n'attaque que les contaminants de surface, 2. le traitement attaque également le

substrat (dans ce cas une rugosité de surface peut être générée). Dans notre étude, le traitement de surface s'est limité à la première situation.

En général, plusieurs recettes peuvent être appliquées pour traiter chimiquement la surface du wafer. On peut utiliser comme réactants des bains de détergents – Triton suivi d'un rinçage très soigneux à l'eau desionisée (DI), des bains à base de solvant organiques comme le trichloréthylène, l'acétone, le méthanol ou l'éthanol, ou des bains à base d'acide ou base forte additionnés d'un composé oxydant tels que le peroxyde d'hydrogène, l'anhydride chromique, le bichromate de potassium. Ces bains ont pour objectif d'éliminer les contaminants organiques. Pour enlever les contaminants inorganiques, les bains NH_4OH-H_2O_2-H_2O (1/1/5) ou les bains HCl-H_2O_2-H_20 ou HNO_3 dilué peuvent être utilisés.

Afin d'enlever les substances organiques, dans les conditions disponible à l'ITIMS, les wafers ont été immergés dans de l'acide nitrique (HNO_3) fumant à 98% pendant 10 minutes, puis ont été rincés dans de l'eau desionisée (DI) jusqu'à ce que la résistivité de l'eau DI atteigne 18 MΩ.cm à 25°C.

Ensuite les wafers sont à nouveau trempés dans de l'acide HNO_3 65% à 110°C pendant 10 minutes suivi d'un rinçage dans l'eau DI pendant 3-4 minutes pour éliminer les contaminants inorganiques.

Une solution d'acide fluorhydrique 1% permet ensuite d'éliminer la couche de dioxyde de silicium présente à la surface du wafer. Le traitement dure 1 minute et est suivi d'un rinçage à l'eau DI. Les étapes sont résumées ci-dessous.

Résumé des étapes de la phase 1

1. HNO_3 fumant (98%), 10 minutes
2. Rinçage à l'eau DI, 4 minutes
3. HNO_3 (65%), 110°C, 10 minutes
4. Rinçage à l'eau DI, 4 minutes
5. HF dilué (1%), 1 minutes
6. Rinçage à l'eau DI, 4 minutes

2.1.2. Phase 2 – Oxydation

Un film de dioxyde de silicium sur le substrat en silicium est indispensable dans certains cas. Le rôle de ce film est multiple 1) créer une barrière diélectrique entre les deux couches conductrice de la structure MOS (Metal Oxide Semiconductor), et ISFET 2) protéger les dispositif de toutes diffusion indésirables; 3) protéger contre les éraflures, l'humidité 4) éviter que durant la phase de fabrication de la source et du drain les atomes de dopant diffusent dans les régions autre que la source et le drain.



Figure 2.16. Four d'oxydation à l'ITIMS

L'oxydation va se faire dans un tube en quartz soit par voie sèche (sous oxygène) soit par voie humide (sous vapeur d'eau) à haute température (à partir de 850°C). Dans notre cas, nous avons choisi la voie humide et la réaction de formation de la couche de dioxyde de silicium est donnée dans l'équation 2.1. Cette réaction a lieu sous la vapeur d'eau à 1100°C pendant 2 heures et est suivi d'un recuit sous azote à 800°C pendant 30 minutes pour stabiliser la couche de SiO_2. Figure 2.3 illustre un four d'oxydation à l'ITIMS. L'épaisseur de la couche de SiO_2 est donné par Alpha Step 45x de TENCOR INSTRUMENT (USA) et est de 0,7 μm.

$$Si_{(solide)} + 2H_2O_{(vapeur)} = SiO_{2(solide)} + 2H_2 \qquad (2.1)$$

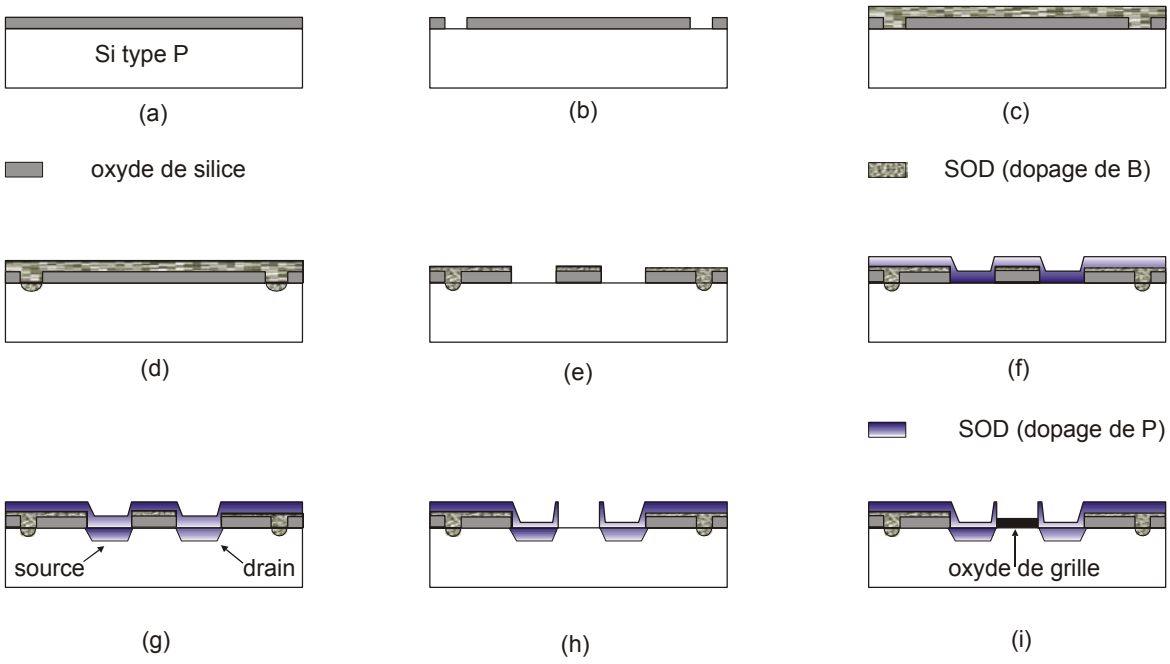


Figure 2.17. Phase 1 à 5 de la procédure de fabrication des ISFET

Résumé des étapes de la phase 2

1. T= 1100°C, vapeur d'eau, t= 120 min
2. Recuit sous azote, T=800°C, t=30 min, figure 2.4-a

2.1.3. Phase 3-formation d'un anneau de garde (guard-ring)

L'anneau de garde a pour fonction d'empêcher un courant de fuite entre deux puces, "courant chip à chip" en créant une jonction P^+-P. Pour les premiers types de capteur ISFET devant fonctionner en mode individuel, cette étape n'est pas obligatoire.

En revanche, pour la deuxième génération de capteur devant fonctionner en mode différentiel (deux capteurs sur la même puce) cette étape sera indispensable.

Les principales étapes pour cette phase seront

1. Ouverture de l'anneau de garde
2. Dopage au bore pour former une jonction P^+-P

1. ouverture de l'anneau de garde

Pour l'ouverture de l'anneau de garde, nous avons utilisé une technique nommée "photolithographie". Le but de la photolithographie est de réaliser des motifs dans la couche mince déposée sur le substrat. Il y a deux techniques pour la photolithographie: l'une dite classique et l'autre dite 'Lift-off'.

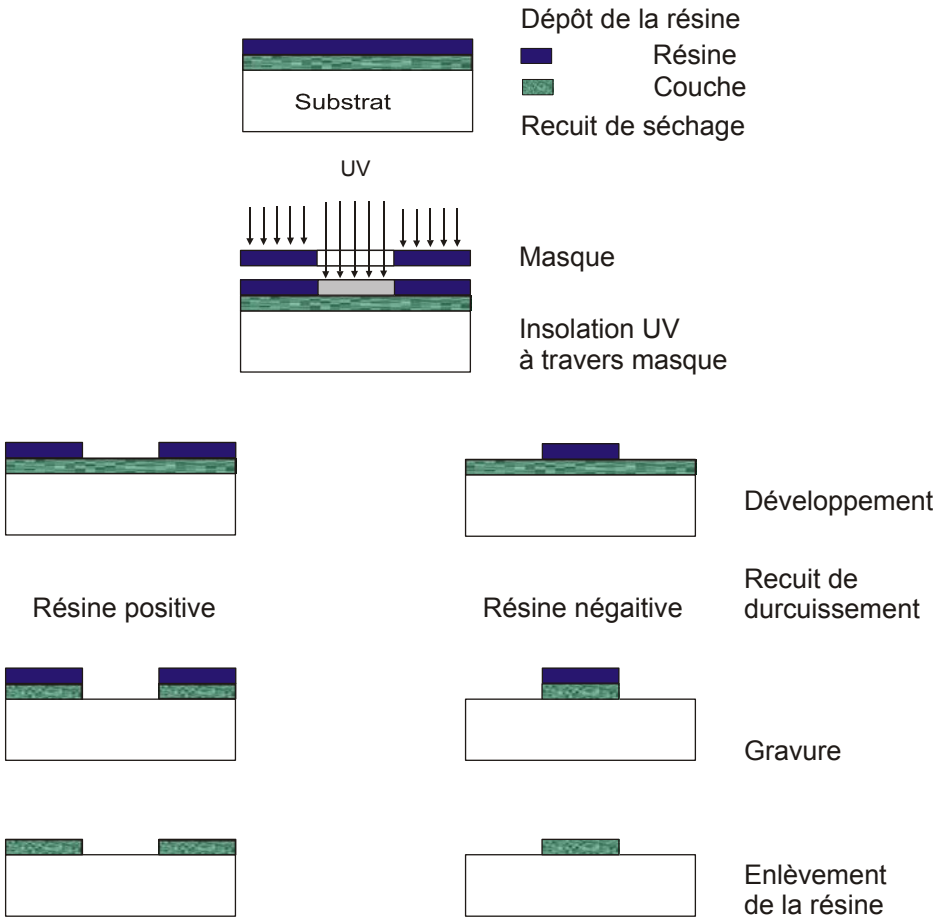


Figure 2.18. Schéma de la photolithographie classique

Dans la photolithographie dite classique, un film de résine photosensible est déposé sur la couche mince (cf. figure 2.5). Après insolation aux UV, le développement se fait par une solution Tetra Methyl Ammomium Hydroxide (2%): H_2O (1:1). Le film de résine est recuit à 120^0C pendant 30 minutes. Après le recuit, la résine est protégée en toute sécurité contre l'attaque de l'acide HF ou le mélange de $H_3PO_4/CH_3COOH/HCl$ qui est utilisé pour graver la couche mince formant les motifs désirés. Grâce à ce film de résine d'autres dispositifs sur le wafer peuvent rester sans être endommagés.

Quant à la technique 'Lift-off', elle utilise un film de résine photosensible qui est déposé directement sur le substrat. Une procédure spéciale d'exposition et de développement permet d'obtenir un 'profil inversé' des motifs de résine qui sont utilisés comme masques pour le dépôt de la couche mince. Cette technique sera discutée dans la phase 3 de la fabrication des capteurs conductimétriques.

Une photolithographie dite classique exige la mise en œuvre des opérations décrites ci-dessous.

1. Préparation du substrat (cf. traitement chimique)
2. Etalement de "primer" par 'spin coating' (un solvant organique fourni avec la résine de SHIPPLEY) pour améliorer l'adhésion de la résine sur le substrat, 4000 rpm, 10 secondes
3. Etalement de la résine: spin coating 4000 rpm, 10 secs
4. Premier recuit, T= 90°C, t=15 minutes
5. Insolation, UV, t= 20 secs
6. Développement (Tetra Methyl Ammomium Hydroxide 2%)
7. Second recuit, T= 120°C, t=30 min

L'étalement de la résine se fait par spin-coating : le substrat est fixé par aspiration sur la tête d'une tournette (spinner) puis quelques gouttes de résine sont déposées sur le substrat. L'étalement, dans ce cas, se fait avec une vitesse de rotation rapide (4000 tours par minute pendant 30 secondes par exemple).

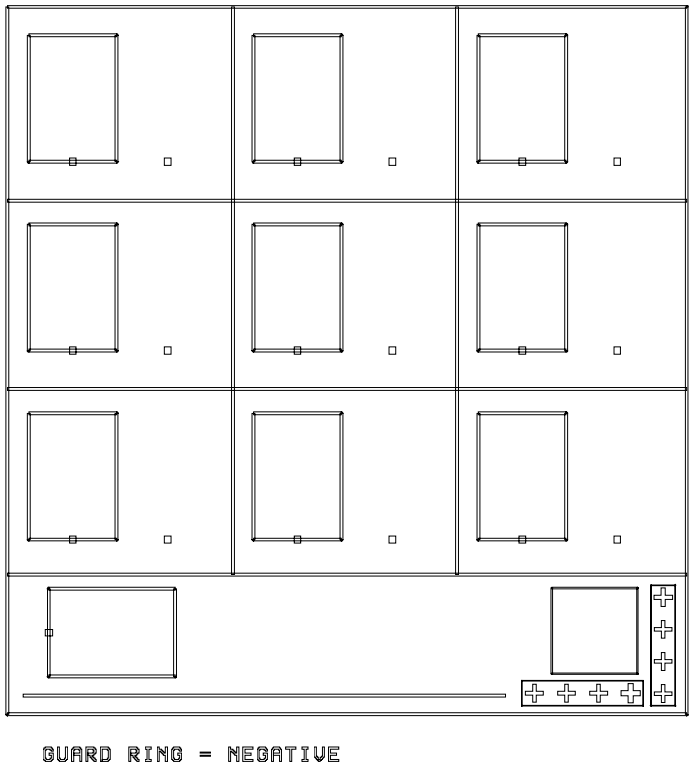


Figure 2.19.Masque 1 – L'anneau de garde (Guard Ring)

Le premier recuit est destiné à réduire la teneur en solvant de 30% à 5% typiquement, à améliorer l'adhésion de la résine sur le substrat, et à recuire les

contraintes créées dans la résine pendant le spin-coating. Le recuit s'est fait, dans ce travail, à 120°C pendant 30 minutes.

La résine est insolée au moyen d'un rayonnement UV (lampe à vapeur de mercure) à travers un masque placé au contact ou à proximité (~μm). L'insolation se produit pendant 20 secondes.

Selon la finalité nous pouvons choisir des résines photosensibles de type positif ou négatif. Dans notre travail, nous avons utilisé une résine photosensible de type positif SHIPLEY S1813.

Résumé des étapes de l'ouverture de l'anneau de garde

1. Photolithographie, masque 1-'guard-ring', figure 2.6
2. Gravure par HF : NH_4F (1 :6), temps de gravure calculé par rapport à un wafer de référence 1, $t_{gravure}$= 2 minutes 40 secondes, figure 2.4 -b
3. Enlèvement la résine (photosensible) : SC

2. Dopage au bore par la technique SOD

Nous avons utilisé la technologie SOG pour la formation des jonctions p-n dans le substrat. Le terme SOD (Spin-On-Dopant) décrit une technique d'étalement d'une couche mince contenant des atomes dopants sur un wafer de silicium par spin coating comme illustrée dans figure (2.7). Cette méthode a été bien acceptée et est largement employée pour la fabrication des micropuces électroniques grâce à des nombreux avantages : simple, facile à mettre en œuvre, pas chère et elle peut donner des couches très uniformes [6].

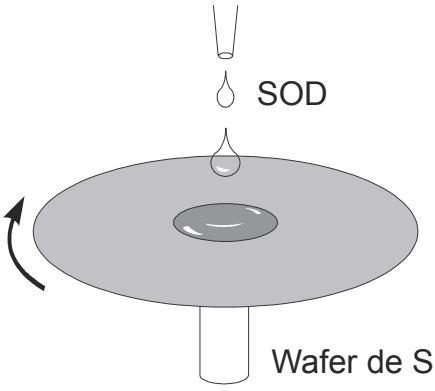


Figure 2.20.Dépôt du gel SOD par la technique SOG

La diffusion des atomes de dopant dans un matériau à très haute température se produit quand un gradient de concentration existe. Les atomes dopants peuvent exister sous forme solide, liquide ou gazeuse.

Hydrolysation $\equiv Si\text{-}O\text{-}C_2H_5 + H_2O \Rightarrow \equiv Si\text{-}OH + C_2H_5OH$ (2.2)

Polymérisation $\equiv Si\text{-}O\text{-}C_2H_5 + Si\text{-}OH \xrightarrow{H^+} \equiv Si\text{-}O\text{-}Si \equiv + C_2H_5OH$ (2.3)

Nous avons préparé un gel dopé au bore comme agent de diffusion [7]. Ce matériau a été préparé à l'ITIMS par la technique dite sol-gel. Dans cette technique le TEOS (Tetraethoxysilane-$Si(OC_2H_5)_4$, Sigma Aldrich) est hydrolysé dans un premier temps (cf. l'équation 2.2) puis se polymérise en présence d'acide borique (équation 2.3). Ce procès dure pendant 2 heures (cf. annexe).

La procédure de cette étape est décrite comme suit:

Etalement par spin coating

Etaler 1 millilitre d'une solution SOD dopé au bore sur la surface de la silice par spin-coating (3000 tours par minute (rpm) pendant 20 secondes).

Nota : il faut que la solution de SOD soit gardée dans le réfrigérateur pendant le stockage. Avant l'étalement, la solution de SOD doit être laissée à température ambiante pendant 30 minutes pour que le gel soit bien stable et homogène.

Premier recuit, 30 minutes à 150°C

Diffusion

Le wafer est introduit dans un tube en quartz à 1050°C pendant 2 heures sous vapeur d'eau puis 800°C pendant 30 minutes sous azote.

Dans ces conditions, les atomes de bore du gel SOD diffuse dans le substrat de silicium formant les jonctions P^+-P. En même temps, une couche de dioxyde de silice est aussi créée pendant la diffusion.

Principales étapes du dopage au bore

Dépôt d'un gel SOD-B, figure 2.4-c

Etalement du gel SOD-B (spin coating) sur le substrat, 3000 tpm, 20 s

Diffusion pour la formation de l'anneau de garde – P^+-P

Vapeur d'eau, T=1050°C, t=120 min, figure 2.4-d

2.1.4. Phase 4-Formation de la Source et du Drain

Dans cette étape, il faut retirer la couche de SiO_2 à l'emplacement de la source et du drain et créer dans ces ouvertures une zone N dopée au phosphore (jonction P-N). Nous avons préparé un gel dopé au phosphore à l'ITIMS. Les principales étapes sont les mêmes que pour la préparation du gel dopé au bore en remplaçant l'acide borique par l'acide phosphorique H_3PO_4 85% (cf. *Dopage au bore par la technique SOD*).

Cette phase comprend les étapes suivantes 1: ouverture de la source et du drain; 2: diffusion du phosphore dans le substrat formant la source et le drain.

1. Ouverture de la source et du drain

Pour ce faire on va graver localement et sélectivement une couche mince à travers des 'fenêtres' ouvertes dans la résine. Deux voies technologiques peuvent être empruntées :

1. La gravure sèche qui associe deux méthodes différentes: gravure chimique et gravure physique [7].
2. La gravure humide entièrement chimique. Elle est utilisable si la taille des motifs est typiquement supérieure à 3µm, ce qui est notre cas.

C'est donc cette dernière technique qui a été retenue pour graver notre échantillon aux emplacements de la source et du drain.

Il existe plusieurs bains d'attaque qui dépendent du matériau à graver. Par exemple, KOH et EDP (Ethylène Diamine Pyrocathécol) sont utilisés pour la gravure anisotrope du silicium monocristallin, HF est utilisé pour la gravure de la silice. Le bain d'attaque utilisé ici a été; HF : NH_4F 1 :6 (v/v) pour retirer la SiO_2 et le SOD résiduel restant après la diffusion

Pour l'ouverture de la source et du drain nous avons donc utilisé la lithographie dite classique en utilisant le masque 2. La résine à l'emplacement de la source et du drain a été enlevée dans la solution Tetra Methyl Ammomium Hydroxide 2%.

L'étape d'ouverture de la source et du drain peut être résumée ci-dessous

1. Photolithographie, masque 2-'source-drain', figure 2.8.
2. Gravure par HF : NH_4F (1 :6), temps de gravure calculé par rapport à un wafer de référence 2, $t_{gravure}$= 6 minutes
3. Enlèvement du dioxyde de silicium SiO_2, figure 2.4-e

Nota: On peut calculer le temps de gravure grâce à une propriété très spéciale de silicium; il est hydrophobe. Lorsqu'on observe que le wafer ne retient plus l'eau au cours de la gravure on peut dire que la gravure est complète et que le temps de gravure est terminé. Cependant, une question se pose: comment peut-on déterminer directement le temps de gravure des motifs trop petits définis par un masque? Afin de surmonter ce problème nous avons utilisé des wafers témoin, autrement dit des wafers de référence qui ont suivi les mêmes étapes de fabrication que les wafers mais sans que des motifs particuliers aient été définis. Ainsi on ne sera plus limité par la question de la taille et ils nous serviront de référence pour déterminer le temps nécessaire à la gravure.

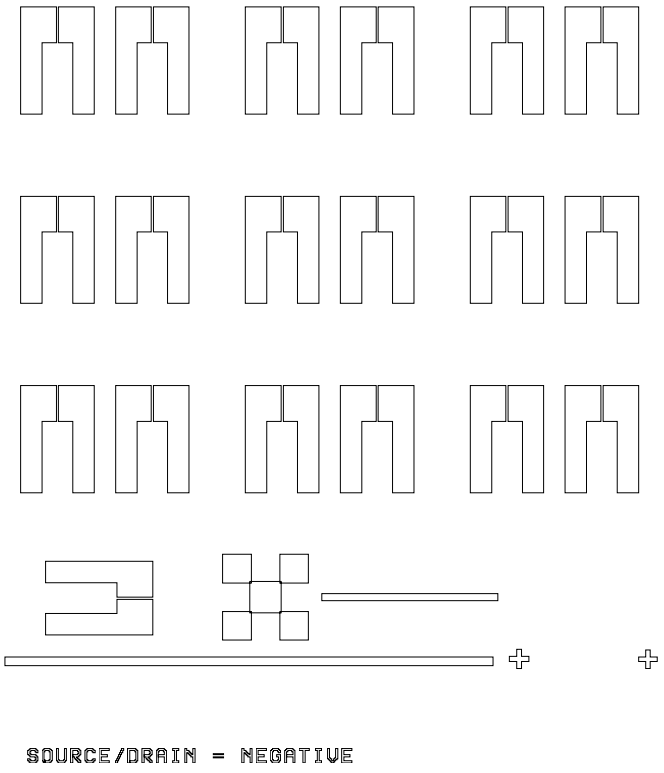


Figure 2.21.Masque 2 - Ouverture de la source et du drain

Dopage par le phosphore

Pour la formation de la source et du drain nous avons d'abord déposé un gel SOD dopé au phosphore. Pour ce faire nous avons utilisé la même procédure que pour le gel dopé au bore mais on a remplacé l'acide borique par de l'acide phosphorique. La diffusion du phosphore dans le substrat du silicium a été ensuite réalisée en chauffant sous vapeur d'eau à 1050°C.

Résumé de cette étape:

1. Etalement du gel SOD-P par spin-on coating sur le substrat, 3000 tpm, 20 s
2. Recuit, T=150°C ; t=30 min, figure 2.4-f

2. Diffusion du phosphore dans le substrat

Diffusion : vapeur d'eau, T=1050°C, t=120 min, figure 2.4-g.

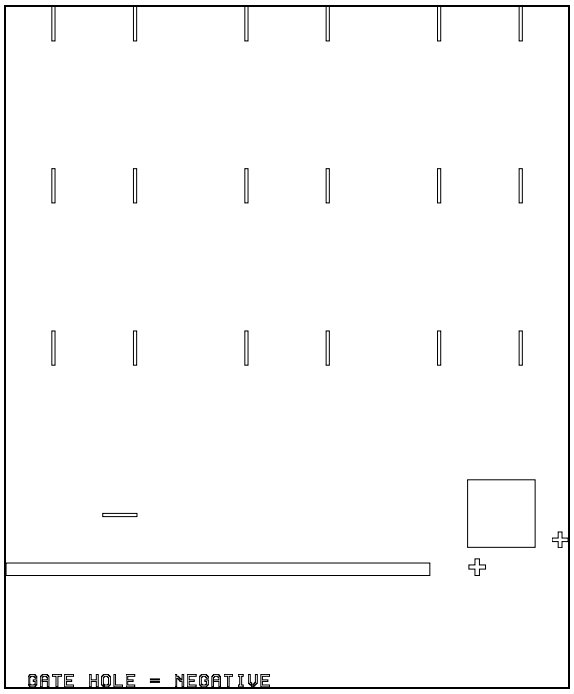


Figure 2.22.Masque 3 – ouverture de la grille

2.1.5. Phase 5-Formation de la grille

Le film dioxyde de silicium joue le rôle d'isolant électrique et sa qualité est très importante pour les caractéristiques du capteur. Dans l'expression du potentiel de seuil d'un MOSFET et d'un ISFET, V_T est proportionnel à la capacité de l'isolant. Si la couche de dioxyde de silicium est contaminée, la capacité de l'isolant, le potentiel de l'interface silicium/isolant seront modifiés ce qui résulte d'une

déformation des caractéristiques du capteur (cf. l'équation 3.10, chapitre 3). Par conséquent, cette couche doit être formée par oxydation sèche sous oxygène pur (99.99% dans notre cas) au lieu de la vapeur d'eau utilisée au cours de la phase 1 afin de minimiser la contamination de la silice (cf. équation 2.2).

$$Si_{(solide)} + O_{2(gaz)} = SiO_{2(solide)} \qquad (2.2)$$

Les différentes étapes de cette 5ème phase sont résumées ci-dessous:

1. Ouverture de la grille par photolithographie, masque 3. Les dimensions de la grille: longueur, L = 30 μm, largeur, W = 500 μm, figure 2.9.
2. Gravure par HF : NH_4F (1 :6), temps de gravure calculé par rapport à un wafer de référence, t= 9 minutes 30 secondes
3. Enlèvement de la résine (cf. figure 2.4 –h)
4. Oxydation : N_2+O_2, T=1000°C, t=60 min
5. Recuit : N_2, T=800°C, t=30 min, figure 2.4 - i

2.1.6. Phase 6- Dépôt d'une couche mince de Tantale

C'est grâce à une membrane sélective d'ions (ISE) que l'ISFET pourra déterminer le changement de pH. Cette membrane peut être constituée d'oxydes de certains matériaux comme par exemple (cf. les ISFET dans le chapitre 3), l'oxyde de tantale dans notre cas. Le but de cette phase est donc de déposer une couche de tantale en utilisant la méthode dite pulvérisation cathodique ou "sputtering". Cette couche de tantale sera oxydée dans la phase 8 pour former la membrane ISE de l'ISFET.

La pulvérisation cathodique, une des méthodes utilisées pour le dépôt des couches minces en microélectronique, est un phénomène d'éjection des particules à partir de la surface d'un matériau dit le matériau cible, le tantale dans notre cas, lorsque celui-ci est bombardé par un flux de particules énergétiques sous vide à 10^{-2} mbar, figure 2.10.

La mise en œuvre de ce procédé peut se faire de deux façons différentes qui sont: la pulvérisation cathodique ou la pulvérisation ionique [9]. Dans notre travail, nous avons utilisé la technique de pulvérisation cathodique. Un certain nombre des

atomes de cible pulvérisés sont recueillies sur un support appelé substrat, placé en face de la cible, et sur lequel ils forment une couche mince.

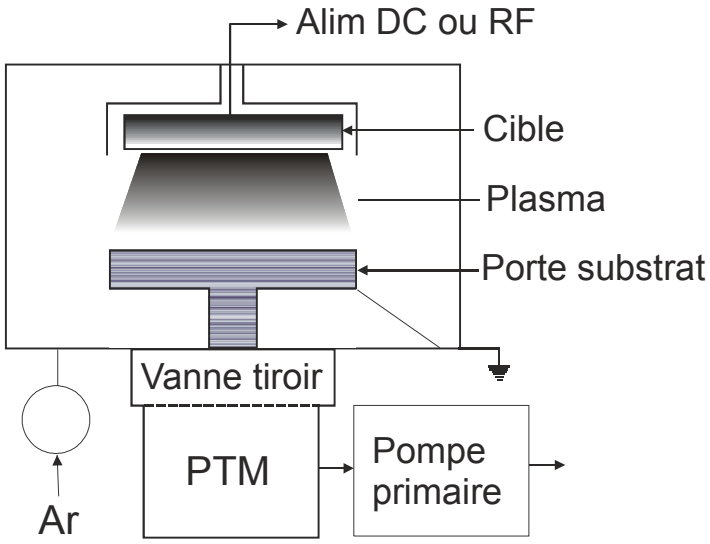


Figure 2.23. Schéma d'une installation de pulvérisation cathodique

Avant la pulvérisation cathodique il est nécessaire de traiter la surface du wafer dans de l'acide HF 1% pendant 20 secondes suivi d'un rinçage à l'eau DI pendant 3 minutes, figure 2.12-j.

Résumé des étapes pour la pulvérisation cathodique de la couche mince du Tantale:

1. Vide primaire : 2.10^{-6} mbar
2. Vide de la pulvérisation : $4.\ 10^{-2}$ mbar
3. Puissance RF : 75 W
4. Temps de pulvérisation : 5 min
5. Epaisseur de la couche de tantale : ~ 400 A°

2.1.7. Phase 7 – ouverture des trous de contact

Ces trous de contacts sont à l'emplacement de la source et du drain où l'on va réaliser la métallisation qui permettra des contacts de type "Ohmic" entre la source, le drain et les pistes en cuivre d'un circuit imprimé. Par conséquent, cette étape doit être terminée avant l'oxydation du tantale car il serait très difficile ensuite d'enlever l'oxyde de tantale (Ta_2O_5).

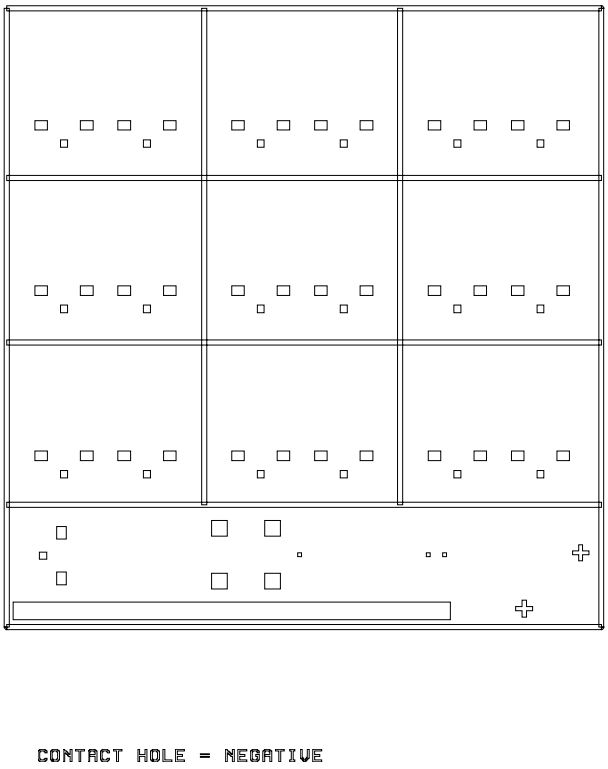


Figure 2.24. Masque 4 – ouverture des trous de contact

Photolithographie, masque 4-'trous de contact', figure 2.11

Il existe deux couches minces; 1: une couche de tantale 2: une couche de silice créée au cours de la formation de l'oxyde de grille. Pour l'ouverture des trous de contact on doit donc graver complètement ces deux couches minces.

Théoriquement on peut utiliser le même mélange HF:HNO_3 : H_2O pour graver ces deux couches mais il est très difficile de contrôler la vitesse de gravure et un phénomène dit de 'gravure latérale' qui détériore la couche de tantale aura lieu au cours de la gravure de la couche de silice. Pour éviter ce phénomène, le wafer a été donc immergé dans une solution de HF : HNO_3 :H_2O pour graver la couche de tantale et puis dans un bain HF: NH_4F pour enlever la couche de silice.

Résume de cette étape pour graver les couches de tantale et de silice

1. Gravure du tantale par un mélange HF : HNO_3 : H_2O (1:1:4) à 30°C pendant t=3 minutes
2. Gravure par HF : NH_4F (1 :6), temps de gravure calculé par rapport à un wafer de référence 4, figure 2.13-l., t= 3 minutes 30 secondes
3. Enlèvement de la résine par l'acétone.

Nota: les solutions de l'acide HNO_3 fumant à 98% et de l'acide HNO_3 à 65% à 110°C utilisé pour enlever la résine photosensible après chaque étape de gravure peuvent réagir avec la couche mince de tantale. C'est pourquoi nous devons enlever la résine photosensible, dans ce cas, par l'acétone à la place de ces acides.

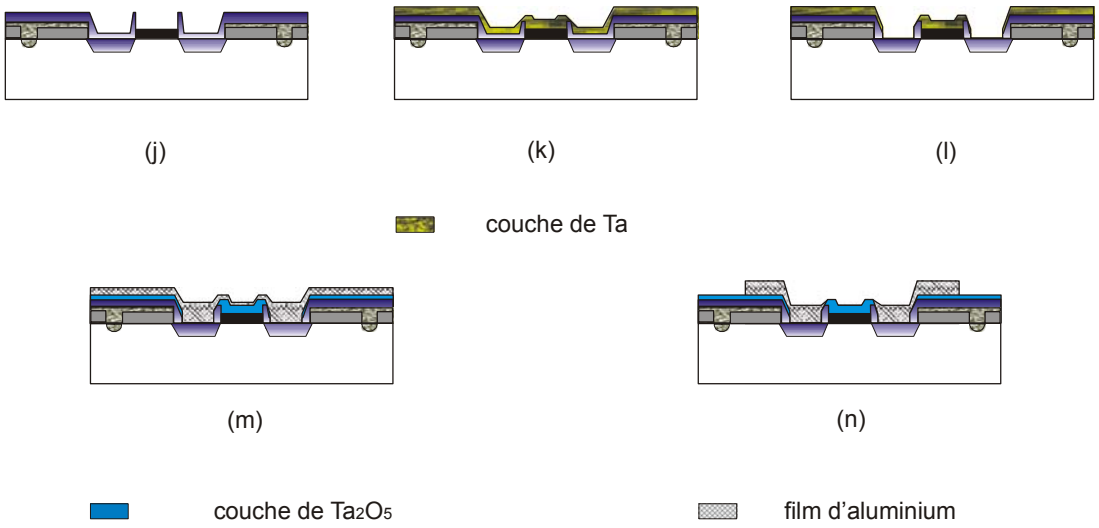


Figure 2. 25. Phase 6 à 9 de la procédure de fabrication des ISFETs

2.1.8. Phase 8 – Oxydation du tantale

Le but de cette étape, dans notre travail, est donc de former la membrane ISE de l'ISFET en oxyde de tantale. Pour ce faire nous avons oxydé le tantale par un traitement sous l'oxygène pure (voie sèche) à 600°C pendant 2 heures pour obtenir une couche d'oxyde de tantale dont l'épaisseur est de 780 A° (presque le double de l'épaisseur de la couche de tantale).

Pour un bon contact entre le substrat (Si) avec l'aluminium, un film très mince de SiO_2 doit être retiré avant la phase 9 par un trempage dans une solution HF 1% pendant quelques secondes

2.1.9. Phase 9 – Métallisation

Le but de cette étape est de déposer un film d'aluminium qui recouvre les régions 'source et drain' des ISFETs afin d'obtenir un contact métallique. Pour ce faire, nous allons donc déposer l'aluminium, par la méthode d'évaporation, sur tous les composants du wafer puis retirer l'aluminium sur les zones autres que la source et le drain de chaque capteur (cf. figure 2.14).

L'évaporation est une méthode très fréquente dans la technologie des couches minces. Dans une enceinte à vide, on porte le matériau à déposer à une température suffisante pour l'évaporer ou le sublimer. Après transport dans la chambre, les vapeurs se condensent sur le substrat froid comme schématiquement illustré dans la figure 2.13 [10].

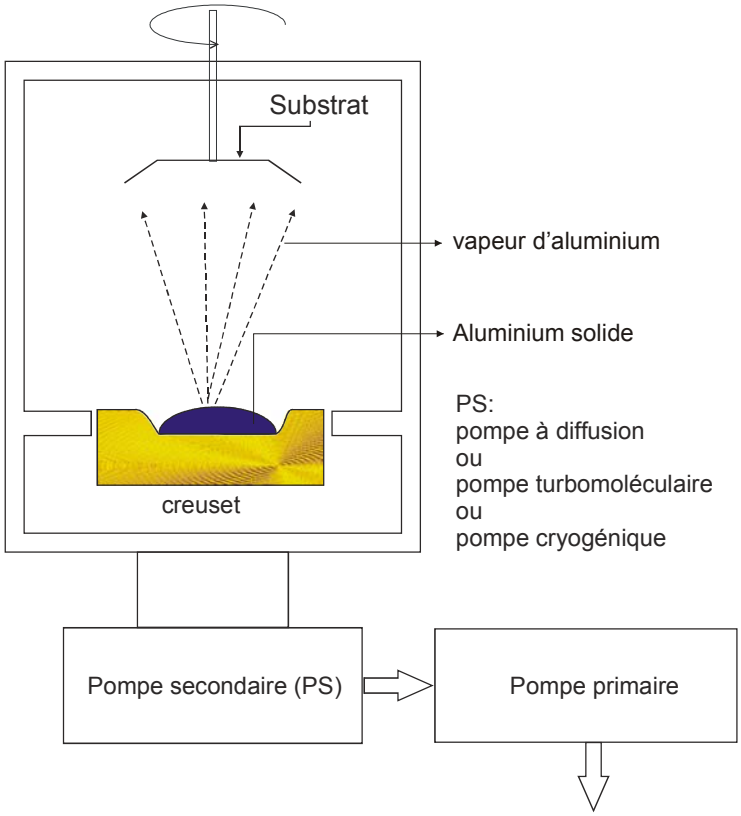


Figure 2.26. Schéma du montage de l'évaporation

Le matériau à évaporer, dans le creuset, se porte à une température telle que sa pression de vapeur, au niveau du creuset, atteigne typiquement de 10^{-4} à 1 Torr, selon la vitesse de dépôt souhaitée. A cette pression le libre parcours moyen est plus grand que la distance source-wafer ce qui permet que tous les atomes ou clusters (groupes d'atomes) émis par la source (creuset) atteignent le substrat sans être déviés de leur trajectoire. Il est en outre nécessaire d'opérer sous un vide suffisant pour éviter que le matériau chauffé à haute température dans la source réagisse chimiquement avec le gaz résiduel (oxydation).

Le système de pompage d'une installation d'évaporation comporte donc obligatoirement :

a. une pompe primaire

b. une pompe à diffusion ou une pompe turbomoléculaire ou une pompe cryogénique tirée par une pompe à palette.

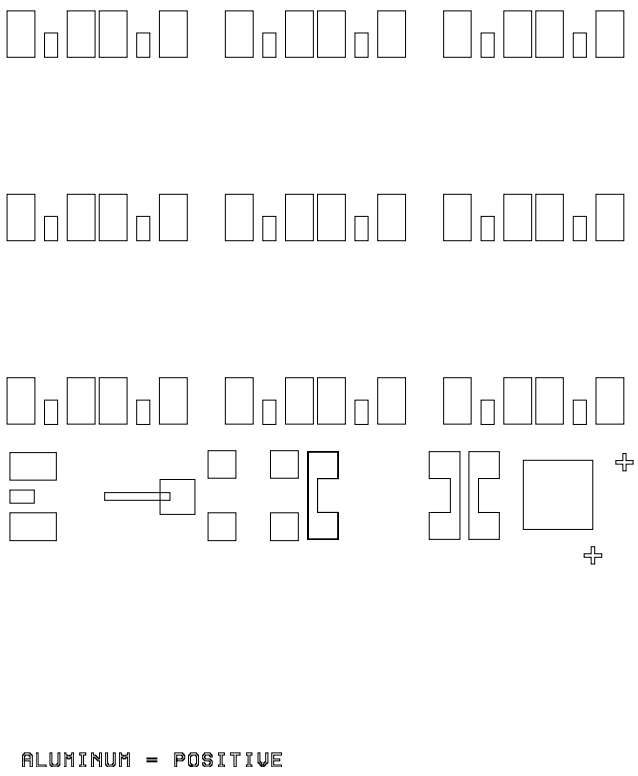


Figure 2. 27. Masque 5

Dans ce travail, pour le vide primaire nous avons utilisé la pompe primaire et la pompe à diffusion pour le vide de l'évaporation.

Avant cette étape, il faut enlever la couche dioxyde de silicium (très mince) par immersion du wafer dans une solution HF 1% pendant 10 secondes.

Evaporation :

1. Vide primaire : 10^{-3} mbar
2. Vide d'évaporation: $5.10^{-6} – 2.10^{-5}$ mbar
3. Densité du courant : ~5 A
5. Temps d'évaporation : 3-5 sec

Masque 5

Cette étape a pour objectif de retirer la couche d'aluminium sur le wafer à l'exception de l'emplacement de la source et du drain. Pour sa réalisation nous avons réalisé la lithographie dite classique en utilisant le masque 5, figure 2.14. Résumé des étapes de la formation des contacts d'aluminium

1. Etalement de la résine par spin coating
2. Insolation : 20 secs
3. Développement : 1 min
4. Gravure de l'aluminium par: H_3PO_4 : CH_3COOH : H_2O (1 :15 :2 :2 v/v)
5. Enlèvement de la résine par HNO_3 98% fumant à température ambiante pendant 5 minutes suivi par l'acétone pur pendant 3 minutes.
6. Recuit de l'aluminium, sous H_20/azote, T= 450°C, t= 30 min

Les ISFETs, après cette étape sont présentés dans la figue 2.15.

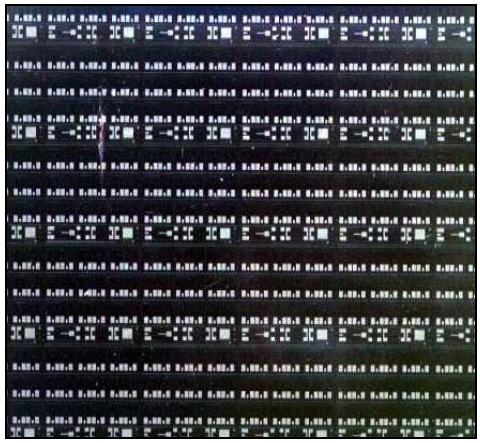


Figure 2.28. ISFETs en wafer

2.1.10. Les dernières étapes de la fabrication des ISFETs

Pour pouvoir être utilisé en tant que capteurs, les ISFETs sur le wafer seront découpés en puce individuelle par une machine à découper Accu-Cut 5200 Dicing Saw (Etats-Unis). Chaque puce consiste en deux ISFETs (l'un sert pour la mesure l'autre pour la référence). La puce est ensuite collée à la colle d'argent A1401 (JM, UK) sur un support en fibre de verre sur lequel cinq pistes en cuivre ont été imprimées et laissé à température ambiante pendant 1 heure. Puis on réalise une soudure aux ultrasons d'un fil d'aluminium entre les pistes en cuivre et les plots en aluminium de la source et du drain de l'ISFET par une machine à souder, MDB-11, VEB Elektromap – Dresden (Allemagne) illustrée dans la figure 2.16.



Figure 2.29. La machine à souder à l'ITIMS

Après quoi, nous devons réaliser l'encapsulation des ISFETs pour protéger les différentes connexions électriques et le substrat de silicium du milieu liquide en utilisant l'époxy. Dans ce travail nous utilisons une résine époxy Epon 863 (Shell) mélangée à un durcisseur la Jeffamine D400 (Texaco) ainsi qu'un épaississant, la silice aérosil 300V^{TM} (Degussa - Allemagne). Ce mélange est dégazé sous vide primaire (à 10^{-2} mbar) pendant 15 minutes pour faire sortir les bulles d'air formées qui dégrade la durée de vie du capteur. La puce est ensuite encapsulée à la main avec la résine époxy et laissé à l'air libre pendant 12 heures environ. Nous rajouterons ensuite une autre résine afin d'améliorer l'étanchéité du capteur. Le séchage de la résine est effectué pendant 24 heures à l'air libre.

Les ISFETs, après l'encapsulation se présentent comme dans la figure 2.17



Figure 2.30. Une puce d'ISFETs après l'encapsulation présence de 2 capteurs

Caractéristiques des ISFET

Pour caractériser les ISFETs nous devons commencer par nous assurer de la qualité des jonctions P-N car la structure MOSFET est en fait la combinaison de deux jonctions P-N (N-P-N). Pour ce faire nous avons réalisé des courbes I-V (courant – tension).

Pour sa réalisation nous avons utilisé un appareil d'analyse des paramètres de semi-conducteur dit Semiconductor Parameters Analyzer (SPA)-HP4156A, Hewlett Packard-Japon, figure 2.18.



Figure 2.31. SPA HP4156A pour réaliser les caractéristiques des ISFETs

La zone P de diode est connectée en masse à l'intermédiaire d'un porte substrat tandis que la zone N est en contact avec un générateur de SPA par une aiguille, figure 2.19. Pour mesurer les courbes I-V d'une diode nous avons appliqué une tension de -8 V jusqu'à +5V.



Figure 2.32. Montage de connexion les jonctions d'une diode à SPA

La caractéristique I-V de la diode est donnée dans la figure 2.20. La courbe expérimentale est identique à la théorique. En mesurant le courant Id en fonction de la tension à la diode, Vd, nous avons mesuré un courant de 0.122μA à Vd=1V, donnée par le SPA. Cependant, cette valeur expérimentale est un peu grande par rapport au courant standard des dizains de μA. La raison est peut-être due à une contamination par le dopant durant la diffusion.

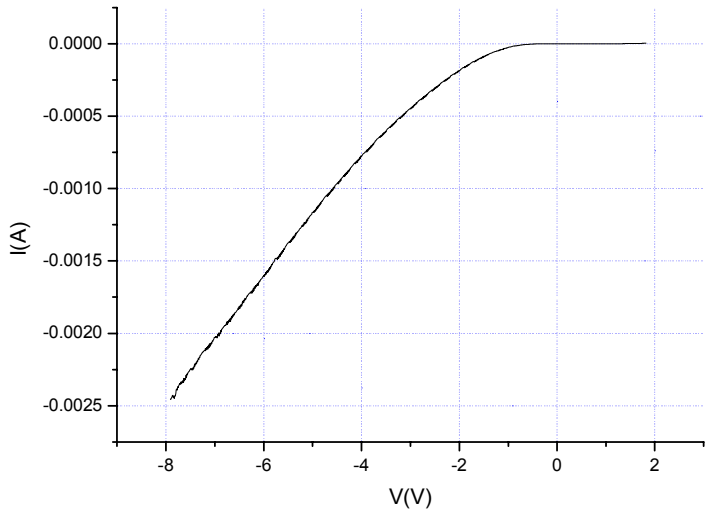


Figure 2.33. Courbe expérimentale de variation du courant en fonction du potentiel de la diode N+-P

Nous avons ensuite caractérisé la variation du courant de drain en fonction du potentiel de grille en utilisant le SPA HP 4156A. Dans ce cas, nous avons appliqué les potentiels de grille allant de -10 à + 5 volts en même temps pour cinq valeurs du courant de drain (V_D= 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 et 2.5 V) et mesuré les valeurs des courants de drain. La tension de seuil des ISFETs qui est présentée dans la figure 2.21, est de -5 volt.

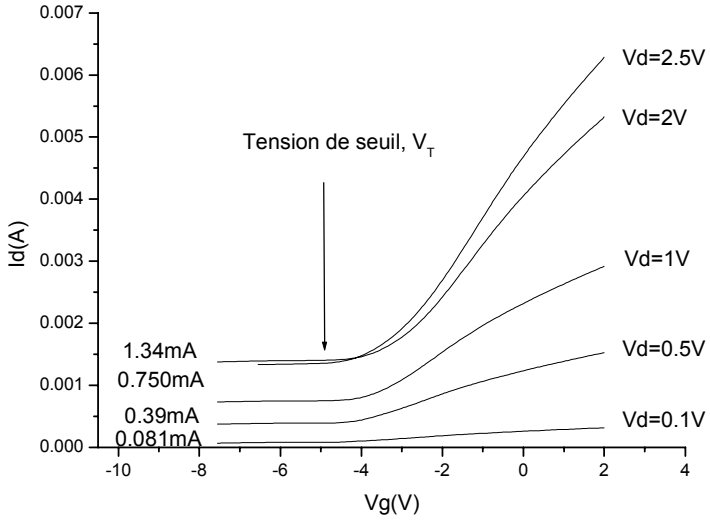


Figure 2.34. Courbes expérimentales de variation de Id en fonction de Vg et Vd

Nous avons ensuite tracé de I_D-V_D. Les courbes expérimentales sont données dans la figure 2.22.

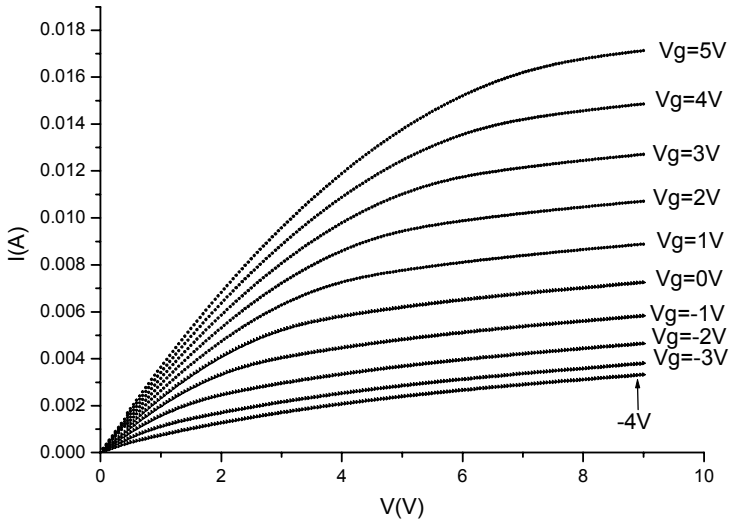


Figure 2. 35. Courbes expérimentales de variation de Id en fonction de Vg

On peut voir, dans la figure 2.22, qu'il existe deux régions dans les courbes expérimentales: l'une linéaire entre 0 et 3,5V et l'autre saturée à partir de 4V. Cependant la région saturée n'est pas vraiment saturée comme dans la théorie. Le courant de drain augmente légèrement quand $V_D > V_G - V_T$ (cf. Les MOSFET dans le chapitre 3).

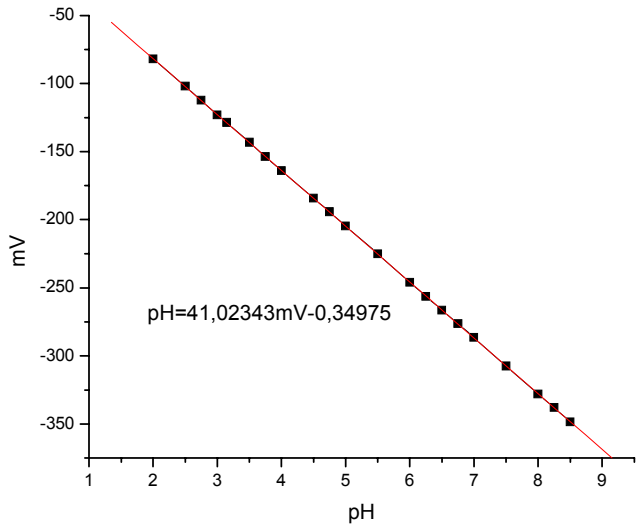


Figure 2.36. La variation de potentiel de sortie en fonction du pH de l'ISFET

Nous avons ensuite évalué la sensibilité de l'ISFET en fonction du pH. Nous avons obtenu une courbe très linéaire avec une sensibilité de 41mV/pH (figure 2.22) ce qui est un très bon résultat.

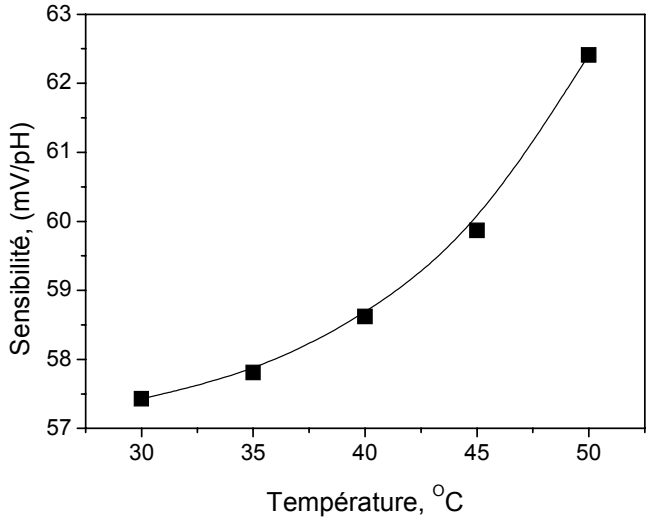


Figure 2.37.Variation de la sensibilité de l'ISFET en fonction de la température

Nous avons enfin évalué la dérive de l'ISFET en fonction de la température. Les résultats expérimentaux sont donnés dans la figure 2.23.

Cette courbe nous dit que la sensibilité de l'ISFET en fonction de la température varie beaucoup dans la gamme allant de 35 à 50°C. Ces résultats seront à prendre en compte dans l'exploitation de ces capteurs.

Les caractéristiques des MOSFETs, des ISFET ainsi que le mécanisme de la mesure du pH seront discutés au cours du chapitre 3.

2.2. Fabrication des microélectrodes

Pour mesurer la conductivité ou la conductance d'un milieu il est nécessaire d'avoir deux électrodes. Une tension sinusoïdale d'excitation est appliquée à une électrode et l'intensité I du courant est recueillie sur les deuxièmes électrodes. Dans notre travail nous avons réalisé deux paires d'électrode sur une seule puce. Cette configuration permet de travailler en mode différentielle. Par ailleurs, nous avons utilisé deux paires d'électrodes interdigitées afin d'augmenter la surface de contact pour la biomembrane. Les dimensions du capteur conductimétriques sont données dans la figure 2.25.

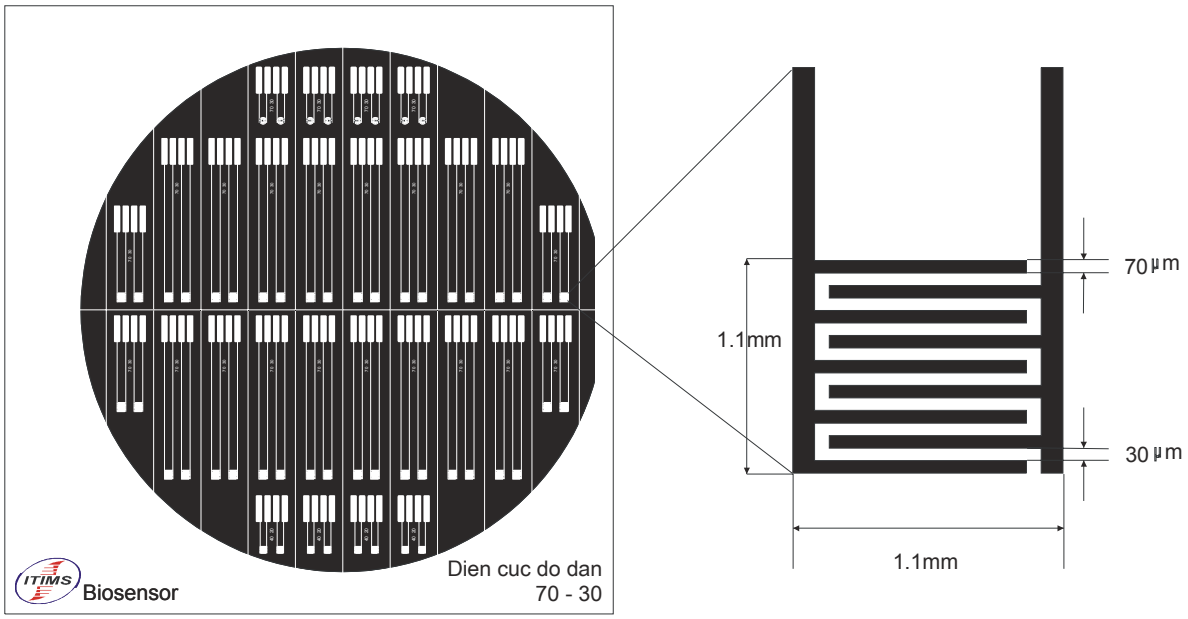


Figure 2.38.Dimensions du capteur conductimétrique fabriqué à l'ITIMS

La fabrication de ces capteurs a commencé par la préparation du substrat suivie de l'oxydation du silicium pour obtenir une couche isolante du support. Un seul masque est utilisé pour définir les motifs dans lesquels nous allons pulvériser une couche mince de chrome et un film de platine. La technique lift-off nous a permis d'enlever la résine après le 'sputtering'. Enfin les capteurs seront découpés en chip. Les étapes de la fabrication de capteurs conductimétriques sont résumées ci-dessous:

2.2.1. Phase 1- Préparation du substrat –SC

(cf. phase 1 – fabrication des ISFETs)

2.2.2. Phase 2 – Oxydation

7. T= 1100°C, vapeur d'eau, t= 120 min
8. Recuit sous azote à T=800°C, t=30 min, figure 2.26-a, b.

2.2.3. Phase 3-lithographie

Dans cette phase nous avons utilisé la technique de photolithographie dite lift-off. Le but de cette technique est d'obtenir un 'profil inversé' des motifs de résine qui sont utilisés comme masques pour le dépôt de la couche mince.

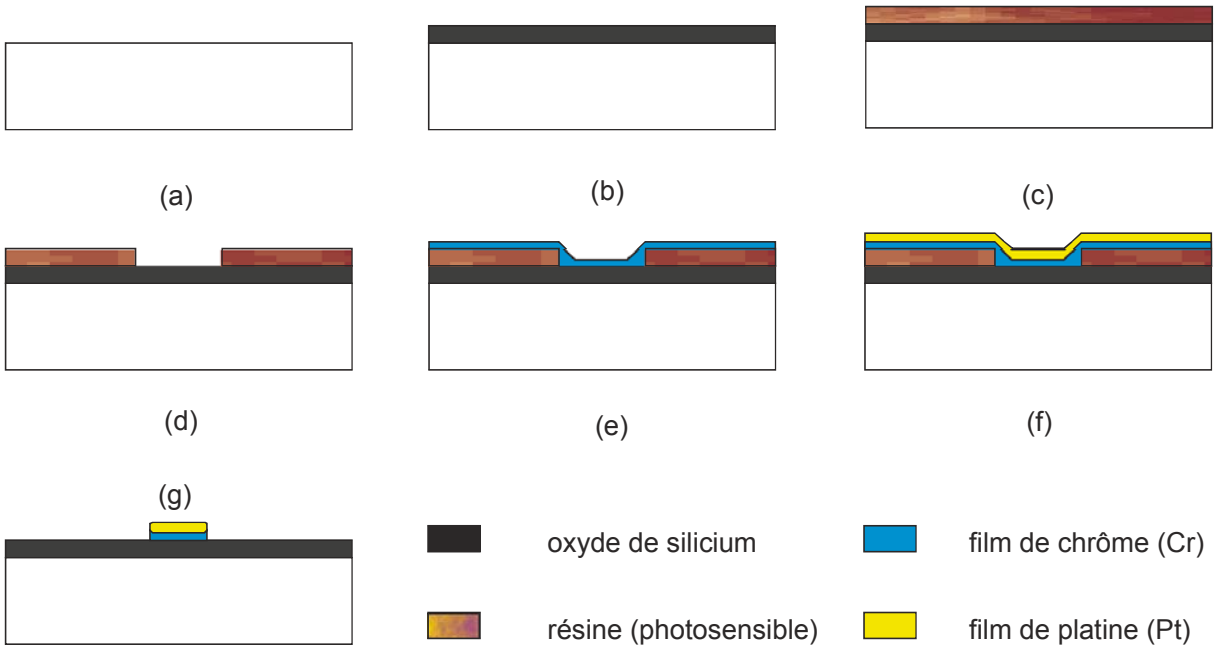


Figure 2.39.Procédure de la fabrication des capteurs conductimétriques

Elle nous permet d'abord de définir les motifs dans lesquels une couche de chrome et une couche mince de tantale seront pulvérisées. Contrairement à la lithographie dite classique, dans la technique dite lift-off nous n'enlevons pas tout de suite la résine après le développement dans une solution Tetra Methy Ammomium Hydroxide 2% parce que cette couche de résine empêche la pulvérisation des atomes de chrome et de platine sur la surface du wafer à l'exception des motifs définis. La résine sera enlevée dans l'acétone ultérieurement dans un bain à ultrason.

Résume des étapes de la phase 3

Masque – 'biosensor group',(cf. figure 2.25).

1. Etalement du primaire
2. Etalement de la résine photosensible par spin-on coating, 4000 rpm, 10 secs
3. Premier recuit à T= 90°C, t=15 minutes, figure 2.26-c
4. Insolation au UV, t= 20 secs
5. Développement, t= 60 secs
6. Rinçage par l'eau DI
7. Contrôle de la qualité, figure 2.26-d

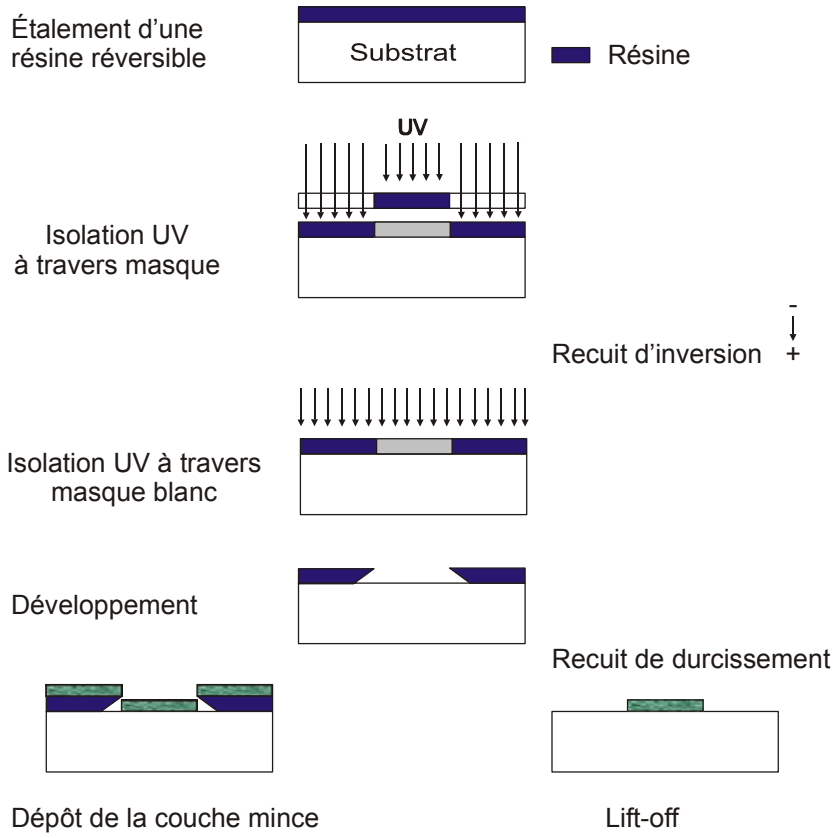


Figure 2.40. Schéma de la photolithographie utilisant la technique 'Lift-off

2.2.4. Phase 4 –pulvérisation cathodique

Le but de cette étape est la formation d'une couche de chrome (Cr), figure 2.26 -e et d'une couche de platine (~100 A°), figure 2.26-f. Les facteurs de la pulvérisation sont notés dans la table 1. Cette couche mince de chrome a pour objectif d'améliorer l'adhésion entre le substrat et la couche de platine.

2.2.5. Phase 5 – Retrait de la résine

Le but de cette étape est de retirer la résine sur la surface du wafer.

Immersion du wafer dans un bain d'acétone sous ultrason pour enlever la résine, t=20 secs. Après cette étape nous obtenons des électrodes pulvérisées sur le wafer.

Contrôle par microscope

Recuit, T=450°C, N_2/H_2O, t= 50 min, figure 2.26-g.

Le recuit sous l'azote/vapeur d'eau permet une meilleure stabilité de la membrane.

Table 1. Paramètres de la pulvérisation

Facteurs	Quantité	Unité
Vide primaire	2.10^{-6}	mbar
Vide de pulvérisation	4.10^{-2}	mbar
Puissance RF (pour Cr)	75	W
Temps de la pulvérisation (Cr)	5	Min
L'épaisseur du film de chrome	50	A°
Puissance RF (Pt)	300	W
Temps de la pulvérisation (Pt)	15	Min
L'épaisseur du film de platine	300	A°

2.2.6. Encapsulation des capteurs conductimétriques

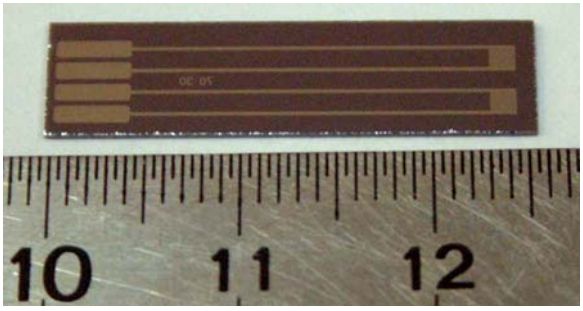


Figure 2.41. Les capteurs conductimétriques après la coupure

Le wafer est découpé en chip individuel (deux paires d'électrodes par chip), figure 2.28, comme lors de la découpe des ISFETs. Les capteurs conductimétriques ont été, ensuite, recouverts d'une couche de résine verte (BlocJelt 6966, France) (sauf les électrodes sous forme de peignes et bien sûr la connexion).

Conclusion

Nous avons montré l'application du matériau SOD et la technologie de SOG pour la fabrication des ISFETs à l'ITIMS. Les caractéristiques expérimentales des ISFETs sont identiques à ceux théoriques.

Une procédure simple de fabrication des capteurs conductimétriques a été aussi décrite.

Dans la suite de ce travail les essais ont été réalisés avec des capteurs provenant de l'Ukraine et de l'Allemagne, car le travail était mené en parallèle.

Références bibliographiques

[1]. Nguyen Nhu Toan, 1999, *Spin-on glass materials and application in advanced IC technologies*, Ph.D. thesis, University of Twente, The Netherlands.

[2]. Mai Anh Tuan, 1999, *Application of SOG material and technology to the fabrication of pH, master thesis*, Hanoi University of Technology, Viet Nam.

[3]. Ngo Ngoc Ha, 2001, *Development of biosensors based on microelectrodes to determine pesticides in water*, master thesis, Hanoi University of Technology, Viet Nam.

[4]. Mai Anh Tuan, 1999. *Application of SOG material and technology to the fabrication of pH ISFET*. Master thesis, Hanoi University of Technology, Viet Nam.

[5]. S.M. Sze, AT& T Bell Laboratories, 1985, *Semiconductor devices – Physics and Technology*, Murray Hill, New Jersey, John Willy & Sons, 342.

[6]. S.M. Sze, AT& T Bell Laboratories, 1985, *Semiconductor devices – Physics and Technology*, Murray Hill, New Jersey, John Willy & Sons, 381.

[7]. S.M. Sze, AT& T Bell Laboratories, 1985, *Semiconductor devices – Physics and Technology*, Murray Hill, New Jersey, John Willy & Sons, 451-465.

[8]. Nguyen Nhu Toan, Mai Anh Tuan, Tran Thu Huong, Nguyen Thanh Huong, Charles Barthou, Tran Kim Anh, Le Quoc Minh and Nguyen Duc Chien, *Sol-Gel prepared silica-based materials for sensors and optoelectronic applications*, Proc. of COMMAD 2000, Melbourne, Australia, 6-8 December 2000, pp. 304.

[9]. Milton Ohring, (1992), *The Materials Science of Thin Films*, 109-132

[10]. Milton Ohring, (1992), *The Materials Science of Thin Films*, 335-336

CHAPITRE 3

PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DES CAPTEURS

TABLE DES MATIERES

3.1.	La conductimétrie	76
3.1.1.	Principe de la mesure	77
3.1.2.	Instrumentation	80
3.2.	Les mesures avec les ISFETs	82
3.2.1.	Les MOSFETs	82
3.2.2.	Les ISFETs	85
3.2.3.	Principe de la mesure	87
3.2.4.	Les ENFETs	89
3.2.5.	Système de mesure du capteur ISFET	90
3.2.5.1	Mesure simple	90
3.2.5.2.	Système de mesure différentielle	93
	Conclusion	96

Dans le cadre de ce travail deux types de capteurs ont été utilisés les ISFETs, pour la détection des composés phénoliques et les capteurs conductimétriques, pour la détection de pesticides dans l'eau. Le principe de fonctionnement de ces capteurs serait présenté au cours de ce chapitre. Les systèmes de mesure seront également illustrés en détail.

3.1. La conductimétrie

La conductimétrie est une technique de mesure électrochimique alternative aux techniques potentiométriques et ampérométriques. La conductimétrie permet de mesurer la variation de conductivité (ou conductance) d'un milieu. Dans le domaine des biocapteurs, elle peut être appliquée à la mesure des réactions enzymatiques faisant intervenir la nature et/ou le nombre de porteurs de charges électriques en solution. Dans le cadre de notre étude, la conductimétrie est appliquée à la détection de pesticides par l'intermédiaire de la réaction d'oxydoréduction catalysée par la tyrosinase.

3.1.1. Principe de la mesure

La technique conductimétrique qui a été développée dans le travail de S. Dzyadevich [2] est basée sur la mesure de l'impédance d'un milieu perturbé par un signal sinusoïdal.

La tension sinusoïdale d'excitation E appliquée à une électrode interdigitée peut être exprimée comme suit:

$$E_{excitation} = e\sin(\omega t) \tag{3.1}$$

Avec ω fréquence angulaire du signal, ω = 2πf où f est la fréquence du signal en Hertz.

L'électrode réceptrice reçoit un courant d'une intensité I qui est exprimée par l'équation (3.2)

$$I = i\sin(\omega t + \phi) \tag{3.2}$$

où ϕ est le décalage de phase entre la tension et le courant et qui dépend de la combinaison des éléments résistifs et capacitifs des composants du système, figure 3.1.

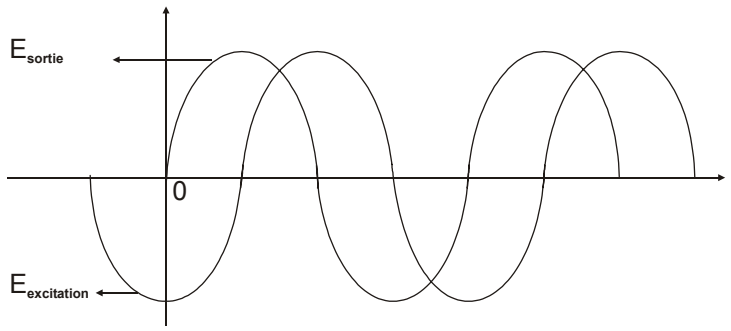


Figure 3.42. Déphasage des signaux d'excitation et de sortie

La relation entre la tension et le courant est donnée par:

$$E_{exitation} = ZI \tag{3.3}$$

où Z est l'impédance du système. Le schéma électrique équivalent correspondant aux mesures en solution peut être présenté par la figure 3.2.

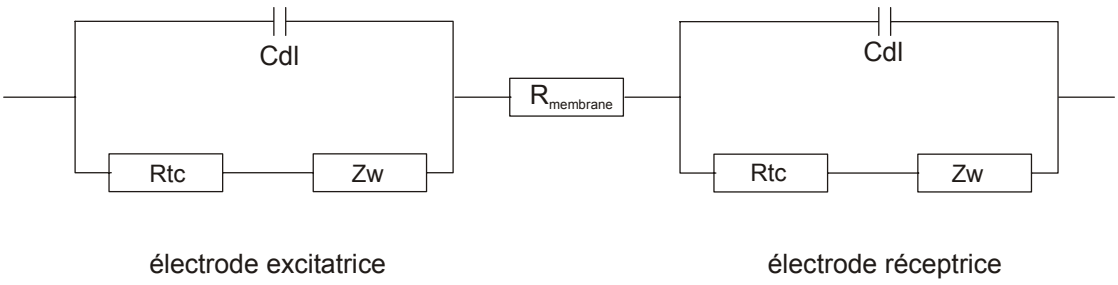


Figure 3.43.Schéma électrique équivalent du montage conductimétrique

Avec:

Cdl: capacité de la double couche de charges présentent à l'interface métal – solution

Rtc: résistance de transfert de charge à l'interface métal/solution

Zw: impédance de Warburg liée à la diffusion des espèces de la solution vers l'électrode.

$$Zw = (1 - j)\sigma\omega^{-1/2} \tag{3.4}$$

Avec σ coefficient de diffusion des espèces et ω fréquence angulaire du signal

$R_{membrane}$: résistance de la membrane.

La fréquence d'excitation du système est 100 kHz. A cette valeur, l'impédance de Warburg, est inversement proportionnelle à la fréquence angulaire et devient négligeable.

L'impédance totale du système peut être décomposée par

$$Z = Z_r + Z_c \tag{3.5}$$

Avec Zr composante résistive de l'impédance et Zc composante capacitive de l'impédance. La composante résistive de l'impédance totale est mesurée en phase par rapport au signal d'excitation tandis que la composante capacitive est mesurée en quadrature par rapport au signal d'excitation.

Le diagramme de Nyquist de l'impédance du système, sur une gamme de fréquence suffisamment haute pour négliger l'impédance Warburg, peut être schématisé par la figure 3.3.

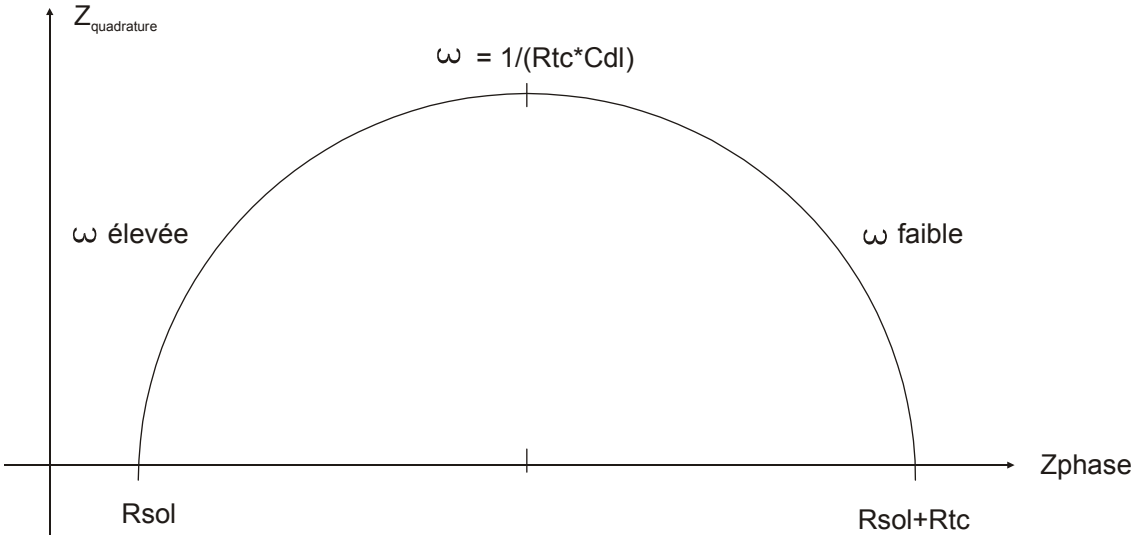


Figure 3.44. Diagramme d'impédance du montage conductimétrique

Les travaux de S. Dzyadevych ont permis de montrer que dans le domaine des hautes fréquences, la valeur de l'impédance n'est pas affectée par la résistance de transfert de charge Rtc. Dans ce domaine de fréquence, l'impédance en phase est égale à la résistance de la solution.

L'intensité du signal en phase est égale à

$$I = \frac{E_{excitation}}{Z_{phase}} = \frac{E_{excitation}}{R_{sol}} = E_{excitation} * G \qquad (3.6)$$

où G est la conductance exprimée en Siemens (S)

Dans notre système, les intensités sont directement converties en une tension au niveau de la détection synchrone (convertisseur courant/tension) aux bornes de la résistance de charge $R_{circuit}$:

$$I = \frac{E_{sortie}}{R_{circuit}} \qquad (3.7)$$

En substituant I dans l'équation (3.6) par son équivalent dans l'équation (3.7) on obtient

$$\frac{E_{sortie}}{R_{circuit}} = E_{excitation} * G \text{ d'où } E_{sortie} = E_{excitation} * G * R_{circuit} \qquad (3.8)$$

La conductance G est directement déduite selon:

$$G = \frac{E_{sortie}}{E_{excitation} * R_{circuit}} \qquad (3.9)$$

3.1.2. Instrumentation

Le montage expérimental utilisé pour la mesure de conductivité aux laboratoires LACE, et à l'ITIMS est schématisé sur la figure 3.4. Il permet une mesure différentielle entre une électrode de travail et une électrode de référence.

La détection synchrone SR830 de Stanford Research, figure 3.5, permet de fixer la phase à laquelle est mesurée le signal de sortie. Pour la mesure de la conductivité, la phase du signal mesurée est nulle par rapport à un signal de référence.

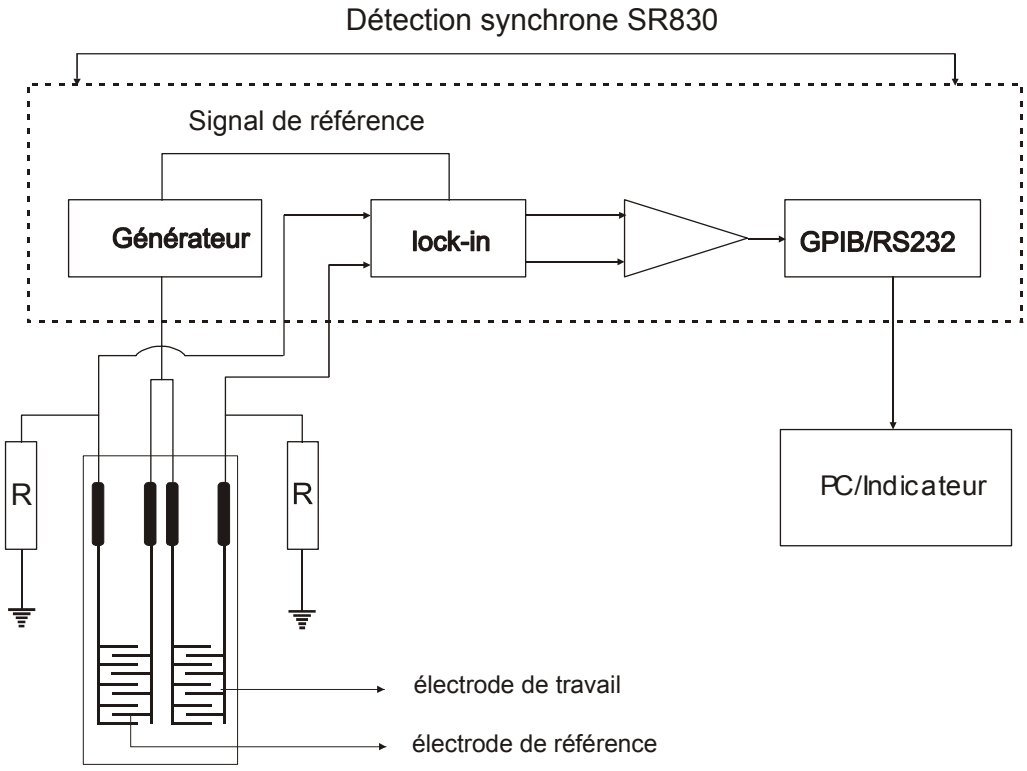


Figure 3.45. Montage de mesure conductimétrique

Le signal de référence (sinusoïdal) est généré par la détection synchrone SR 830, figure 3.6, et est transmis à l'électrode excitatrice de chaque paire. Les signaux sont ensuite filtrés par la technique du lock-in. Cette technique permet de filtrer un signal avec une bande passante arbitrairement faible centrée sur la fréquence du signal d'excitation. La technique du lock-in nécessite une fréquence d'excitation stable dans une partie du spectre de fréquence non-bruitée.

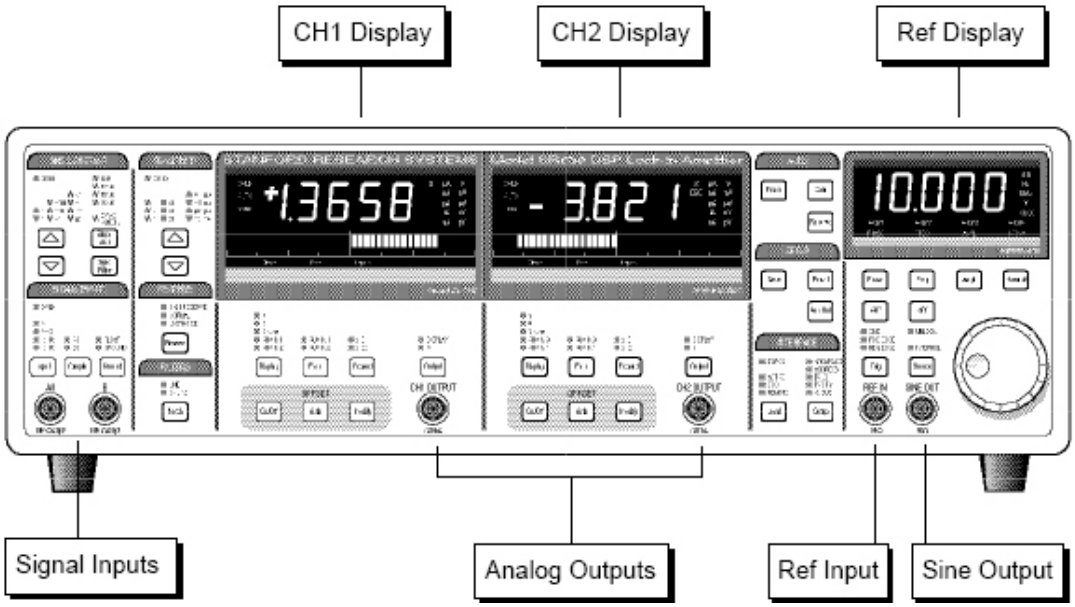


Figure 3.46. Lock-in Amplifier SR 830

Les signaux recueillis sont transmis à la détection synchrone qui fait la différence des deux signaux (électrode de référence – électrode de travail), ce qui permet d'éliminer les signaux non spécifiques comme l'adsorption d'espèces sur les électrodes.

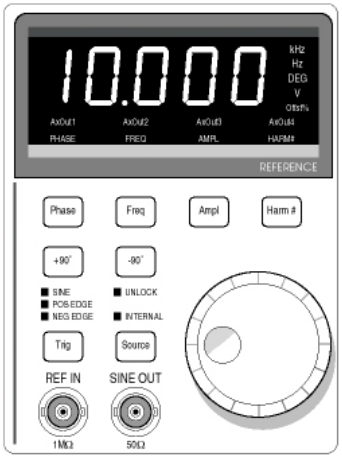


Figure 3.47. Signal de référence du SR 830

Le différentiel des tensions mesuré en phase par rapport au signal d'excitation est transmis à un enregistreur ou à un ordinateur par l'intermédiaire d'une carte RS232 ou d'une carte GBIP.

3.2. Les mesures avec ISFETs

3.2.1. Les MOSFETs

Pour mieux comprendre le principe de fonctionnement d'un l'ISFET, nous commençons d'abord par expliquer le fonctionnement du transistor MOSFET.

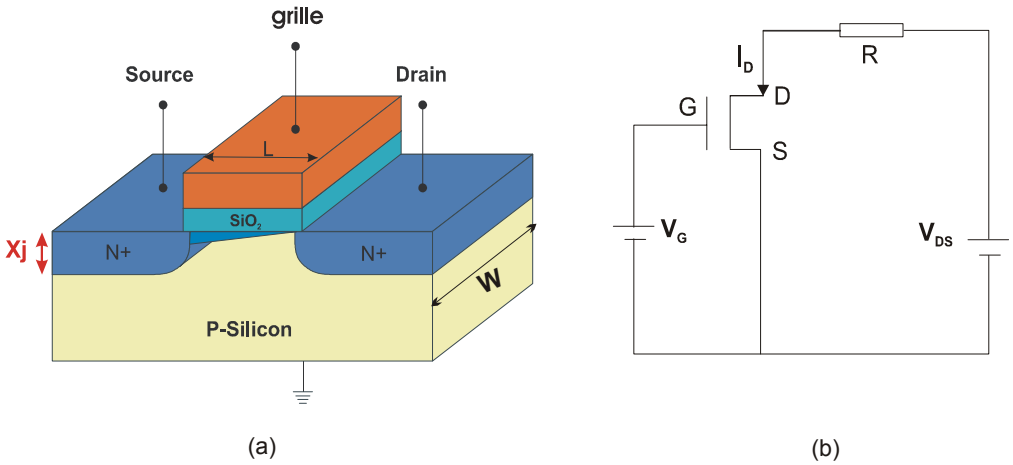


Figure 3.48. Schéma d'un transducteur MOSFET

Comme le nom MOSFET (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) le suggère, le transistor MOSFET consiste en un substrat semi-conducteur sur lequel repose une fine couche d'oxyde isolant (SiO_2), d'épaisseur t_{ox}. Une couche conductrice (métal ou polysilicium fortement dopé) appelée électrode de grille est aussi déposée sur l'oxyde. Enfin, deux régions fortement dopées de profondeurs X_j, appelées source et drain, sont formées dans le substrat de part et d'autre de la grille (figure 3.8). La tension appliquée sur l'électrode de grille fait varier la conductance entre les deux régions source-drain ce qui fait varier le courant dans le canal situé en dessous. La source et le substrat dans le circuit électronique sont portés au même potentiel, en générale la masse.

Selon la valeur de la tension de grille V_G on peut définir plusieurs zones de fonctionnement

1) $V_G=0$ – le canal est saturé en porteurs majoritaires, les trous. Aucun courant ne peut circuler entre la source et le drain

2) $0 < V_G<V_T$(V_T = tension de seuil)– les trous sont repoussés vers le substrat. C'est le régime de déplétion. Aucun courant ne peut circuler dans le canal entre la source et le drain.

3) $V_G>V_T$ -les trous du substrat dans le canal seront repoussés pour laisser la place aux porteurs minoritaires, les électrons. Si maintenant le drain est porté à un

potentiel V_D supérieur à la source, alors les électrons s'écoulent de la source vers le drain en créant un courant de drain I_D.

La tension de seuil, V_T, est donnée par formule 3.10.

$$V_T = (W_S)_M - (W_M)_{SC}) + \frac{Q_b}{C_{ox}} - \frac{Q_{it} + Q_f}{C_{ox}} + 2.\phi_f \qquad (3.10)$$

où W_{SM}, W_{SC} représente le travail de sortie du métal et du semi-conducteur, respectivement, ϕ_f est la différence de potentiel entre le niveau de Fermi E_F du silicium dopé et son niveau intrinsèque E_i, Q_b est la charge de la couche de déplétion, Q_f présente la charge fixe dans l'isolant, Q_{it} est l'état de charge à l'interface semiconducteur-oxyde de silice, C_{ox} est la capacité de l'isolant de grille par unité de surface.

Selon V_D, on distingue deux régimes de fonctionnement

1) $V_D < V_G - V_T$ – le régime est dit linéaire, le courant de drain est donné par la formule 3.11.

$$I_D = \mu C_{ox} \frac{W}{L}\left[(V_G - V_T)V_D - \frac{V_D^2}{2}\right] \qquad (3.11)$$

où μ représentent la mobilité des électrons dans le canal, C_{ox} la capacité de l'isolant, W et Z la largeur et la longueur du canal respectivement.

Puis, au fur à mesure que la tension de drain augmente, la densité des électrons dans la couche d'inversion diminue, l'épaisseur de la couche d'inversion se réduit à zéro, et la conductivité du canal va jusqu'à s'annuler au voisinage du drain. On parle de pincement (Pinch-off) du canal au niveau du drain [3,4]. Dans ce cas, la tension de drain $V_D = V_G - V_T$. La tension de drain et le courant de drain sont donc appelés tension de saturation et courant de saturation, respectivement (figure 3.8).

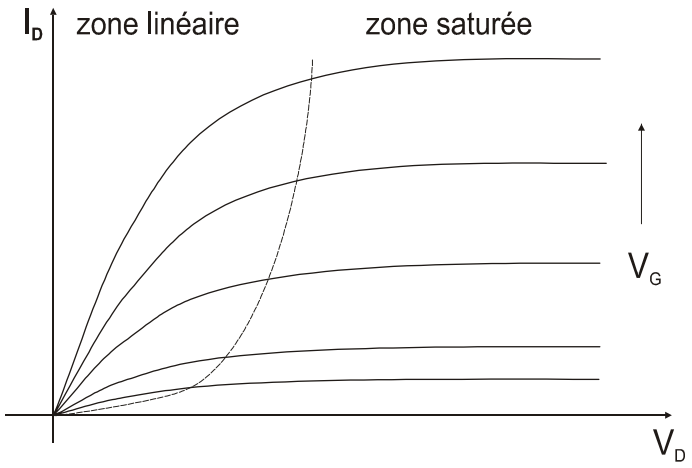


Figure 3.49. Variation du courant de drain en fonction de la tension de drain V_D à tension de grille V_G constante

2) $V_D > V_G - V_T$ - lorsque la tension de drain augmente au-delà de la tension de saturation ($V_D > V_G - V_T$), le point de pincement se déplace vers la source et le courant de drain reste quasiment constant. Dans cette région, on est en régime dit de saturation, et l'expression du courant de drain est donnée par la formule 3.12;

$$I_D = \mu_n \frac{W.C_{OX}}{2.L}(V_G - V_T)^2 \qquad (3.12)$$

où μ_n est la mobilité moyenne des électrons dans le canal.

La figure 3.9 présente d'une façon différente la relation courant de drain-tension de grille. Lorsque la tension de grille est très petite par rapport à V_D ($V_D > V_G - V_T$), le courant de drain se situe dans la zone saturée. Puis, une augmentation de la tension de grille fait que le courant de drain devient linéaire ($V_D < V_G - V_T$).

Nous observons une dérive de la linéarité pour une forte tension de grille V_G. Celle-ci proviendrait d'une part de la modification de la mobilité des électrons dans le canal sous l'action d'un champ électrique important à la surface du semi-conducteur et d'autre part, une partie de la tension de drain appliquée ne se retrouve pas totalement aux bornes du canal, mais serait perdue aux bornes des résistances séries de la source et du drain.

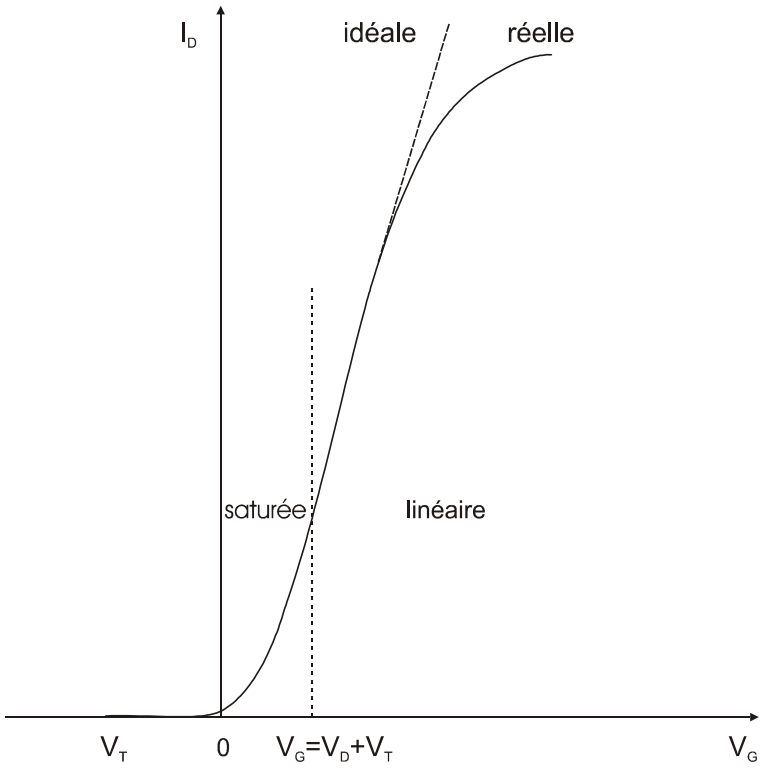


Figure 3.50. Variation du courant de drain ID en fonction de la tension de grille VG

Dans le cas d'un ISFET nous travaillons dans le régime linéaire ce qui permet d'avoir des variations linéaires de I_D en fonction de la tension de grille V_G.

3.2.2. Les ISFETs

l'ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) est, en fait, un transistor MOSFET (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) dont l'électrode de grille est remplacée par une combinaison d'une membrane sélective d'ions (ISE) dans une solution analytique et d'une électrode de référence (figure 3.10). L'ISE peut être SiO_2, Al_2O_3, Si_3N_4 ou Ta_2O_5 dans le cas de détection des variations de pH.

Le premier ISFET fut développé par Bergveld [5]. Il utilisait la silice nue de l'oxyde de grille d'un transistor à effet de champ. Ce matériau obtenu par oxydation thermique du silicium est réputé pour la qualité électronique de l'interface Si/SiO_2 qu'il procure. Cependant, très vite, certains auteurs se sont rendus compte que la sensibilité au pH n'était ni Nernstienne ni linéaire (30 à 35 mV/pH) et qu'il constituait une mauvaise barrière de diffusion aux ions. De plus, son hydratation causait une hystérésis lors de la réponse au pH ainsi qu'une instabilité des propriétés électriques du détecteur [6].

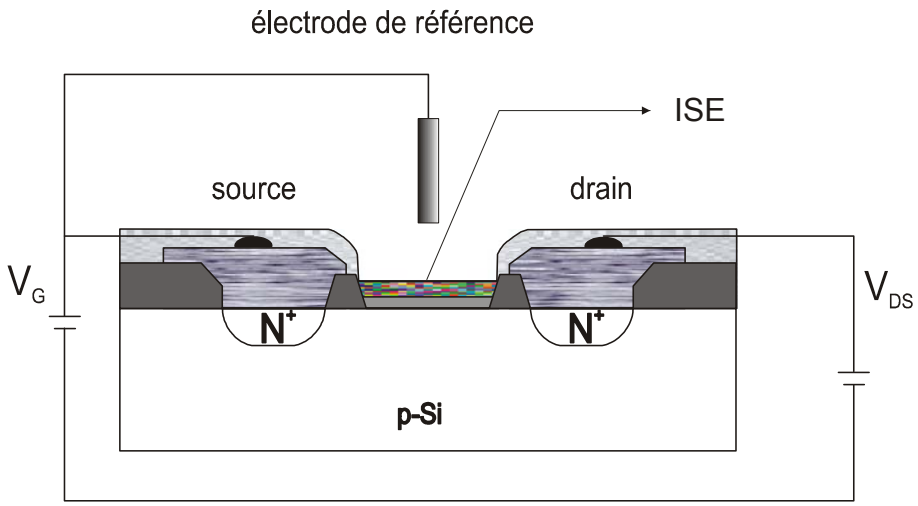


Figure 3.51. Schéma d'un capteur ISFET

Cette silice a donc été remplacée par de l'alumine (Al_2O3), déposée par CVD (Chemical Vapor Deposition). Ce matériau présente une bonne stabilité en milieux aqueux avec une sensibilité d'environ 55 mV/pH [7]. Cependant, deux mécanismes limitent la précision de la mesure: le premier est la dérive du potentiel de bande plate, due à la diffusion des charges positives (protons) dans l'isolant. Cette dérive peut, toutefois, être minimisée par un simple recuit [8]. Le second est l'hystérésis. Lorsque l'ISFET est exposé à des variations de pH trop importantes dans l'électrolyte, ceci provoque des interactions chimiques entre la surface de l'isolant et l'électrolyte. Des tests effectués en milieu acide montrent moins d'hystérésis [9]. Il faut rajouter aussi que l'alumine est un oxyde amphotère qui peut réagir à la fois avec des acides et des bases fortes – ce qui va dégrader la qualité de la membrane.

Par ailleurs, l'oxyde de tantale (Ta_2O_5), préparé par oxydation thermique du tantale [10] et de sensibilité 57 mV/pH [11], présenterait une stabilité à long terme et serait peu influencé par des expositions à la lumière du jour [12].

En ce qui concerne l'isolant nitrure de silicium (Si_3N_4), préparé par différentes techniques CVD, LPCVD (Low Preesure CVD) [13], PECVD (Plasma Enhanced CVD) [14], photo-CVD (excitation lumineuse) [15], la sensibilité au pH est de l'ordre de 56 mV/pH [16]. Des études ont montré qu'il existe une corrélation entre la sensibilité au pH et le contenu en hydrogènes des sites Si-NH présents dans le nitrure de silicium [17]. De même, il a été montré que comme pour les couches

diélectriques précédentes le nitrure de silicium présentait lui aussi un phénomène d'hystérésis.

Dans le cadre de ce travail la membrane utilisée est de l'oxyde de tantale préparé d'abord par dépôt d'une couche de tantale par sputtering au-dessus de la couche d'oxyde de grille suivi par l'oxydation du tantale.

3.2.3. Principe de la mesure

Nous venons de parler de la structure de l'ISFET mais il reste toujours une question à résoudre 'comment mesurer la concentration de protons ou pH dans une solution en utilisant un ISFET?' Il y a, en fait, plusieurs théories permettant d'expliquer ce phénomène. Nous présenterons deux théories: celle de Nicolski et Eiseman [18] et celle de Siu et Cobbold [19].

Dans la première théorie dite d'échange d'ions, les auteurs ont utilisé une extension de l'équation de Nernst. Cette méthode est adaptée à des électrodes conventionnelles, en polymère ou en verre dont les membranes sont épaisses. En revanche elle semble moins bien adaptée au cas des ISFETs pour lesquels les membranes sont fines.

Sui et Cobbold ont expliqué le mécanisme de réponse de l'ISFET en utilisant le modèle de liaison par sites ('sites binding theory'). Selon eux, la réponse de l'ISFET aux variation de pH n'est pas causée par la diffusion des ions hydrogène dans la couche isolante car cette diffusion nécessiterait beaucoup trop de temps (ordre de grandeur par secondes comme ce que étaient observées dans les électrodes conventionnelles) par rapport aux temps de réponse observés (millisecondes). A partir de cette observation, ils ont supposé que les réactions des protons et de la membrane inonosensible n'ont lieu qu'à l'interface oxyde – électrolyte.

En fait, il existe toujours des groupements OH à la surface de l'oxyde et ils agissent comme des sites amphotères (figure 3.11) pour les réactions chimiques lorsqu'ils sont mis en contact avec un analyte. C'est-à-dire qu'ils peuvent être neutre, donneur de protons (propriété acide), ou accepteur de protons (basique). Ainsi, deux constantes d'équilibre K_a et K_b sont définies caractérisant l'acidité ou la basicité des sites OH (prenons le cas d'un ISE et SiO_2 comme exemple).

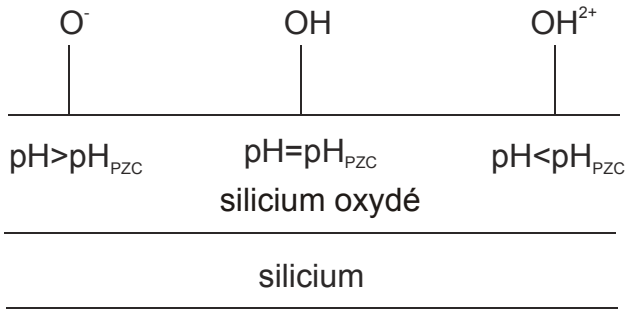


Figure 3.52. Présentation de l'interface isolant/électrolyte d'un ISFET

A pH>pH_{PZC}, nous avons

$$Si-OH \leftrightarrow Si-O^- + H_S^+ \text{ avec } K_a = \frac{[H_S^+][Si-O^-]}{[Si-OH]} \tag{3.13}$$

A pH<pH_{PZC}

$$Si-OH + H_S^+ \leftrightarrow Si-OH_2^+ \text{ avec } K_b = \frac{[Si-OH_2^+]}{[SiOH][H_S^+]} \tag{3.14}$$

avec $[H^+_S]$, la concentration en proton à la surface de la couche ionosensible.
La distribution des concentrations en protons à la surface $[H^+_S]$ et en solution $[H^+]$ obéit à la statistique de Boltzmann;

$$[H_S^+] = [H^+]\exp(-\frac{q\psi_0}{kT}) \tag{3.15}$$

Dans ces conditions, la tension de seuil, dans le cas de l'ISFET, se calcule par l'équation 3.16.

$$V_T = (E_{ref} - \psi_o + \chi_{sol}) - \phi_S + \frac{Q_b}{C_{ox}} - \frac{Q_{it} + Q_f}{C_{ox}} + 2.\phi_f \tag{3.16}$$

En reprenant l'expression de la tension de seuil du MOSFET (eq. 3.10), on peut écrire que:

$$(W_S)_M = E_{ref} - \psi_0 + \chi_{sol} \tag{3.17}$$

où E_{ref} est le potentiel absolu de l'électrode de référence, χ_{sol} la chute de potentiel due aux dipôles situés à l'interface isolant/solution; Ψ_0 la chute de potentiel à l'interface isolant/électrolyte.

Il a été montré que pour une concentration élevée de l'électrolyte (supérieure à 0,1M), le potentiel de surface peut s'exprimer suivant l'équation suivante;

$$\psi_0 = 2.303\frac{kT}{q}\frac{\beta}{\beta+1}(pH_{PZC} - pH) \tag{3.18}$$

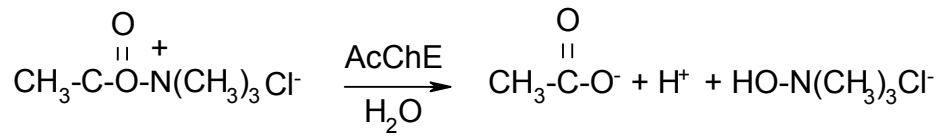
avec k la constante de Boltzman, T la température (K), β le paramètre de sensibilité, caractéristique de l'isolant et proportionnel au nombre de sites sinlanol N_S, dans le cas de la silice, β peut s'exprimer selon l'équation 3.19:

$$\beta = \frac{2q^2 N_s}{K_{OH}^{0.5} C_S kT} \tag{3.19}$$

où q est la charge élémentaire, K_{OH}=Ka/Kb, Cs la capacité de la couche de Stern et enfin pHpzc le pH pour lequel la charge de surface de la silice est nulle.
Cette équation n'est valable que si $\beta > q\Psi_0/kT$. Elle met en évidence la dépendance de Ψ_0 vis-à-vis de la concentration en ions H^+.
La valeur du paramètre de sensibilité β est différente suivant l'isolant: pour la silice β=0.14, pour alumine β=4.8 [20], pour le nitrure de silicium β = 0.96 [21], pour l'oxynitrure de silicium β=2.35 [22].

3.2.4. Les ENFET

Le terme ENFET (Enzyme Field Effect Transistor) a été proposé par Janata et Moss [23] en 1976. Son principe est analogue à celui des électrodes spécifiques enzymatiques: la réaction enzymatique décompose un substrat en une espèce facilement détectable, le proton par exemple, dans le cas des ISFET.



(3.20)

Dans le cas où une enzyme, acétylcholinestérase (AcChE) par exemple, est déposée à la surface de la couche sensible de l'ISFET pH nous obtenons un biocapteur appelé ENFET. Lorsque l'enzyme est en contact avec le substrat (le chlorure d'acétylcholine), la réaction enzymatique provoque une production de protons qui

génère un changement de pH dans la membrane enzymatique, équation 3.20. Cette variation est tout de suite détectée par l'ISFET.

3.2.5. Système de mesure du capteur ISFET

3.2.5.1. Mesure simple

Il existe trois méthodes pour mesurer la réponse du capteur ISFET. On peut, d'abord, maintenir V_G constant et mesurer directement I_D, ou mesurer V_G ou V_S en gardant I_D constant.

1). Mesure de I_D à V_D et V_G constantes

Le montage de cette méthode est très simple mais les résultats obtenus sont difficilement exploitables (figure 3.12) [24, 25]. L'information est portée par le courant I_D.

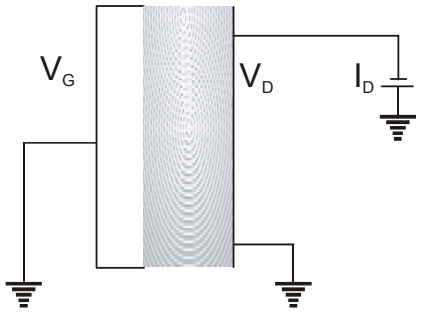


Figure 3.53. Circuit de mesure pour l'ISFET à courant de drain variable

Des tests ont été effectués sur ce type de polarisation [26] et il en résulte que le réseau de caractéristiques de sortie d'un ISFET ($I_D=f(V_D)$) se décale verticalement pour deux pH différents.

Dans ce mode de polarisation, la variation du courant I_D qui traduit la sensibilité, n'est pas linéaire en fonction de V_G. Cette sensibilité dépend de la valeur de V_D et plus précisément de la zone de fonctionnement de l'ISFET: régime linéaire ($V_{DS}<V_{GS}-V_T$) ou celle saturée ($V_{DS}>V_{GS}-V_T$).

De même, l'information portée par le courant I_D peut être influencée par les résistances d'accès au drain et à la source de l'ISFET: R_S et R_D(figure 3.13). Leurs valeurs dépendent de la technologie de fabrication du capteur. Il sera donc nécessaire d'effectuer un étalonnage préliminaire avec un MOSFET.

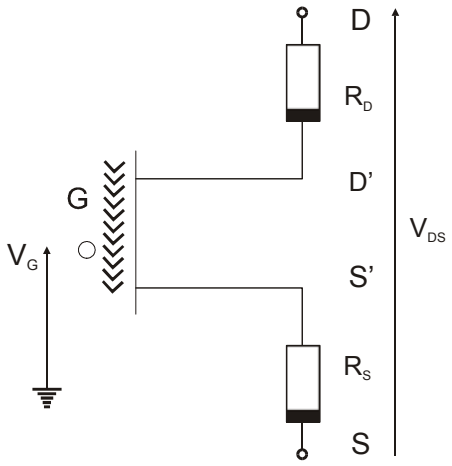


Figure 3.54. Schéma d'un ISFET avec ses résistances parasites de drain et de source

Il a aussi été montré que le courant de drain dépend du potentiel de surface Ψ_0 et donc de la concentration de la solution. Ainsi, les problèmes liés à l'évolution de la sensibilité et à l'effet parasite des résistances font que ce type de polarisation n'est pratiquement jamais utilisé.

2). Mesure de V_G à I_D et V_D constants

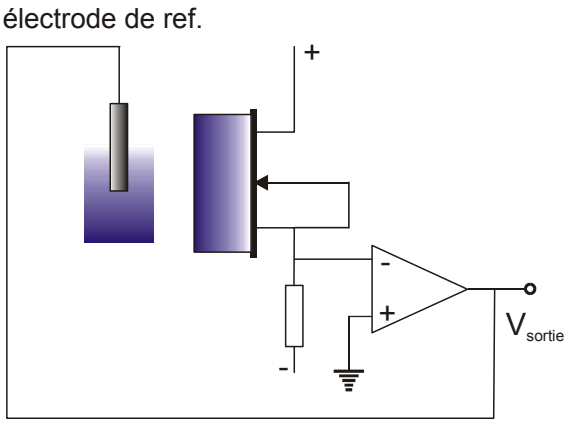


Figure 3.55. Circuit de mesure pour ISFET avec "feedback' à l'électrode de référence

Dans ce cas, nous mesurons les variations du potentiel de grille V_G appliquées à l'électrode de référence. Le courant de drain est maintenu constant, cf. I_D à V_D et V_G constantes, autrement dit le circuit fonctionne en mode asservissement (feed-back) à électrode de référence (figure 3.14). Cependant, deux inconvénients subsistent. D'une part, ce système nécessite une référence pour chaque ISFET utilisé ce qui limite les possibilités de multi-détection et d'autre part la solution ne doit pas être mise accidentellement à la masse.

3). Mesure de V_S à V_D et I_D constants

C'est le mode de polarisation le plus couramment utilisé (figure 3.15). Dans ce système, l'électrode de référence est liée à la masse ou placée à un potentiel fixe qui peut être la référence de la tension. Une source de courant constante maintient le courant de drain I_D à une valeur fixe. La variable de sortie est ajustée de manière à maintenir I_D constant et va suivre chaque changement du potentiel de surface Ψ_0. Le signal de sortie est mesuré à la source de l'ISFET: c'est le mode de fonctionnement 'source follower' [27].

Le fait d'utiliser une référence commune à plusieurs ISFETs permettra l'application de la mesure différentielle et aussi l'intégration de multicapteurs intégrés. Les grilles de tous les capteurs seront au même potentiel électrique, celui de la solution, et chaque capteur aura son propre circuit de polarisation.

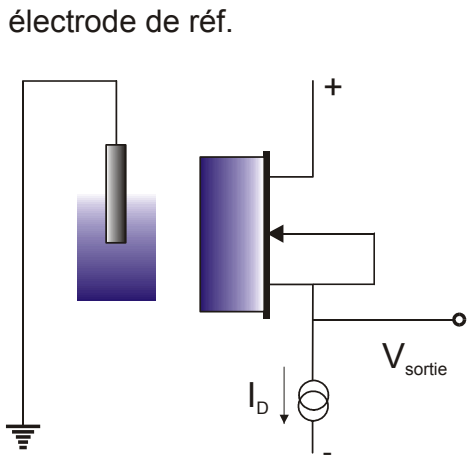


Figure 3.56. Circuit de mesure pour ISFET de type "Source Follower"

En travaillant à courant I_D constant, nous minimisons l'influence des résistances séries parasites du capteur (R_S et R_D). Ce circuit permet de contrôler de façon indépendante le courant I_D et la tension V_S aux bornes du capteur. De plus, pour caractériser le point de polarisation du capteur, il faut définir les valeurs I_D et V_D de polarisation en tenant compte entre autres de la sensibilité du capteur, de la dérive en température et de la dérive en temps.

Un ISFET peut être polarisé soit en mode linéaire soit en mode saturé. Or, il a été démontré qu'en mode de polarisation I_D et V_D constants, la sensibilité de l'ISFET est la même en zone linéaire et en zone saturée et que l'influence de la valeur de la

tension V_D sur la sensibilité de l'ISFET est négligeable. Le choix du point de polarisation sera donc lié uniquement aux problèmes de dérives du capteur.

Les coefficients de dérive thermique des ISFETs sont très variables: de 1mV/°C à 13 mV/°C [28]. Cette dispersion des valeurs montre la complexité de l'influence de la température. Celle-ci est fonction de l'électrode de référence, de l'électrolyte, des potentiels d'interface et de la tension de seuil de la structure MOS équivalente de la partie solide du capteur ISFET, mais aussi des paramètres technologiques tel que le dopage du substrat, les charges dans la structure et le greffage de l'isolant.

Il a donc été défini expérimentalement une zone de polarisation à l'intérieur de laquelle la dérive thermique sera minimale [29] et le signal de sortie peu influencé par la température. Ainsi, le point de polarisation que nous avons retenu est tel que I_D=100µA et V_D=0, 5 V, ces valeurs répondent bien à celles qui ont été discutées dans les dernières étapes du chapitre 2 (cf. figure 2.20, 2.21). Ce choix nous place dans la zone dite linéaire de la caractéristique de sortie du capteur ISFET $I_D(V_G)$ mais surtout il nous permet d'obtenir des dérives thermiques linéaires et donc plus facile à compenser. Ainsi, ce système de polarisation permet de mesurer le potentiel V_S, de s'affranchir de l'influence des résistances parasites du capteur, d'avoir une sensibilité stable et enfin d'utiliser une référence commune à plusieurs ISFETs.

3.2. 5.2. Système de mesure différentielle

La mesure différentielle nécessite l'utilisation de deux capteurs, un ISFET sensible à l'espèce à doser et un autre insensible – REFET (Reference Field Effect Transistor). Ils doivent présenter des caractéristiques électriques indentiques[29, 30]. Le circuit de mesure différentielle que nous avons choisi, permet une polarisation séparée en courant et en tension pour l'ISFET et le REFET. Nous mesurons une tension à la source des deux capteurs (cf paragraphe V_S à V_D et I_D constants).

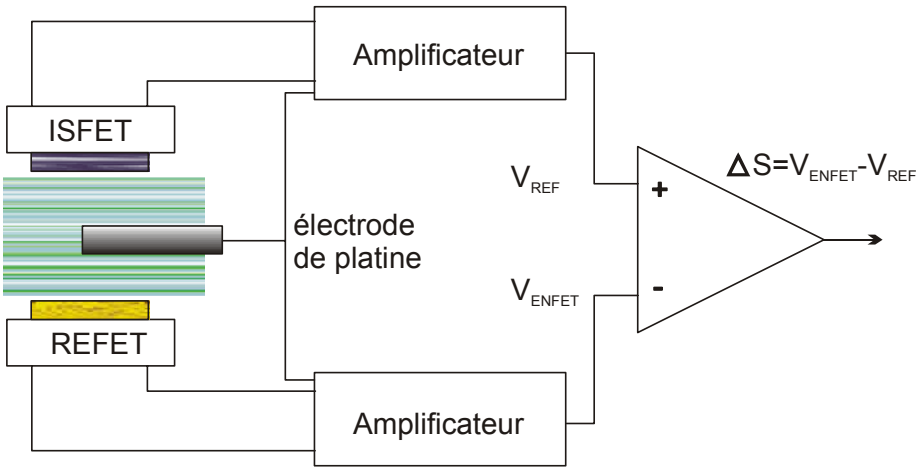
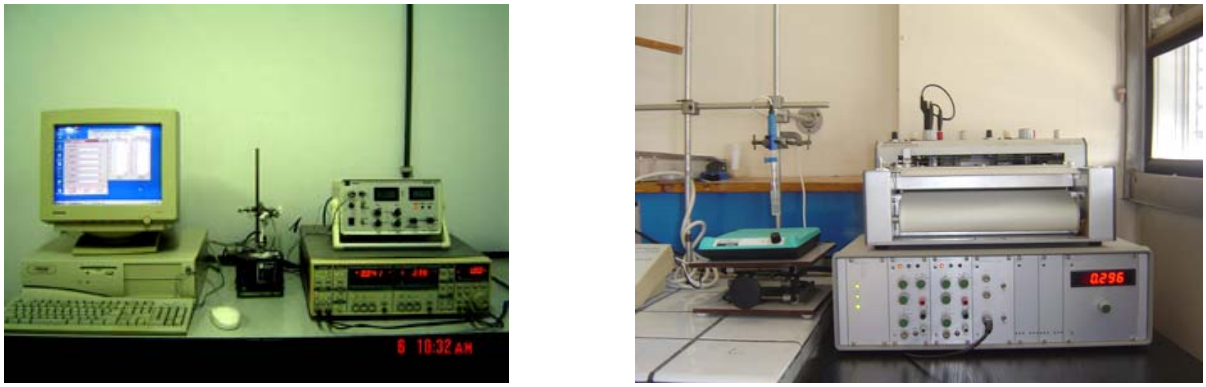


Figure 3.57. Schéma du principe de la mesure différentielle

On annule ainsi les interférences éventuelles entre les polarisations des deux dispositifs. De plus, ce circuit offre la possibilité de remplacer l'électrode de référence au calomel par une électrode de platine [31] et ainsi, de miniaturiser l'ensemble capteur-électrode de platine pour, par exemple, l'intégration dans un système à flux continu FIA (Flow Injection Analysis). Chacun des deux ISFET se connecte à un amplificateur (figure 3.16) le même utilisé lors de la mesure individuelle du paragraphe V_S.



(a) (b)

Figure 3.58. L'amplificateur d'ISFET à l'ITIMS

Nous utilisons les mêmes valeurs de courants de drain et de tension drain-source. L'amplificateur permet de faire la différence entre ces deux potentiels de sortie. Nous mesurons donc $\Delta V=V_{ISFET}-V_{REF}$ par rapport à une pseudo-référence de platine. La réponse est visualisée sur un enregistreur.

Deux amplificateurs d'ISFETs ont été utilisés dans ce travail provenant de la société Nereides Paris à l'ITIMS (figure 3.17.a) et de l'institut de microtechnologie Neuchatel, Switzerland, figure 3.17.b.

Conclusion

Cette étude permis de comprendre les principes de fonctionnement des capteurs utilisés dans notre travail. Nous avons montré les conditions dans lesquelles nous devions nous mettre afin d'obtenir des signaux exploitables.

Dans le chapitre suivant nous montrerons comment ces capteurs nous serviront à détecter les composés phénoliques et pesticides.

Références

[1]. Ngo Ngoc Ha. Development of biosensors based on Micro-electrodes to determine pesticide in water. Master thesis, ITIMS 2003, Hanoi university of Technology, 26.

[2]. S. Dzyadevich. *Elaboration of thin-film conductimetric biosensors*. 1992. Diploma Work, Kiev University.

[3]. A. Vapaille et R. Castagne, "Dispositifs et circuits intégrés semi-conducteur", Physique et Technologie, Dunod, (1987) 295.

[4]. H. Mathieu, Physique des semiconducteurs et des composants électroniques, Masson, (1987) 363.

[5]. P. Bergveld, "Development of an Ion-sensitive solid-state device for neurophysiological measurement", IEEE Trans. Biomed. Eng. 19, (1970) 70.

[6]. L. Bousse and P. Bergveld, Sensors and Actuators, 6(1), (1986) 65.

[7]. M. Esashi and T. Matsuo, IEE. Trans. Biomed. Eng, BME-35 (1978) 184

[8]. H.H. Van den Vlekkert, thèse Université Neuchâtel, (1988).

[9]. L. Bousse, H.H. Van den Vlekkert and N.F. De Rooij, Sensors and Actuators, B3 (1990) 103.

[10]. P. Gimmel, B. Gompf, D. Schmeisser, H.D. Wiemhofer et W. Gopel, Sensors and Actuators, 17 (1989) 195.

[11]. T. Matsuo and M. Esashi, Sensors and Actuators, 1 (1981) 77.

[12]. J.A. Voorthuzen and P. Bergveld, Sensors and Actuators, B1 (1990) 350.

[13]. L. Bousse, D. Hanfeman and N. Tran, Sensors and Actuators, B1 (1990) 361.

[14]. I. Kobayashi, T. Ogawa ans S. Hotta, Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 31 (1992) 336.

[15]. M. Lemiti, S. Audisio, J.C. Dupuy and B. Balland, J. of noncrystalline Solids, 144 (1992) 261.

[16]. T. Matsuo and K.D. Wise, IEE. Trans. Biomed. Eng., BME-21 (1974) 485.

[17]. Y. Vlasov, A. Bratov, M. Sidorova and Y. Taranov, Sensors and Actuators, B1 (1990) 357.

[18]. G. Eismain, "Glass electrodes for Hydrogen and other cations", Marcel Dekker, New York (1967). 2) G. Eismain, "Cation - selective glass electrode and their mode of operation", Biophys. J. 3, part 3, Suppl (1962) 259.

[19]. W. M. Siu and R. S. C. Cobbold, "Basic properties of the electrolytes - SiO_3- Si system: physical and theoretical aspects", IEEE Trans. Electron. Devices, 26 (1979)1805.

[20]. L. Bousse, N. F. De Rooij and P.Bergveld, IEE Trans. Electron. Devices, ED-30 (1983) 1263.

[21]. D.L. Harame, L. Bousse, J. D. Shott and J.D. Meindl, IEE Trans. Electron. Devices, Vol. ED-34, $N^0$8 (1987)1700.

[22]. J. M. Chovelon, Thèse à l'Ecole Centrale de Lyon, (1991).

[23]. J. Janata et S.D. Moss, Journal of Medical Engineering and Technology, 11, 7(1979)1939.
[24]. P.Bergveld, A.Van DenBerg, P.D. Van Der Wal, M.Skowranska Ptasinska, E.J.R. Sudholter et D.N. Reinhoudl, sensors and Actuators, 18 (1989) 309.
[25]. B. Van de Schoot, H. Woorhuijen et P. Bergveld, Sensors and Actuators, 12 (1987) 463.
[26]. K. Dzahini, Thèse à l'Ecole Centrale de Lyon, (1991).
[27]. P.Bergveld, and A. Sibbald, Analytical and Biomedical Applications of Sensitive Field Effect Transistor, Elsevier Publishers, Volume XXII (1986) 16.
[28]. W. Gui-Hua, Y. Dun and W. Yao-Lin, Sensors and Actuators, 11(1987)221.
[29]. H.H. Van den Vlekkert and N. F. De Rooij, Analysis, 16 (1988) 110.
[30]. H. Perrot, N. Jaffrezic-Renault, N. F. De Rooij and H.H. Van den Vlekkert, Sensors and Actuators, 20 (1989) 293.

CHAPITRE 4

DETECTION DE DERIVES PHENOLIQUES

TABLE DES MATIERES

4.1.	Les chlorophénols.	99
4.2.	Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions.	100
4.2.1.	Experimental	103
4.2.2.	Results ans discussions	105
4.2.3.	Conclusion	110
4.3.	Compléments d'information sur la membrane enzymatique	112
4.4.	Etude de l'influence de la température	114

4.1. Les chlorophénols

Le phénol et les dérivés phénoliques sont largement utilisés dans les procédés industriels. En effet ils sont présents lors de la production de pesticides, dans l'industrie du bois et sont un signe de pollution des eaux. Dès 1938, ces dérivés, très toxiques, étaient déjà reconnus comme une des causes possibles de maladies professionnelles. Pour éviter tout risque de contamination, des normes ont été fixées. Ainsi en Europe, la concentration totale maximale en composés phénoliques a été fixée à 0, 5 μg/l (chaque composé phénolique ne doit pas passer 0,1 μg/l) dans les environnements aquatiques.

Les chlorophénols, dérivé du phénol, ne comportant que quelques atomes de chlore servent surtout de produits intermédiaires dans la synthèse de phénols plus chlorés ou de dérivés des chlorophénols, tels que les herbicides à acide chlorophénoxyacétique. Certains chlorophénols peuvent aussi être formés par la chloration de substances humiques ou d'acides carboxyliques naturels au cours de la chloration de l'eau potable des réseaux publics de distribution. Le but de ce chapitre est de détecter le 4-chlorophénol dans l'eau par la mise au point d'un capteur de type ISFET à base de tyrosinase.

4.2. Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions

T. Mai Anh[a,b], S.V. Dzyadevych[a,c], A.P. Soldatkin[c,d], N. Duc Chien[b], N. Jaffrezic-Renault[d], J.-M. Chovelon[a]

a. LACE, UMR/CNRS 5634, Uninversity of Claude Bernard Lyon 1, 43, Boulevard du 11 Novembre1918,69622VilleurbanneCedex, France
b. International Training Institute for Materials Science, ITIMS Building, Dai hoc Bach Khoa 1 Dai Co Viet, Hanoi, Viet Nam
c. Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 150 Zabolotnogo St.,Kiev 03143, Ukraine
d. IFoS, UMR/CNRS 5621, Ecole Centrale de Lyon, BP 163, 69131 Ecully Cedex, France

Abstract

An enzyme biosensor for the determination of 4-chlorophenol in water solutions based on potentiometric pH-sensitive field-effect transistors as semiconductor transducer and tyrosinase immobilised in saturated glutaraldehyde vapours as biorecognition element has been described for the first time. The main analytical characteristics were studied under different conditions, as well as the possibility to optimise these working parameters. Different factors, such as pH of immobilisation, the enzyme loading and time of immobilisation in glutaralaldehyde vapours were investigated with regard to the influence on sensitivity, limit of detection, dynamic range, and operational and storage stability. The best result gives a limit of detection close to 20 ppm and a dynamic range from 25 to 1000 ppm with sensitivity 2 mV mM-1. The operational stability was ~ 15 h and the R.S.D. were ~ 3% for intra-sensors responses and ~ 7% for inter-sensors responses. The storage stability was ~15 days.

Keywords: Biosensor; pH-FET; Tyrosinase; 4-Chlorophenol

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

T.M. Anh et al. / Talanta 56 (2002) 627–634

Introduction

There is a continuous increasing demand for selective and sensitive detection of phenol and its derivatives in water solutions, since these toxic compounds are widely used in the manufacture of various industrial products, such as pesticides, disinfectants, fumigants, etc. [1]. Organophosphorous and chlorinated phenoxyacids also yield chloro- and nitrophenols as major degradation products [2]. Many of these phenolic compounds have toxic effects on animals and plants, of which they easily penetrate the skin and membranes, determining a broad spectrum of genotoxic, mutagenic and hepatoxic effects, also affecting the biocatalysed reaction rates in respiration and photosynthesis [3,4]. For these reasons, many of the phenols have been included in the environmental legislation.

The detection of phenols is usually accomplished using gas or liquid chromatography and spectrophotometry [5-7]. In order to reduce the chromatographic requirements, several selective sample clean-up procedures have been developed [8]. However, these techniques do not easily allow continuous on-site monitoring, are expensive, need skilled operators and generally require pre-concentration and extraction steps that are very time-consuming.

Biosensors represent promising tools to supplement already existing techniques, due to their unique characteristics, such as selectivity, relatively low cost of realisation, good storage, potential for miniaturisation and easy automation, which could lead to the construction of simple portable devices for fast screening purposes and for in-field/on-site monitoring. In particular, several biosensors based on tyrosinase were elaborated for determination of phenols. They include various kinds of electrochemical detection, such as detection of dioxygen consumption [9], direct reduction of generated o-quinone [10] and mediated reduction of o-quinone by hexacyanoferrate(II) [11]. The tyrosinase has been immobilised on the electrode surface as a thin film or in a membrane on a Clark oxygen electrode [12,13], chemically bonded to a solid graphite electrode [11,14] or controlled-pore glass [15] and using electropolymerisation of an amphilic pyrrole derivative-enzyme mixture [16]. All these articles describe voltamperometric and amperometric tyrosinase biosensors.

Biosensors based on semiconductor structures have received considerable attention, since it was expected that the innovative potential of microelectronics might result in the appearance ofnew biosensor technologies. These technologies are well-adapted to the large-scale production of miniaturised devices. The final aim of the biosensor research is the development of inexpensive, reliable and simple devices suitable for rapid, sensitive and selective analytical tests. The ionsensitive field-effect transistors (ISFETs) were introduced by Bergveld in 1970 [17] and used, for the first time, for penicillin detection by Caras and Janata in 1980 [18]. Since 1980, many articles have been published about biosensors based on ISFETs, especially on the basis of pH-sensitive field-effect transistors (pH-FETs): enzyme sensors (ENFET) [19–21], cell sensors [22,23], immune sensors [24] and sensors for direct analysis of protein concentration [25].

In the case of pH-FET-based biosensors, the electrical signal depends on the surface potential of the dielectric of the transistor's gate. This surface potential can be modified by an accumulation of charges at the dielectric surface of the FET gate and, in the case of a pH-FET, it can be caused by pH variations occurring near the transistor's gate. The ENFET is based on the principle of such a pH change locally occurring inside the sensitive membrane (deposited on the FET gate), caused by one enzymatic reaction involving the substrate to be assayed. Fig. 1 shows that tyrosinase (polyphenol oxidase; PPox) could be used as the enzyme associated to ENFET for detection of phenols, since a subsequent local decreasing of concentration of protons inside the membrane occurs (first step of the reaction). Indeed, the conversion of phenols by tyrosinase proceeds in two consecutive steps involving molecular oxygen. The first step is referred to as the enzyme's hydroxylase activity (also cresolase activity), where phenol is hydroxylated with the aid of molecular oxygen to produce catechol (ohydroquinone). In the second step, known as enzyme's catecholase activity, catechol is oxidised to an o-quinone and simultaneously, tyrosinase is oxidised by oxygen to its original form with the production of water.

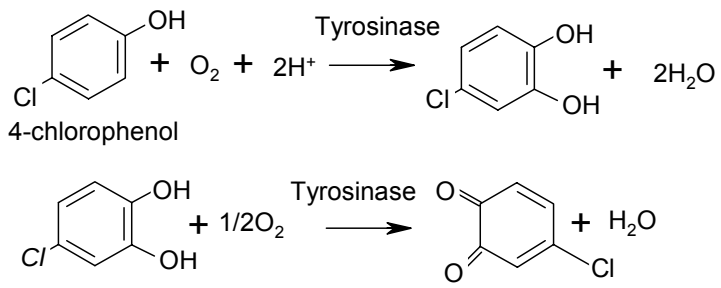


Fig.1. Scheme of reaction with tyrosinase.

Tyrosinase contains copper, which forms part of the prosthetic group in its active site and acts as a built-in carrier undergoing reversible oxidation and reduction of the enzyme.

This paper describes, for the first time, a biosensor based on potentiometric pH-sensitive field-effect transistor (pH-FET) including tyrosinase as biorecognition element for 4-chlorophenol determination in water solutions. The main analytical characteristics of biosensor developed here were studied under different conditions and the possibilities to optimise these working parameters were investigated. These performances are recommended in accordance with standard IUPAC protocols or definitions [26] and include calibration characteristics (sensitivity, operational and linear concentration range, detection and quantitative determination limits), selectivity, steady-state response time, reproducibility, stability and lifetime.

4.2.1. Experimental

4.2.1.1. Reagents

Tyrosinase (Polyphenol oxidase; PPox) (EC 1.14.18.1, 6680 U/mg) from mushroom, bovine serum albumin (BSA), 4-chlorophenol and aqueous solutions (25% w/v) of glutaraldehyde (GA) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). All other chemicals were of analytical grade.

4.2.1.2. Sensor design

The used ISFET transducers were fabricated at the Research Institute of Microdevices (Kiev, Ukraine), International Training Institute for Materials Science (Hanoi, Vietnam) and ESIEE (93160-Noisy-le-Grand, France).

The sensor chip from the Research Institute of Microdevice (type A) contained two identical ISFETs with ion selective layer of Si_3N_4, of which the design and operational mode are given in Refs. [27, 28]. The ISFETs were operated in a constant source current and drain-source voltage mode (Is= 200 μA, Vds = 1 V). The bare substrate of the sensor chip was used as a quasi-reference electrode. The pH-sensitivity of the ISFETs was linear in the range from 2 to 12 pH with the slope of 30–40 mV pH^{-1}.

The sensor chip from the International Training Institute for Materials Science (type B) used both ISFETs, which can work at Is= 200–500 μA, Vds = 0.2–1 V. These had a silicon dioxide as an ion selective layer. The output signal of the sensors was linear in the range pH of 2.5–8 with the slope of 11–13 mV pH^{-1} [29].

The sensor chip from ESIEE (type C) included one ISFET with an implanted channel, whose threshold voltage was around - 3 V. It was operated at Is= 200 μA, Vds = 1 V. Its pH sensitivity due to a Si3N4 sensitive layer was 15 mV.pH^{-1}.

All used ISFET transducers were shown similar operational characteristics. All experiments were conducted with different transducers, but best pH-sensitivity and stability were obtained for ISFETs from Research Institute of Microdevice (type A).

4.2.1. 3. Enzyme immobilisation

The biologically active membranes were formed on the ISFET surface by cross-linking of enzyme with bovine albumin in a saturated glutaraldehyde vapour [21]. The 10% solutions of tyrosinase and BSA were prepared in 20 mM phosphate buffer. Prior to the deposition on a sensitive area of a transducer, these solutions were mixed and glycerol was added to the final concentration of 10%. As a differential experimental set-up was used, one drop of the enzyme-containing mixture was deposited on the working ISFET, while on the reference ISFET only a mixture containing 10% BSA and 10% glycerol was deposited. Then, the sensor chip was placed in saturated glutaraldehyde vapour for a certain time, called immobilisation time. After the exposure in glutaraldehyde vapor, the membranes were dried at room temperature for 10–15 min.

4.2.1. 4. Measurements

The measurements were conducted in daylight at room temperature (25 °C) in a glass cell. The sensor chip was immersed in a measuring cell filled with 5 ml of vigorously stirred phosphate buffer. The sensors were soaked in the buffer solution for 30 min to equilibrate the membrane system. After the initial drift of the output signal, 4-chlorophenol was added in the vessel. The differential output signal between the measuring and reference ISFET was registered using a laboratory ISFET-meter from the Institute of Microtechnology (Neuchatel, Switzerland) and the steady-state response of the biosensor was plotted as a function of 4-chlorophenol concentrations.

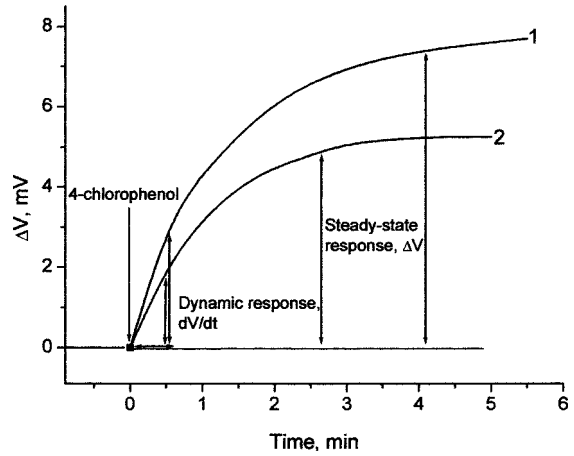


Fig. 2. A typical response curves of tyrosinase biosensor based on ISFETs type A for 4 mM (1) and 2 mM (2) 4-chlorophenol. Measurements were conducted in 5 mM phosphate buffer, pH 6.0.

4.2.2. Results and discussion

A typical dependence of the potentiometric tyrosinase biosensor response on the time after 4-chlorophenol additions to a vessel is shown in Fig. 2. After the biosensor reached a stable baseline in blank phosphate buffer solution, injection of 4-chlorophenol stock solutions into blank solution caused significant sensor response, which resulted from subsequent local decreasing of concentration of protons inside the membrane from the enzymatic oxidation of phenol. The steady-state pH value at the enzymatic layer–ISFET interface is a result of the balance between the rate of proton consumption due to the enzymatic reaction inside the membrane and the influx of H+ ions into the membrane via a carrier mediated

transport mechanism with buffer species acting as a carrier. ENFETs poor performance in highly buffered media is a direct consequence of an adverse effect of this mechanism. As can be seen, the biosensor steady-state response times, i.e. times necessary to reach 90% of the steadystate amplitude were ~3–4 min, which corresponded to five to ten measurements per hour. Measurements can be made much faster if not the steady-state but the dynamic response, i.e. maximum rate of the output voltage change (dV/dt), is determined. So, there are two basic ways for the enzyme biosensor calibration: first, when the steady-state response of the sensor is registered and second, when the dynamic response is measured.

It is well known that the choice of buffer may influence the enzymes activity. The most commonly used buffer in similar systems is phosphate

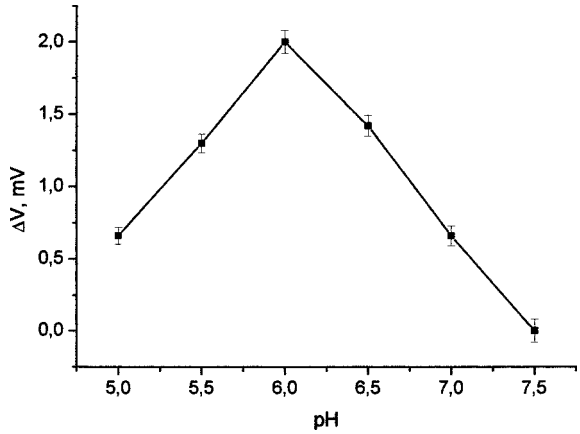


Fig. 3. Dependence of biosensor response on pH for 2 mM 4-chlorophenol. Measurements were conducted with ISFETs type C in 5 mM phosphate buffer with different pH, time of immobilisation 25 min.

Fig. 3 shows the variation of the response at different pH values in the carrier solution. It can be seen that an optimum for the sensor response was observed at solution pH 6.0. This result is in good agreement with results obtained for tyrosinase by other authors. Wang et al. [30] have reported a maximum response between pH 6.0 and 6.7. Ortega et al. [31] have discussed the effect of pH on the response of solid graphite and carbon paste electrodes modified with tyrosinase. In both configurations, the response for phenol and catechol showed an optimum at pH 6.0.

The pH in the immobilisation mixture may also influence the analytical characteristics of enzyme biosensors. Fig. 4 presents the calibration curves for 4-

chlorophenol determination with different pH of immobilisation mixture. Here, it is clearly seen that the sensitivity of biosensor is higher in the case of immobilisation at pH 6.0, i.e. the pH range where the tyrosinase activity is optimal. This pH of immobilisation mixture was selected for all further experiments. Also, the slope around 0 seems to be smaller than the slope around 2 mM. A possible reason for this phenomenon may be the fact that the phosphate buffer capacity inside the membrane passes through its maximum and any further increase in the intramembrane pH results effectively in the decrease of the buffercapacity, thus decreasing its adverse effect on the biosensor response. In the case of ENFETs, the decrease of the buffer capacity of the solution tested usually allows the achievement of a higher sensitivity and higher detection limit [20,23]. So, in 2 mM phosphate buffer at pH 6.0, the biosensor detection limit was close to 20 ppm (0.16 mM). The limit of detection was calculated for a signal-to-noise ratio of 3.

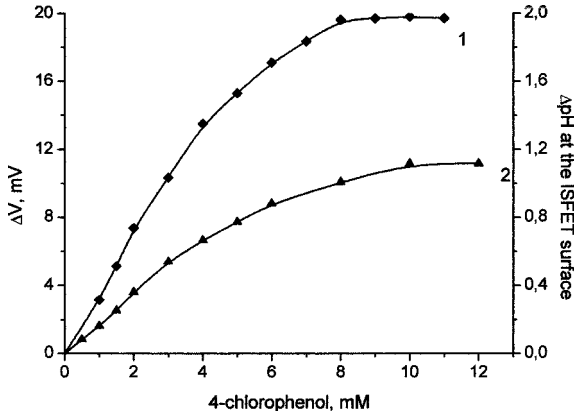


Fig. 4. Calibration curves for 4-chlorophenol determination with pH of immobilisation mixture of 6.0 (1) and 7.4 (2). Measurements were conducted with ISFETs type B in 5 mM phosphate buffer, pH 6.0, time of immobilisation, 30 min.

The effect of the enzyme loading in immobilisation mixture on tyrosinase biosensor response to 4-chlorophenol was investigated.

Different ratios tyrosinase/(BSA + tyrosinase) were tested to optimise the amount of loaded tyrosinase with the sensor response (Fig. 5). It can be seen that the best ratio for enzyme loading was ~0.4, generally containing 10% protein. For this ratio, the best combination of operational stability and response value was obtained.

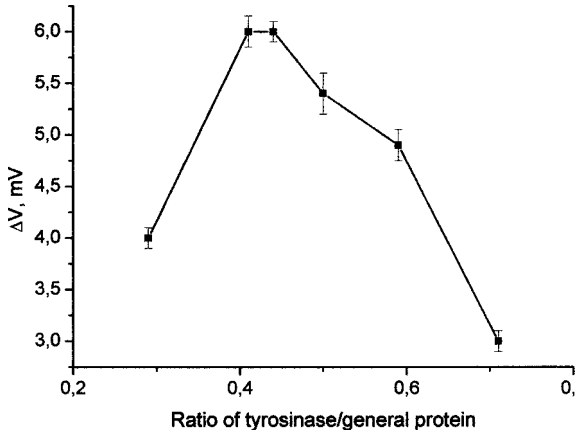


Fig. 5. Dependence of biosensor response on enzyme loading (ratio tyrosinase/ (tyrosinase + BSA)) for 4 mM 4-chlorophenol. Measurements were conducted with ISFETs type A in 5 mM phosphate buffer, pH 6.0, time of immobilisation, 30 min.

For higher concentrations of enzymes, all the substrate molecules are catalytically transformed at the very top of the membrane and so protons are too far from the transducer surface to induce a pH variation. On the other hand, if enzyme concentrations are too low, substrate can easily penetrate inside the membrane, but here as only a few enzymes are involved the catalytic degradation rate is very low and will lead only to a slight pH variation.

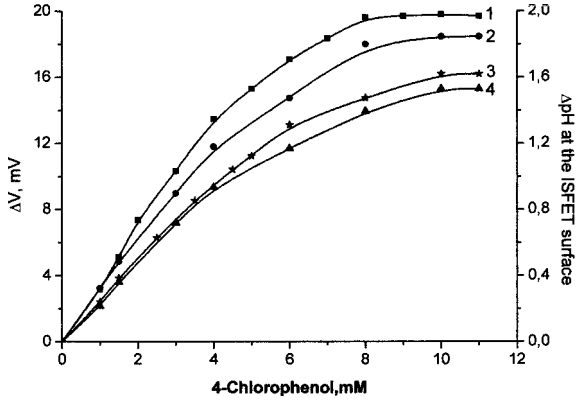


Fig. 6. Calibration curves for 4-chlorophenol determination with different times of immobilisation in GA vapor: (1) 30 min, (2) 20 min, (3) 15 min and (4) 10 min. Measurements were conducted with ISFETs type B in 5 mM phosphate buffer, pH 6.0.

Fig. 6 presents the calibration curves for 4-chlorophenol determinations with different times of immobilization in GA vapor. It can be seen that best results were obtained for 30 min immobilization. For longer immobilization time, a dramatic decrease of response values was obtained. This phenomenon can be connected

with the formation of a great number of covalent bounds between the glutaraldehyde and the enzyme molecules, which block enzyme active centers. The dynamic range (working concentration range) is determined by the lower and upper limits of quantification and was from 25 to 1000 ppm (0.2–7.8 mM) of 4-chlorophenol for 30 min immobilization with sensitivity of ~ 2 mV mM -1.

Since selectivity is also a very important characteristic, it was necessary to check it for the biosensor developed. According to 'The Recommended Definitions and Classification for Electrochemical Biosensors' [26], selectivity is expressed as a ratio of the output signal with the analyte alone and with the interfering substance alone at the same concentration as the analyte. The substrates of tyrosinase include a large variety of phenolic compounds with relevant significance in clinical analysis and control of environmental pollutants. Different phenols were tested. The response expressed as the percentage relative to 4-chlorophenol was: phenol 145%, 2-chlorophenol 65%, 4-chlorophenol 100%, 4-nitrophenol 27% and 4-aminophenol 44%. No detectable response was found for catechol, adrenaline and dopamine. This result has been expected because in the case of pH-ISFET, we used only first step of the enzymatic reaction (the cresolase activity). The biosensor based on pH-ISFET demonstrated rather a low selectivity to monophenolic compounds with no response to diphenolic compounds that is an advantage of a pH-transducing scheme compared to an oxygen-transducing scheme. If more detailed information for particular monophenolic compounds is required, the chromatographic separation can be used.

The response of the tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistor is reproducible; the R.S.D. of intra-sensor responses was ~3%. The R.S.D. of inter-sensor responses was ~7%.

The biosensor practicability is often limited by its operational and storage stability. These characteristics were therefore investigated. A test of operational stability demonstrated that the steady-state responses of all biosensors did not decrease too much for at least 15 h(Fig. 7). Intermittent/periodic calibrations could be useful for prolonged operation of our sensor.

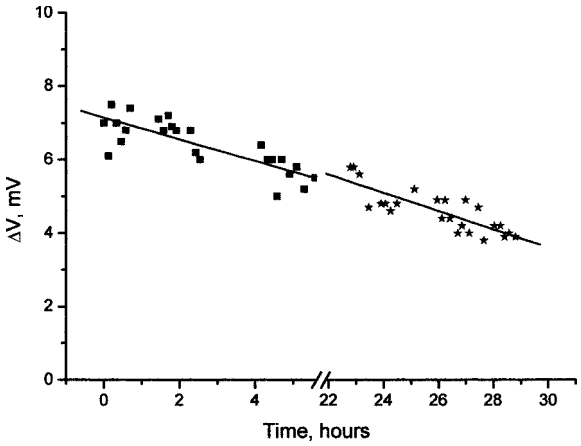


Fig. 7. Operational stability of the tyrosinase biosensor based on ISFETs type A. Measurements were conducted in 5 mM phosphate buffer, pH 6.0, 4-chlorophenol concentration, 4 mM. Time of immobilisation of tyrosinase in GA vapour, 30 min.

Storing electrodes dry in aluminium foil at + 4°C car ried out the experiments for long-term stability. A decreasing of response by ~13% was obtained after the first 5 days and then biosensor response was stable for ~11days (Fig.8)

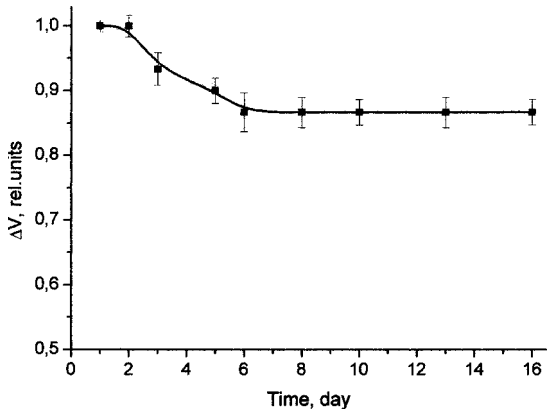


Fig. 8. Storage stability of the tyrosinase biosensor based on ISFETs type A kept dry at 4°C. Measurements were conducted in 5 mM phosphate buffer, pH 6.0, 4-chlorophenol concentration, 4 mM. Time of immobilisation of tyrosinase in GA vapour, 30 min.

4.2.3. Conclusions

The results presented in this work demonstrate for the first time that tyrosinase biosensors based on pH-sensitive field-effect transistors for determination of monophenols are feasible. The sensor proposed is relatively inexpensive, easy to operate and requires short analysis time compared with standard methods (e.g. HPLC). The main analytical characteristics of the biosensor created depend on conditions of membrane deposition.

The biosensor developed demonstrated rather a low selectivity to monophenolic compounds with no response to diphenolic compounds, that is an advantage of a pH-transducing scheme compared to an oxygen transducing scheme.

These biosensors created could be used also for the detection of diuron-type herbicides (atrazines, simazine, diuron, isoproturon, etc.) because these substances can inhibit the activity of tyrosinase [31].

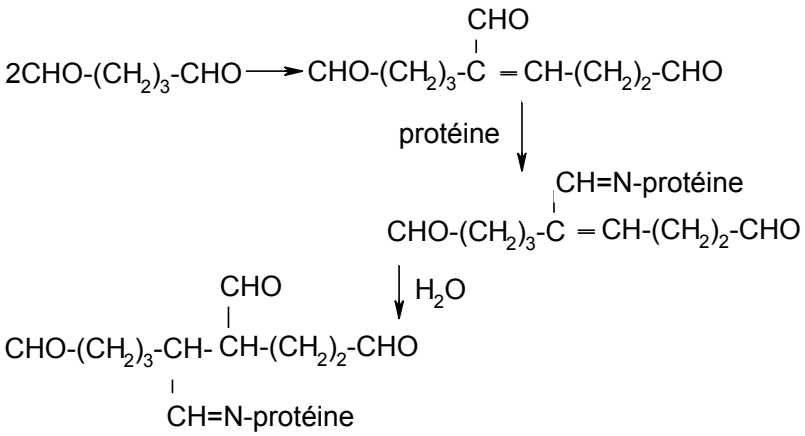
Acknowledgements

This work was supported by French CNRS, Department of International Relations (to TMA) and Department of Chemistry (to SVD). Sergei Dzyadevych is grateful also to 'Quatrième étage de Bât. J. Raulin de Université Claude Bernard Lyon 1' for the friendly climate and assistance in the work.

4.3. Complément sur la membrane enzymatique

Dans le premier chapitre, nous avons présenté la définition d'un biocapteur, celui-ci est constitué de deux composants: le transducteur et le biorécepteur. On peut dire que le capteur devient un biocapteur si un biorécepteur est fixé sur sa surface autrement dit le capteur est biofonctionnalisé.

Dans ce travail, nous avons biofonctionnalisé nos capteurs (les ISFETs et les conductimètres) en utilisant un système enzyme/protéine réticulé par le glutaraldéhyde (GA). La réaction avec le glutaraldéhyde en solution a été proposée par Richard et Knowles[32] ainsi que Mosan [33] (équation 4.3.1).



(4.3.1)

Le GA est un réactif bifonctionnel utilisé fréquemment pour le couplage des protéines. Il réagit avec les fonctions amines primaires et plus particulièrement avec les ε amines de la lysine des protéines. Le glutaraldéhyde couramment employé en biochimie permet donc de réticuler les protéines tout en conservant leur activité. Dans notre cas, des vapeurs de GA (Merck) ont été utilisées pour éviter toutes réactions non contrôlées de polymérisation. Seul le monomère se vaporise [21].

La membrane enzymatique, dans notre cas, est co-réticulée en présence d'une protéine dite de charge l'albumine de sérum bovin (BSA) pour permettre une meilleure répartition de l'enzyme sans altérer les propriétés mécaniques de la membrane obtenue.

La composition de la membrane enzymatique dépend de la densité de l'enzyme, autrement dit du pourcentage d'enzyme par rapport au BSA. Par ailleurs du glycérol

est rajouté dans la membrane pour améliorer sa plasticité et éviter des phénomènes de "retrait" de la membrane.

Il est bien évident que l'enzyme est active dans une certaine gamme de pH [cf. chapitre I- La dépendance de la température et du pH]. Le choix d'un pH optimal pour la membrane enzymatique permet une meilleure activité catalytique de l'enzyme. Au cours de cette étude nous avons déterminé que le pH optimal pour la tyrosinase devait être 6.0.

La composition de la membrane a été optimisée (cf. 4.2) et nous avons obtenus les valeurs suivantes 3,5% tyrosinase: 3,5% BSA, 18.75% KH_3PO_4 pH 6.0 et 10% de glycérol en masse (la densité de la *tyrosinase* est de 6000 unités par mg de solide).



Figure 4.59. Photo de de la membrane enzymatiques (tyrosinase+ BSA coréticulée par des vapeurs de GA). Photographié et filmé par le microscope optique OLYMPUS BX60, échelle 2000.

Sur la figure 4.1, on peut observer que les enzymes (zones noires), se co-réticulent avec le BSA, (zones transparentes). Cependant, la distribution des enzymes dans la membrane n'est pas homogène parce qu'il est difficile de bien mélanger le BSA avec les enzymes avant l'étape de la co-réticulation.

Au cours des analyses en solution, la membrane gonfle et une partie des enzymes en sortira. Une partie des enzymes seront perdue mais les signaux obtenus seront de meilleurs qualité. En effet, quand la membrane gonfle, elle devient poreuse (cf. figure 4.2) ce qui permet au substrat de mieux diffuser dans la membrane et de se mettre en contact avec les sites actifs où ont lieu les réactions enzymatiques.

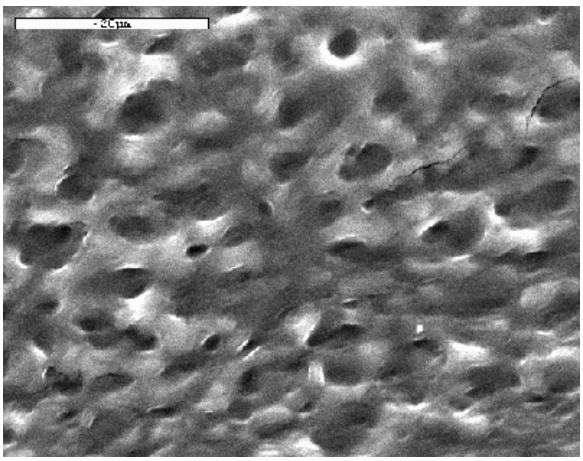


Figure 4.60.La structure de la surface de la membrane enzymatique après contact dans un tampon KH_2PO_4 pH 6.0. Image obtenue par SEM-XL30 Philips, échelle 20000.

4.4. Etude de l'influence de la température

Il est connu que la vitesse de la plupart des réactions enzymatiques s'élève quand la température augmente (cf. chapitre I – La dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis de la température et du pH). Ce phénomène peut déformer l'information obtenue lorsque l'on réalise des mesures à température non contrôlée. C'est la raison pour laquelle l'influence de la température doit être pris en compte si l'on réalise des mesures sur site.

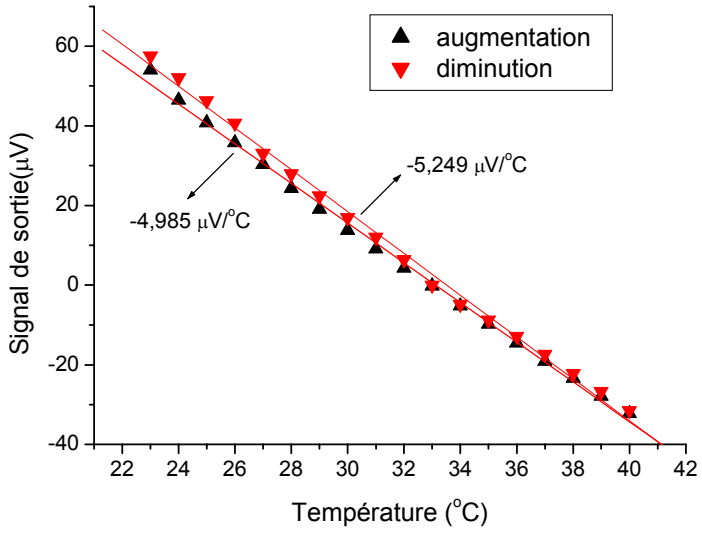


Figure 4.61. Influence de la température de capteur dans un tampon

Pour ce fait, on mesure le signal de sortie de capteur immergé dans un tampon en augmentant puis en diminuant la température.

Il est montré dans la figure 4.3 que la réponse du capteur dépend linéairement de la température lorsque le capteur est dans un tampon. La réponse ne dépend pas de la façon dont varie la température (augmentation ou diminution). La seule différence en ce qui concerne les deux réponses peut être attribuée à la dérive de signal.
On a utilisé la même procédure pour évaluer l'influence de la température lorsque le biocapteur est immergé en présence du substrat 4-chorophénol.

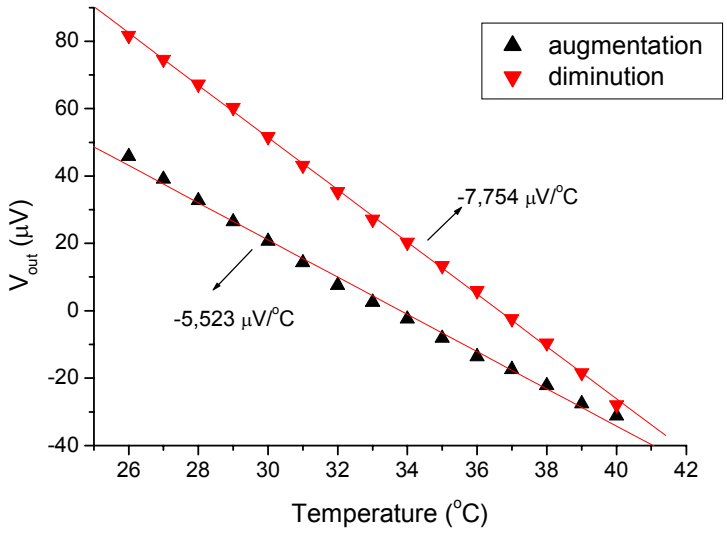


Figure 4.62. Influence de la température en présence du 4-chlorophénol

La figure 4.4 montre que la réponse du biocapteur dépend non seulement de la température mais aussi de la façon dont elle varie (augmentation ou diminution). Les modifications observées sur les signaux de sortie sont irréversibles car l'enzyme n'est pas capable de retrouver sa structure initiale lorsque la température change considérablement.
Enfin la figure 4.5 montre que l'augmentation de la température se traduit par une augmentation de la réponse du biocapteur pour des températures inférieures à 40°C. Celle-ci augmente d'environ 21,26% lorsque la température augmente de 5°C.

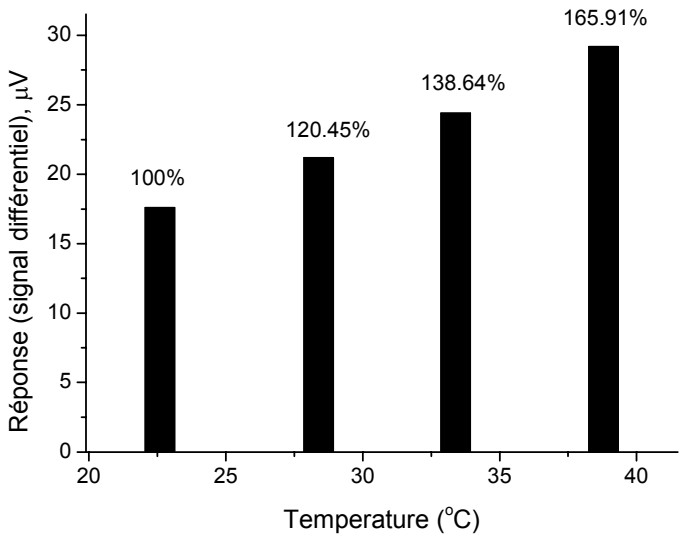


Figure 4.63. Influence de la température sur la réponse de biocapteur

Pour un résultat précis sur les analytes à doser on doit donc prendre en compte l'influence de la température. Pour ce faire, on peut maintenir la température constante par un thermostat en laboratoire ou rajouter sur le circuit de mesure un système de compensation thermique.

Références

[1]. F. Ortega, E. Domingues, E. Burestedt, J. Emneus, L. Gorton, G. Marco-Varga, J. Chromatogr. A 675 (1994) 65.

[2]. M. Castillo, R. Domingues, M.F. Alpendurada, D. Barselo, Anal. Chim. Acta 353 (1997) 133.

[3]. M.V. Reddy, G.R. Blackburn, C.A. Schreiner, M.A. Mehlman, C.R. Makere, Environ. Health Perspect. 82 (1989) 253.

[4]. J.W. Yager, D.A. Eastmond, M.L. Robertson, W.M.Paradisin, M.T. Smith, Cancer Res. 15 (1990) 393.

[5]. C.D. Chriswell, R.C. Chang, J.S. Fritz, Anal. Chem. 47(1975) 1325.

[6]. F. Bosch, G. Font, J. Mares, Analyst 112 (1987) 1335.

[7]. E. Delaye, G. Bohnon, A. Baron, J.F. Drilleau, J. Chromatogr. 555 (1991) 125.

[8]. G. Marco-Varga, D. Barselo, Chromatographia 34 (1992) 146.

[9]. S. Canofeni, S. Di Sario, J. Mela, R. Pilloton, Anal. Lett. 27 (1994) 1659.

[10]. P. Onnerfjord, J. Emneus, G. Marko-Varga, L. Gorton, F. Ortega, E. Dominguez, Biosens. Bioelectron. 10 (1995) 8.

[11]. J. Kulys, R.D. Schmid, Anal. Lett. 23 (1990) 589.

[12]. L. Macholan, Collect. Czech. Chem. Commun. 55 (1990) 2152.

[13]. L. Campanella, T. Beone, M.P. Sammartino, M. Tomasetti, Analyst 118 (1993) 979.

[14]. S. Cosnier, C. Innocent, Bioelectrochem. Bioenerg. 31 (1993) 147.

[15]. K. Zachariah, H.A. Mottola, Anal. Lett. 22 (1989) 1145.

[16]. S. Cosnier, I. Catalin Popescu, Anal. Chim. Acta 319 (1996) 145.

[17]. P. Bergveld, IEEE Trans. Biomed. Eng. 17 (1970) 70.

[18]. S. Caras, J. Janata, Anal. Chem. 52 (1980) 1935.

[19]. J. Kimura, Y. Kawana, T. Kuriyama, Biosensors 4(1989)41.

[20]. A.A. Shul'ga, A.K. Sandrovsky, V.I. Strikha, A.P. Soldatkin, N.F. Starodub, A.V. El'skaya, Sens. Actuat. B 10 (1992) 41.

[21]. S.V. Dzyadevich, Y.I. Korpan, V.N. Arkhipova, M.Y. Alesina, C. Martelet, A.V. El'skaya, A.P. Soldatkin, Biosens. Bioelectron. 14 (1999) 283.

[22]. Y. Kitagawa, E. Tamiya, I. Karube, Anal. Lett. 20 (1987) 81.

[23]. Y.I. Korpan, A.P. Soldatkin, N.F. Starodub, A.V. El'-skaya, M.V. Gonchar, A.A. Sibirny, A.A. Shul'ga, Anal. Chim. Acta 371 (1993) 203.

[24]. M. Gotoh, E. Tamiya, M. Momoi, Y. Kagaya, I. Karube, Anal. Lett. 20 (1987) 857.

[25]. R.B.M. Schasfoort, R.P.H. Kooyman, P. Bergveld, J. Greve, Biosens. Bioelectron. 5(1990) 103.

[26]. D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Biosensors. Bioelectron. 16 (2001) 121.

[27]. O.S. Frolov, A.A. Shul'ga, A.A. Abalov, Y.G.Kononenko, L.I. Netchiporuk, Sandrovsky A.K., V.I. Strikha, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, French Patent 07 93 (1993) 340.

[28]. A.A. Shul'ga, L.I. Netchiporouk, A.K. Sandrovsky, A.A. Abalov, O.S. Frolov, Yu.G. Kononenko, H. Maupas, C. Martelet, Sens. Actuat. 30 (1996) 101.

[29]. T. Mai Anh, Application of SOG material and technology to the fabrication of pH ISFET, Master Thesis, ITIMS, Hanoi University of Technology, June, 1999.

[30]. J. Wang, L. Fang, D. Lopez, Analyst 119 (1994) 455.

[31]. F. Ortega, E. Dominguez, G. Jonsson-Petersson, L. Gorton, J. Biotechnol. 31 (1993) 289.

[32]. F. Richards, J.R. Knowles, J. Mo. Biol., 37(1968)331

[33]. P. Mosan, G. Puzo, H. Mazarguil, Biochimie, 57(1975)160

CHAPITRE 5

DETECTION DES PESTICIDES EN PHASE AQUEUSE

TABLE DES MATIERES

5.1.	Détection de pesticides par inhibition de la tyrosinase	119
5.2.	Conductimetric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites	120
5.2.1.	Introduction	121
5.2.2.	Experimentals	124
5.2.3.	Results and discussion	126
5.2.4.	Conclusion	132
5.3.	Etude des interférences	133

5.1. Détection des pesticides par inhibition de tyrosinase

Dans le chapitre 4, nous avons présenté une méthode de détection de la 4-chlorophénol en utilisant un ISFET à base de tyrosinase. Nous avons optimisé plusieurs des paramètres de mesure permettant d'obtenir les meilleurs résultats analytiques. Par ailleurs, d'après la littérature il a été montré que la tyrosinase pouvait être inhibée par certains polluants tel que l'atrazine et le diuron mais avec des limites de détection relativement décevantes [30,31]. Si ces résultats ont été obtenus avec des capteurs ampérométriques, en revanche aucune étude n'a été réalisée avec des capteurs conductimétriques. C'est la raison qui nous a incité à réaliser ce travail avec l'objectif de valider l'utilisation des capteurs conductimétriques pour la détection de certains pesticides. Dans ce chapitre nous présenterons ensuite l'influence des interférents présents dans la solution à mesurer.

5. 2. Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites

Tuan Mai Anh[a,b] , Sergei V. Dzyadevych[c], Minh Chau Van[d]

Nicole Jaffrezic Renault[e], Chien Nguyen Duc[b], Jean-Marc Chovelon[a]

a. LACE, UMR CNRS 5634, Université Claude Bernard Lyon I, 43 Boulevard du 11 Novemvre 1918, Villeurbanne Cedex 69622, France
b. International Training Institute for Materials Science (ITIMS), Hanoi University of Technology, 1 Dai Co Viet, Hanoi, Viet Nam
c. Laboratory of Biomolecular Electronics, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 150 Zabolotnogo Street, Kiev 03143, Ukraine
d. Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam National Centre for Science and Technology, Hoang Quoc Viet Street, Hanoi, Viet Nam
e. IFoS FRE 2608, Ecole Centrale de Lyon, 36 av. Guy de Collongue 69134 Ecully Cedex, France

Abstract

The determination of diuron, atrazine, desisopropylatrazine (DIA) and desethylatrazine (DEA) were investigated using conductometric tyrosinase biosensor. Tyrosinase was immobilised on the biosensor sensitive part by allowing it to mix with bovine serum albumin (B SA) and then cross-linking in saturated glutaraldehyde (GA) vapour for 30 min. The determination of pollutants in a solution was performedby comparison of the output signal (i.e percentage of the enzymatic activity) ofthe biosensor before and after contact with pollutants. The measurement ofthe enzymatic activity was performed using 4-chlorophenol, phenol and catechol substrates and response times ranging from 1 to 5 min were observed. A 4-chlorophenol substrate was used to detect pesticides. A 30 min contact time of the biosensor in the pollutant solution was used. Under the experimental conditions employed, detection limits for diuron and atrazine were about 1 ppb and dynamic range of 2.3-2330 and 2.15-2150 ppb were obtained for diuron and atrazine, respectively. A relative standard deviation *(n* = 3) of the output signal was estimated to be 5% and a slight drift of 1.5 $\mu S.h^{-1}$ was observed. The 90% of the enzyme activity was still maintained after 23 days of storage in a buffer solution at 4°C.

*T.M. Anh et al. / Talanta 63 (2004) 365–370**© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.*

5.2.1. Introduction

Intensive industrialization and the use of chemicals in agriculture—which are themselves consequences of successful economic and political measures to increase prosperity-have contributed to the presence of many toxic compounds in air, soil and water, causing environmental degradation and sometimes direct health hazards. The most common pollutants most often found during control analysis are atrazine, simazine, phenylureas herbicides, glyphosate, bromoxynil, paraquat among others and their degradation products.

Since the polarity and other chemical and physical properties of the compounds listed above vary considerably several different analytical methods are used to detect the pollutants. A variety of extraction techniques have been employed over the years including liquid–liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase micro-extraction among others, followed by a quantitative analysis using various chromatographic techniques such as gas and liquid chromatography (GC and LC) [1–5]. To date, gas chromatography–mass spectroscopy (GC–MS) is the most commonly used analytical technique. All of the experimental methods are well established and exhibit a large spectrum of advantages. However, they are under constant improvement, time-consuming, expensive, cannot be performed easily outside the laboratory and need very highly skilled technicians. On the other hand, early-warning systems are needed for scientists to react in case of accidental pollution.

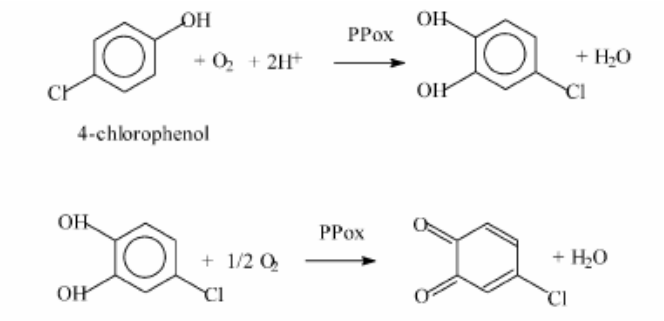


Fig. 1. Schematic reaction with tyrosinase.

Enzyme-based biosensors for pollutant determination represent potential alternatives to the time-consuming and cumbersome analysis of pollutants in the environment. In addition, enzyme-based biosensors act as early warning systems

thanks to their unique characteristics: (1) selectivity, (2) relatively low cost of fabrication, (3) good storage stability and (4) potential for miniaturisation and easy automation, which could lead to the construction of simple portable devices for fast screening purposes and for in-field/on-site monitoring. In particular, several biosensors based on tyrosinase were developed for determination of phenols [6–15]. The tyrosinase was immobilised on an electrode's surface as a thin film or in a membrane on a Clark oxygen electrode [6, 7], chemically bonded to a solid graphite electrode [8,9] or controlled-pore glass [10] and using electropolymerisation of an amphilic pyrrole derivative–enzyme mixture [11]. Tyrosinase is a binuclear copper containing metalloprotein which catalyses, in the presence of molecular oxygen, two different reactions: (1) the transformation of *o*-mono-phenols into catechols (Fig. 1, part 1, cresolase activity) and (2) the oxidation of catechol to *o*-quinone (Fig. 1, part 2, catecholase activity). In this context, these reactions can be monitored by various kinds of electrochemical detection techniques such as (1) detection of dioxygen consumption [12], (2) direct reduction of generated *o*-quinone [13] and (3) mediated reduction of *o*-quinone by hexacyanoferrate (II) [8].

In recent publications [14, 15] a tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenol determination in water solution has been described. The main analytical characteristics were studied under different conditions, as well as the possibility of optimising these working parameters. Different factors, such as pH of immobilisation, the enzyme loading and time of immobilisation in glutaralaldehyde vapour were investigated with respect to the influence on sensitivity, limit of detection, dynamic range, operation and storage stability.

On the other hand, it has also been reported that triazine and phenylurea herbicides could be determined from the inhibition of tyrosinase activity to a substrate using amperometric biosensors [16–21]. For example Vedrine et al. [21] have found limit of detection for atrazine and diuron in range of 1–0.5 ppm, respectively using dopamine as substrate which agrees with those given by other authors mentioned above. To our best knowledge, no previous work describing tyrosinase inhibition by these pollutants using conductometric sensors has been reported to date. Conductometricsensors for biosensing devices have been introduced by Watson et

al. [22]. The device consisted of an oxidised silicon wafer with interdigitated gold electrode pairs on one surface in a planar configuration. The principle of the detection is based on the fact that many biochemical reactions in solution produce changes in the electrical resistance (reciprocal conductance). Conductance measurements involve the resistance determination of a sample solution between two parallel electrodes. This is a unique method for a direct assaying of many enzymes and their substrates. According to Lawrence [23] five factors allow the application of conductometric methods for enzymatic analysis: (1) generation of ionic groups (e.g. amidases); (2) separation of unlike charges (e.g. decarboxylases); (3) proton migration (e.g. esterases); (4) changes in the degree of association of ionic groups resulting from chelation (e.g. kinases); and (5) changes in the sizes of charge-carrying groups (e.g. phosphatases). In addition, a conductance change can be observed when mobility in the solution of the species is changed. Conductometric biosensors were tested in the detection of urea in human serum samples [22] and for the enzymes penicillinase and acyl amilamidohydrolase activity studies [24].

Conductometric biosensors present a number of advantages: (1) thin-film electrodes are suitable for miniaturisation and large scale production using inexpensive technology, (2) they do not require a reference electrode, (3) transducers are not light sensitive, (4) the driving voltage can be sufficiently low to decrease significantly the power consumption, (5) large spectrum of analytes of different nature can be determined on the basis of various reactions and mechanisms.

In this work a conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites, desethylatrazine and desisopropylatrazine (DEA, DIA), is described. Experimental parameters such as the incubation time in pollutant solutions or the choice of the substrate have been determined. Promising results have been obtained since limits of detection were in the parts per billion range for both atrazine and diuron. Such limits of detection are better than the ones obtained using amperometric tyrosinase biosensor described in the literature.

5.2.2. Experimental

5.2.2.1. Reagents

Tyrosinase (polyphenol oxidase; PPox) (EC1.14.18.1, 6680 U/mg) from mushroom, bovine serum albumin (BSA), 4-chlorophenol, phenol, catechol and aqueous solutions (25% w/v) of glutaraldehyde (GA), atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine) (CAS: 1912-24-9, EC 2176178), diuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) (CAS: 330-54-1, EC: 2063544) bromoxynil (3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile) (CAS: 1689-84-5, EC: 2168827), desethylatrazine (2-amino-4-chloro-6-isopropylamino-1,3,5-triazine,) (CAS: 6190-65-4) and desisopropyla- trazine (6-chloro-*N*-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) (CAS: 1007-28-9) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). All other chemicals were of analytical grade.

5.2.2.2. Sensor design

In this work, the conductometric transducers with immobilised enzymes were used to analyse the toxicity of the pollutants listed above. These sensors were fabricated at the Institute of Chemo- and Biosensorics (Munster, Germany).

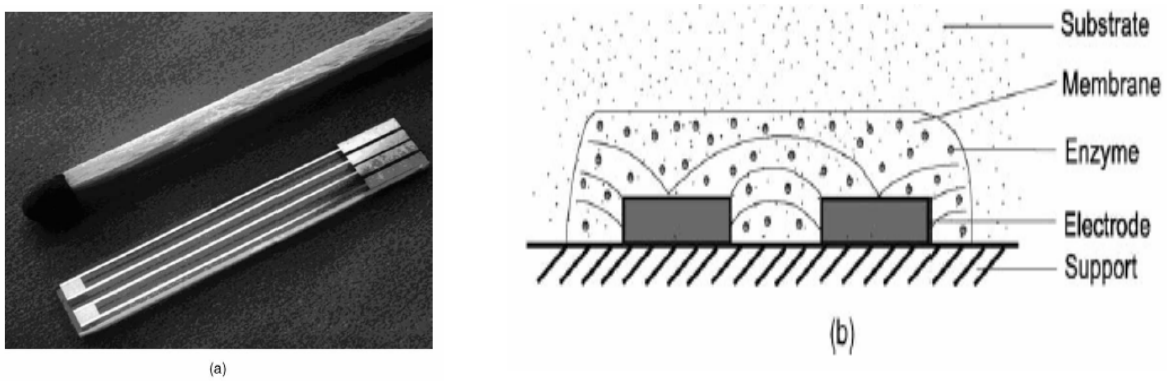


Fig. 2. (a) General view and (b) schematic representation of conductometricbiosensors.

Two pairs of Pt (150 nm thick) interdigitated electrodes were constructed using the lift-off process on the Pyrex glass substrate (10 mm×30 mm). A 50 nm thick intermediate Ti layer was used to improve the adhesion of Pt to the substrate. The central part of the sensor chip was closed by epoxy resin to define the electrode's working area. Both the digit width and interdigital distance were 10 μm, and their

length was about 1 mm. As a result, the "sensitive" area of each electrode was about 1 mm^2 (Fig. 2).

5.2.2.3. Enzyme immobilisation

The enzymatic membrane was prepared on the transducer surface by the cross-linking of enzyme with bovine albumin in saturated glutaraldehyde vapor [25]. A mixture containing 3.5% (w/w) enzyme, 5% bovine albumin, 10% glycerol in 20 mM phosphate buffer (pH 6.0) was deposited on the sensitive area of the sensor using a drop method, while another mixture of 10% (w/w) bovine albumin and 10% (w/w) glycerol in 20 mM buffer (pH 6.0) was deposited on the other electrode. The latter electrode was considered to be the reference sensor. The sensor chips were placed in a saturated glutaraldehyde vapour for 30 min followed by drying in air for 15 min at room temperature [14]. Under the experimental conditions described above, 90% of the enzyme activity was sill obtained after 23 days of storage in a buffer solution at 4°C.

5.2.2.4. Measurements

All the measurements were carried out in daylight and at room temperature in a vessel filled with 5 mM phosphate buffer, pH ~ 6.0. The biosensors were dipped into the magnetic-stirred buffer solution. The differential signal was either registered by a'home-made' conductometric laboratory amplifier for biosensor application [26] or logged by a SR 830 lock-in amplifier (Stanford Research Systems) and the steady-state response of the biosensors was plotted against the concentration of substrate.

The procedure for the evaluation of the effect of the inhibition of enzyme activity by pollutants on the biosensor response includes the following steps:

The biosensor was soaked in the buffer solution for 20–30 min until a stable baseline output signal was reached. The 4-chlorophenol (6 mM of the final concentration) substrate was added into the measurement vessel. The corresponding steady-state output signal of the biosensor was taken as an index of

the catalytic activity of the immobilised tyrosinase. This output signal value of the biosensor response was used for further evaluation of the inhibition effect of the definite concentration of pollutants.

After buffer washing, the sensor was incubated in the pollutant solution for 30 min. After extensive washing with the buffer, the 4-chlorophenol (6 mM of the final concentration) substrate was added into the measurement vessel. Then, the inhibition rate was determined by comparing the steady-state response of the conductometric biosensors before and after exposure to a sample solution containing the toxic compounds at the substrate concentration chosen. Each experiment was repeated at least three times.

5.2.3. Results and discussion

5.2.3.1. Substrate determination

Calibration curves obtained for two mono-phenolic substrates (phenol and 4-chlorophenol) and one di-phenolic (catechol) are shown in Fig. 3. The substrate sensitivity esti-mated from the linear range decreases in the following manner: catechol > 4-chloro-phenol > phenol.

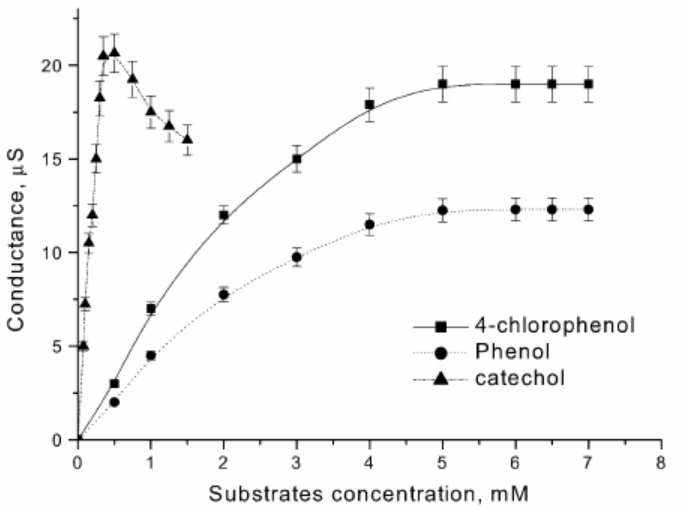


Fig. 3. Calibration curves of conductometric tyrosinase biosensor for 4-chlorophenol, phenol and catechol.

Catechol could be an interesting substrate for the detection of pollutants, but for concentrations higher than 0.3 mM a decrease in the signal intensity was observed. This decrease in signal could be explained by the fact that quinones suffer from a

high instability in water and they readily polymerise to polyaromatic compounds that have been shown to inactivate the enzyme and possibly foul the electrode [13, 27, 28]. This effect is hindered when using amperometric tyrosinase biosensor with such a substrate since quinone is permanently reduced electrochemically into catechol during the measurement. As a result the 4-cholophenol substrate was used in this work.

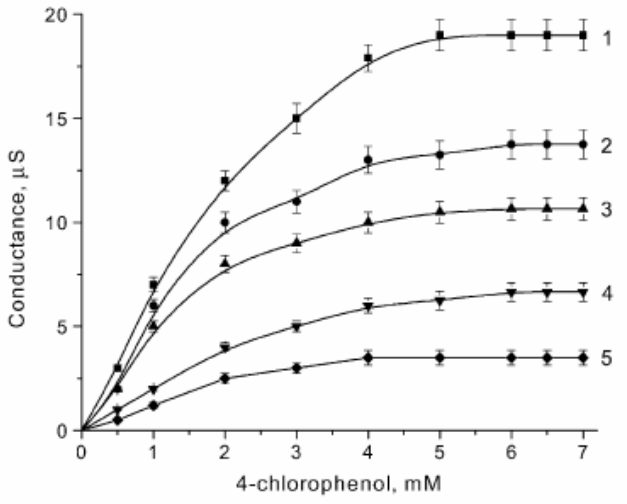


Fig. 4. Calibration curves of conductometric tyrosinase biosensor for 4-chlorophenol determination prior to (1) and after incubation with (2) 2.15 ppb, (3) 21.5 ppb, (4) 215 ppb and (5) 2.15 ppm atrazine. Measurements were conducted in 5mM phosphate buffer, pH 6.0 with a 30 min inhibition time.

In order to select optimal conditions for pesticide determination, the calibration plots of the tyrosinase conductometric biosensor for 4-chlorophenol determination prior to and after incubation with atrazine were determined. As shown in Fig. 4, it is clear that the best sensitivity and accuracy of measurements were achieved using 4-chlorophenol concentrations of more than 5 mM (saturation mode for substrate). For the lower substrate concentrations, a certain amount of enzyme in the membrane was in excess and only one part of enzyme was involved in the substrate conversion to product (meaning that other parts of enzyme were not involved in the reaction). In this case the inhibited enzyme molecules could be compensated by their involvement in the reaction of another enzyme molecule. As a result, the experimental decrease of the biosensor response will be lower than the actual decrease of the enzyme activity due to the inhibition. Finally, a 6 mM concentration of the specific substrates was used in further experiments.

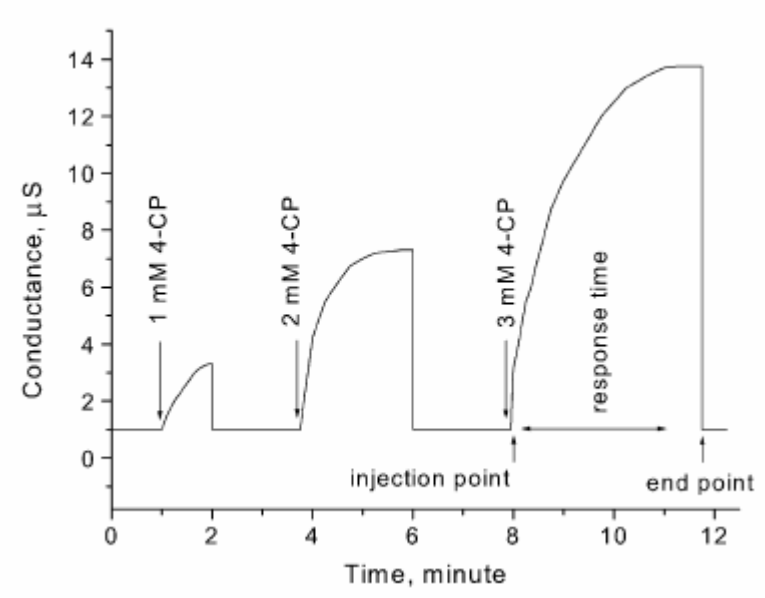


Fig. 5. Response times obtained for different concentrations (1, 2 and 3 mM) of 4-chlorophenol (temperature: 27 ◦C, pH 6.0).

In this work, response time is defined from the moment that a known volume of the substrate is injected into the measurement cell to the point at which the output signal is getting saturated. This value can vary depending on the substrate concentration used in the experiment (Fig. 5). A diffusion of the reactant (the substrate molecules) into the enzymatic membrane in which the enzymatic reaction has taken place is observed. At very low concentrations, the substrate molecules can diffuse easily into the membrane and no competition between them could occur. However, for higher concentration, there is always a small amount of substrate present in the membrane preventing the contact between the other molecules of the substrate and the catalysts (enzyme). As a result, a lengthening of the response time occurs. This is why the response time for 4-chlorophenol varies from 1 to 5 min depending on the concentration used.

5.2.3.2. Determination of the incubation time in pollutant solutions

The inhibition time is another experimental parameter that influences the results and depends on which enzyme is immobilized and also on which inhibitor is detected. Evaluation of the inhibition time is very important for off-line measurements and on-site analyses. If the inhibition time is insufficient the

enzymatic activity is not fully inhibited and the pollutant at very low concentrations may not be detected. In contrast, a long exposure time to the sample solution may dramatically damage the structure and properties of the enzyme.

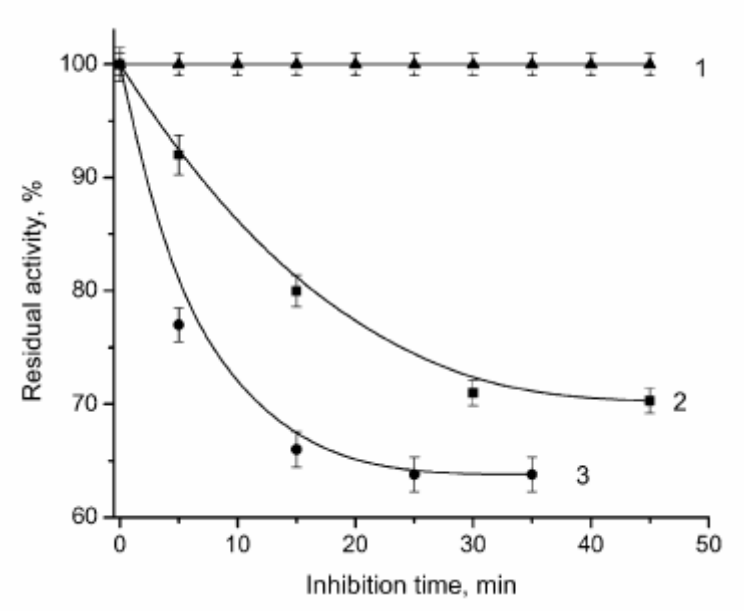


Fig. 6. Evolution of the residual tyrosinase activity versus inhibition time in solution of (1) 250 ppb bromoxynil, (2) 215 ppb atrazine and (3) 233 ppb diuron. Measurements were conducted in 5mM phosphate buffer, pH 6.0 and 6mM of 4-chlorophenol.

Moreover, the incubation time is a compromise between biosensor sensitivity and general time of analysis. The inhibition effect of atrazine, diuron and bromoxynil on tyrosinase is shown in Fig. 6. It can be seen in Fig. 6 that the optimal inhibition time for diuron was determined to be in the range of 20–30 min whereas for atrazine the optimum inhibition time varied from 30 to 40 min. In this work, 30 min was chosen as the contact time of the biosensor in the pollutant sample solution for both atrazine and diuron. The same experimental conditions were used on bromoxynil but no inhibition was observed on the activity of tyrosinase.

5.2.3.3. Detection of atrazine, diuron and bromoxynil

The dependence of the residual percent of tyrosinase activity versus concentration of atrazine, diuron and bromoxynil is shown in Fig. 7. It is shown that the tyrosinase activity is more inhibited for diuron than for atrazine and that in both cases a limit of detection of about 1 ppb can be reached. The limit of detection

obtained in this work is far lower than the one obtained using amperometric biosensors [17, 20, and 21]. The limit of detection was determined as the inhibitor's concentration which gives a decrease of the substrate's signal equal to three times the blank value. These results are quite encouraging since these values are close to the WHO recommendations (2ppb) but higher than the European Community directive for herbicide detection (0.1 ppb for a single pesticide in drinking water). In contrast, bromoxynil does not affect the activity of tyrosinase meaning that this pollutant cannot be detected using this type of biosensor. The decrease of the tyrosinase activity in both cases (for diuron and atrazine) is much higher than the standard deviation (about 5%) even at a very low concentration range (2–20 ppb).

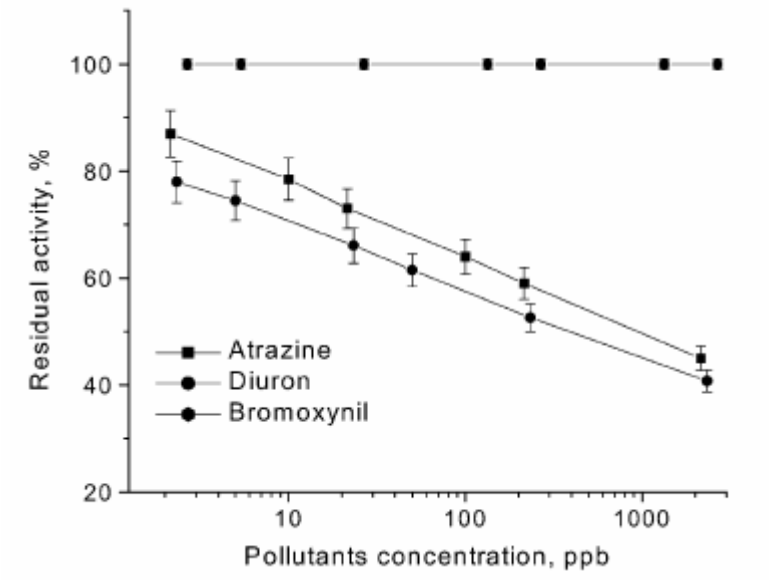


Fig. 7. Evolution of the residual tyrosinase activity vs. concentration of bromoxynil, atrazine and diuron. The biosensor responses to a 6mM 4-chlorophenol were measured in a 5mM phosphate buffer, pH 6.0 and an inhibition time of 30 min.

The results obtained using tyrosinase-based amperometric sensors [9,20,21] have shown that the limit of detection for phenolic substrates was 100–1000 times lower than using conductometric ones. However, the limit of detection for atrazine and diuron was 100-1000 times lower using the conductometric biosensors than the amperometric ones. This difference can be explained by considering the role played by the amperometric biosensors which work by reducing the generated quinone into catechol in such a way that a partial amount of substrate can be recycled,

therefore, inducing an amplification on the biosensor response. As a result, this "intrinsic" amplification effect is responsible for the very low limit of detection. If inhibition takes place, the amplification does not occur and the detection of inhibitors is not as efficient. On the contrary, when using conductomeric biosensors, no amplification effect takes place and a more pronounced inhibition effect is observed.

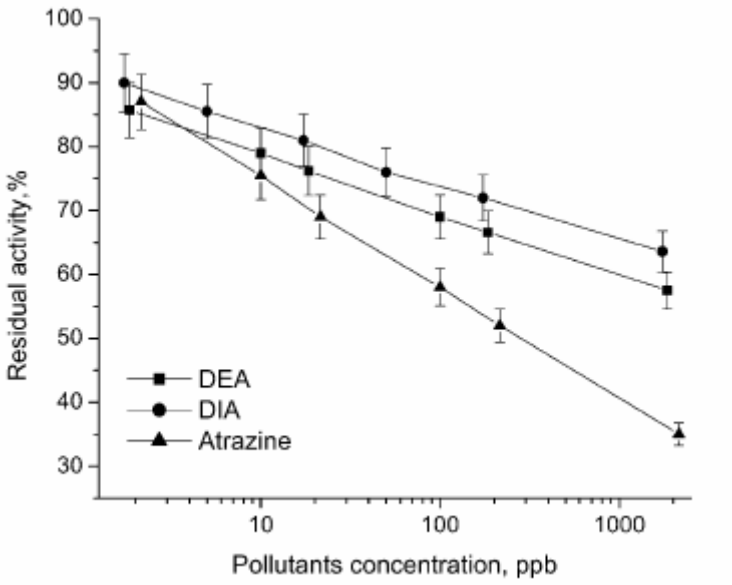


Fig. 8. Evolution of the residual tyrosinase activity vs. concentration of DIA, DEA and atrazine. The biosensor responses to a 6mM 4-chlorophenol were measured in a 5mM phosphate buffer, pH 6.0 and an inhibition time of 30 min.

In the environment, pesticides are usually transformed into several metabolites via different degradation processes including photo-degradation and bio-degradation among others. For instance, atrazine usually co-exists with two main metabolites called desisopropylatrazine and desethylatrazine [29] and that is why they were studied in this work. The dependence between the residual activity of tyrosinase and the concentration of atrazine, DIA and DEA is shown in Fig. 8. It can be seen in Fig. 8 that tyrosinase activity was also inhibited by the main metabolites of atrazine, DIA and DEA, but the inhibition level observed is lower than that for atrazine.

5.2.4. Conclusions

This work describes a conductometric tyrosinase-based biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites (DEA and DIA). The limit of detection as low as 1 ppb was reached for atrazine and diuron whereas no inhibition for bromoxynil herbicide was observed.

Further, research should be continued to try and detect other phenylureas and s-triazine herbicides such as isopro-turon or simazine. In addition, the interference by others substances such as the heavy ions, nitrate ions and sulphate ions should be investigated.

Acknowledgements

This work was supported by the French Embassy of the Socialist Republic of Vietnam within the frame work of the FSP-Espoir Program as well as by a France-Ukraine Bilateral Program "Dnipro".

5.3. Etude des interférents

Nous avons noté que l'influence de la température sur la réponse de biocapteur est un facteur qui doit être pris en compte au cours des mesures. De même, la présence d'autres espèces dans la solution est aussi un facteur qui peut influencer les résultats analytiques. Ces substances sont nombreuses et nous pouvons citer par exemple des anions tel que les nitrates les sulfates, les chlorures, ou encore des ions de métaux lourds, etc.

Dans ce travail, nous avons réalisé des études sur l'influence potentielle d'ions métalliques qui peuvent être des inhibiteurs de la tyrosinase.

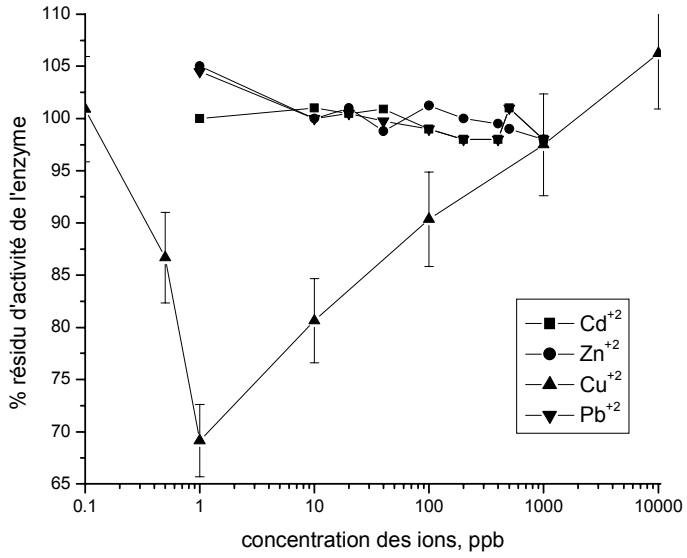


Figure 5.4.64. Influence des ions de métaux lourds sur l'activité de l'enzyme

Pour évaluer l'influence des ions métalliques sur la tyrosinase, nous avons réalisé des mesures avec la même procédure que dans le cas des pesticides. Nous avons d'abord tracé la courbe de calibration avec le substrat 4-chlorophénol afin de choisir la concentration dite "concentration saturante" où le signal de sortie ne varie plus. On a ensuite immergé pendant 30 minutes le biocapteur dans une solution contenant les ions métalliques avec une concentration définie. Puis, on a refait une mesure en présence de substrat à concentration saturante. Le nouveau signal de sortie est noté et alors comparé avec celui qui avait été réalisé avant le contact avec la solution contenant les ions métalliques.

Les résultats ont montré que la tyrosinase n'est pas influencée par la présence des ions Pb^{+2}, Cd^{+2} et Zn^{+2} (cf. figure 5.4.1). En effet, l'activité de la tyrosinase reste inchangée après immersion du biocapteur dans des solutions contenant ces ions métalliques. Par contre, l'influence des ions Cu^{2+} est très importante sur l'activité de la tyrosinase comme le prouve la figure 4.1 et plus particulièrement dans la gamme 0,5 à 20 ppb de cuivre.

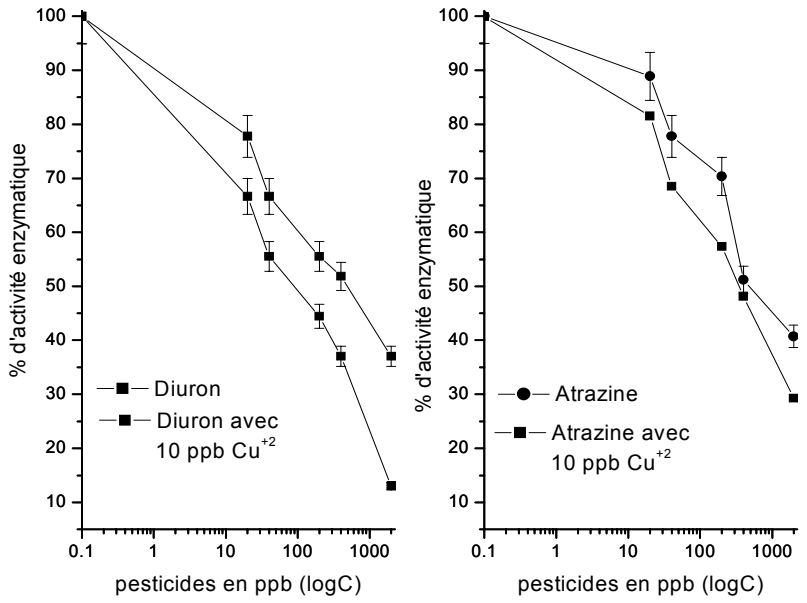


Figure 5.4.65. Inhibition de pesticides sur la tyrosinase en présence de cuivre

Pour 1 ppb de Cu^{+2}, le taux d'inhibition de l'activité de la tyrosinase est de 30%. Cette valeur est de 13% pour 0,5 ppb de Cu^{+2} et de 20% pour 10 ppb de Cu^{+2}. Ce résultat a priori surprenant, pourrait s'expliquer par le fait que le cuivre est présent dans l'enzyme tyrosinase.

Une hypothèse expliquant l'inhibition de la tyrosinase par l'ion Cu^{2+} est que la présence de cuivre dans la solution conduit à un réarrangement de la distribution des ions Cu^{2+} dans des sites actifs de l'enzyme. Cette influence est le plus forte pour concentrations allant de 0,5 à 20 ppb de cuivre.

Nous avons ensuite étudié l'influence du mélange Cu^{2+}/pesticide sur la tyrosinase. A chaque concentration en diuron et en atrazine, la réponse de sortie du biocapteur est plus faible en présence de 10 ppb de cuivre par rapport au cas où le biocapteur est immergé dans une solution contenant uniquement les pesticides. La figure 5.4.2

montre cette différence pour les pesticides seuls et en présence de 10 ppb de cuivre qui est environ de 8, 8% pour l'atrazine et 14, 483% pour le diuron.

Ces résultats sont très importants lorsqu'on réalise des mesures sur sites. Ils nous permettent de prendre en compte des possibilités d'erreurs afin d'obtenir des résultats analytiques meilleurs.

Conclusion

Ce chapitre a présenté une méthode de détection de l'atrazine, du diuron et des métabolites de l'atrazine au laboratoire.

Tableau 5.4.1. Récapitulatif des caractéristiques de biocapteur conductimétrique et de biocapteur ampérométrique pour la détection l'atrazine et le diuron.

	Capteur conductimétrique	**Capteur ampérométrique**
Capteur (seul)	Fabriqué au laboratoire	Commercial (BAS)
Electrode de référence	Non	Calomel, Platine
Enzyme immobilisée	Tyrosinase	Tyrosinase
Temps de réponse	1-5 minutes	2-5 minutes [32], 2 minutes [33]
Sensibilité	4,0165 $\mu S.mM^{-1}$	608 $mA.M^{-1}.cm^2$ [32], 136 $mA.M^{-1}.cm^{-2}$ [33]
Reproductibilité	5%	Jusqu'à 23% [32,33]
Gamme de détection	2150-2,15 ppb pour l'atrazine 2300-2,3 ppb pour le diuron	jusqu'à 1070 ppb (~ 1ppm) [32] pour l'atrazine. 40000-1000 ppb pour l'atrazine [33] 35000 -500 ppb pour le diuron
Limite détectable	1 ppb pour l'atrazine et le diuron	860 ppb pour l'atrazine [32] 1 ppm pour l'atrazine et 0,5 ppm pour le diuron [33]
Durée de vie	90%/23	85%/7, 20%/54 [32], 30%/12
Etude d'interférence	NO_3^-, Cu^{++}, Cd^{++}, Pb^{++}, Zn^{++} => tyrosinase est inhibée par Cu^{++}	Pas d'étude
Prix du capteur	15 USD (capteur seul)	69 USD [33] (capteur seul)

Le temps de réponse du capteur est compté lorsque le substrat est injecté dans le cellule de réaction jusqu'au moment où le signal commence à saturer. La reproductibilité est calculée par la différence des signaux des 10 mesures consécutives (en %). La durée de vie est calculée par l'activité enzymatique (%) maintenue après une période de temps dans un tampon au pH 6,0 et à 4°C. Le prix donné dans ce tableau peut être trouvé sur le site de BAS, le prix d'un capteur conductimétrique fabriqué à l'ITIMS est estimé par l'auteur.

Tableau 5.4.1 illustre les caractéristiques de biocapteur conductimétrique et de biocapteurs ampérométriques pour la détection de l'atrazine et du diuron. La limite détectable, la large gamme de détection, la durée de vie très longue, la bonne reproductibilité de ce type de biocapteur conductimétrique sont des qualités intéressantes pour une application en tant qu'outil de surveillance environnementale. Il faut ajouter que ces capteurs peuvent fonctionner sans aucune électrode de référence extérieure. De plus ils coûtent moins chers par rapport à des capteurs commerciaux.

Les résultats montrent que tous les paramètres possibles (température, le pH, la présence d'interférents, etc.) doivent être pris en compte afin d'obtenir les meilleurs résultats analytiques.

References

[1]. E.R. Brouwer, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 678 (1994) 223.
[2]. D. Puig, D. Barceló, Anal. Chim. Acta 311 (1995) 63.
[3]. D. Puig, D. Barceló, J. Chromatogr. A 778 (1997) 313.
[4]. O. Jáuregui, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 787 (1997)79.
[5]. R. Wissiask, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, J. Chromatogr. A 896(2000) 159.
[6]. L. Macholan, Collect. Czech. Chem. Commun. 55 (1990) 2152.
[7]. L. Campanella, T. Beone, M.P. Sammartino, M. Tomasetti, Analyst 118 (1993) 979.
[8]. J. Kulys, R.D. Schmid, Anal. Lett. 23 (1990) 589.
[9]. S. Cosnier, C. Innocent, Bioelectrochem. Bioenerg. 31 (1993) 147.
[10]. K. Zachariah, H.A. Mottola, Anal. Lett. 22 (1989) 1145.
[11]. S. Cosnier, I. Catalin Popescu, Anal. Chim. Acta 319 (1996) 145.
[12]. S. Canofeni, S. Di Sario, J. Mela, R. Pilloton, Anal. Lett. 27 (1994)1659.
[13]. P. Onnerfjord, J. Emneus, G. Marko-Varga, L. Gorton, F. Ortega, E.Dominguez, Biosens. Bioelectron. 10 (1995) 607.
[14]. T. Mai Anh, S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, N. Duc Chien, N. Jaffrezic-Renault, J.-M. Chovelon, Talanta 56 (2002) 627.
[15]. S.V. Dzyadevych, T. Mai Anh, A.P. Soldatkin, N. Duc Chien, N.Jaffrezic-Renault, J.-M. Chovelon, Bioelectrochemistry 55 (2002) 79.
[16]. F.A. McArdle, K.C. Persaud, Analyst 118 (1993) 419.
[17]. J.L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbe, G. Reverdy, Anal. Chim. Acta 311 (1995) 255.
[18]. J. Wang, V.B. Nascimento, S.A. Kane, K. Rogers, M.R. Smyth, L.Angnes, Talanta 43 (1996) 1903.
[19]. J. Wang, E. Dempsey, A. Eremenko, M.R. Smyth, Anal. Chim. Acta 279 (1993)203.
[20]. A. Hipolito-Moreno, M. E Leo Gonzalez, L.V. Perez-Arribas, L.M.Polo-Dõez, Anal. Chim. Acta 362 (1998) 187.
[21]. C. Vedrine, S. Fabiano, C. Tran-Minh, Talanta 59 (2003) 535.
[22]. L.D. Watson, P. Maynard, D.C. Cullen, R.S. Sethi, J. Brettle, C.R. Lowe, Biosensors 3 (1987/88) 101.
[23]. A.J. Lawrence, Eur. J. Biochem. 18 (1971) 221.
[24]. C.R. Lowe, PCT International Patent WO 84/03945, Chem. Abstr.103 (1985) 19418.
[25]. S.V. Dzyadevich, Y.I. Korpan, V.N. Arkhipova, M.Y. Alesina, C.Martelet, A.V. El'skaya, A.P. Soldatkin, Biosens. Bioelectron. 14 (1999) 283.
[26]. S.V. Patskovsky, V.V. Volotovsky, Devices Exp. Tech. 4 (1996) 168.
[27]. L. Macholán, L. Schánél, Collect. Czech. Chem. Commun. 42 (1977)3667.
[28]. L. Macholán, Collect. Czech. Chem. Commun. 55 (1990) 2152.
[29]. P. Schmitt, D. Freitag, Y. Sanlaville, J. Lintelmann, A. Kettrup, J.Chromatogr. A 709 (1995) 215.
[30]. Vedrine C., Fabiano S., Tran-Minh C., *Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support*. Talanta 59 (2003) 535-544.
[31]. Jean-Luc Besombes, Serge Cosnier, Pierre Labbe , Gilbert Reverdy, *A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides*. Anal Chimi. Acta 311(1995) 255-263.
[32]. Jean-Luc Besombes, Serge Cosnier, Pierre Labbe, Gilbert Reverdy, *A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides*. Analytica Chimica Acta 311(1995) 255-263.

[33]. Christophe VEDRINE, *exploitation de signaux biologiques pour la réalisation de capteurs environnementaux. Application à la construction d'un biocapteur à micro-algues immobilisées et d'une bioélectrode à enzyme immobilisée*, Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint Etienne. 2003: St. Etienne, France.

CONCLUSION GENERALE

Parmi les différents biocapteurs présentés au cours du chapitre 1, nous en avons sélectionnés deux pour la réalisation de cette étude: les capteurs potentiométriques de type ISFET et les capteurs conductimétriques. Notre objectif était de réaliser un biocapteur enzymatique permettant de détecter des polluants organiques dans l'eau. Nous avons ensuite mis au point la fabrication de ces capteurs (les ISFETs et les capteurs conductimétriques) en utilisant des techniques de microélectronique présentent dans la salle blanche de l'ITIMS en particulier la préparation du matériau dit SOD pour la diffusion des dopants au niveau de la source et du drain pour la préparation des capteurs ISFETs. Nous avons montré en particulier que les caractéristiques de ces derniers étaient identiques à celles des autres capteurs ISFETs présentés dans la littérature.

La biofonctionnalisation est une étape clé pour la réalisation de ces capteurs et donc pour l'obtention de bonnes performances analytiques. Nous avons immobilisé la tyrosinase sur les surfaces des transducteurs en utilisant la méthode dite de 'co-réticulation'. Les molécules de tyrosinase se réticulent avec celles de BSA en présence des vapeurs de glutaraldéhyde saturante avec un temps optimisé de 30 minutes.

Il a été montré que les biocapteurs ISFETs à base de tyrosinase permettaient la détection directe de composés phénoliques avec un temps de réponse très faible compris entre 3 à 5 minutes. Ces biocapteurs fonctionnent à un pH optimal de 6.0. Nous avons également montré que les biocapteurs conductimétriques pouvaient déterminer la présence des pesticides dans l'eau avec une gamme de détection allant de 2,15 à 2150 ppb pour l'atrazine et de 2,3 à 2300 ppb pour le diuron respectivement. Les biocapteurs montrent une intéressante durée de vie, à 4°C dans un tampon KH_2PO_4 à pH 6.0 puisque après 23 jours, 90% de l'activité de la tyrosinase est maintenue.

Nous avons évalué l'influence de la température et de la présence d'interférents dans le milieu de mesure afin de mieux comprendre l'origine des réponses du biocapteur. Une étude sur la structure de la membrane enzymatique au cours de la mesure a été aussi réalisée. Une étude plus approfondie sur ce suje

Lời cám ơn

Cuốn luận án 'Phát triển các cảm biến sinh học điện hóa trên cơ sở tyrosinase để phát hiện chất ô nhiễm hữu cơ trong nước' được hoàn thành là nhờ có sự giúp đỡ rất lớn của GS. Georges Vachaud trường đại học Joseph Fourrier, Grenoble cộng hòa Pháp và thầy giáo Nguyễn Đức Chiến, trường đại học Bách khoa Hà nội, người đã tạo các điều kiện làm việc tốt nhất, có những lời khuyên hợp lý và đúng lúc trong suốt quá trình tôi theo đuổi các vấn đề về cảm biến sinh học và ứng dụng.

Tôi muốn nói lời cám ơn sâu sắc của mình tới Giáo sư Jean-Marc Chovelon về sự giúp đỡ của ông trong những ngày đầu của tôi ở Lyon. Những câu hỏi thẳng thắn, những buổi họp chuyên môn thật sự quý báu đã giúp tôi nắm vững hơn vấn đề mình theo đuổi. Qua đây tôi cũng xin tỏ lòng biết ơn tới Giáo sư Jean-Pierre Deloume, TS. Christian Georges, PGS. Corinne Emmelin, PGS. Corrine Ferronato đã giúp đỡ tôi rất nhiều trong thời gian ở LACE.

Bản luận án này được thực hiện cả ở ITIMS, ĐH Bách Khoa Hà nội và LACE, Đại học TH Lyon I. Tôi muốn nói lời biết ơn tới ban Giám đốc của hai phòng thí nghiệm đã tạo các điều kiện thuận lợi, cho phép tôi hoàn thành đồ án đúng thời hạn.

Bản thân tôi không thể tự mình hoàn thành bản luận án này mà không có sự giúp đỡ của các đồng nghiệp ở ITIMS, đặc biệt là thành viên của nhóm cảm biến bán dẫn: TS. Nguyễn Như Toàn, ThS. Phạm Đức Thành, NCS. Nguyễn T. Minh Hải. Tôi không thể quên các buổi thực nghiệm trong phòng sạch để chế tạo ISFET và vi điện cực từ những năm 1999. Xin gửi lời cám ơn các kỹ thuật viên phòng sạch, cán bộ phòng kỹ thuật, điện tử.

Tôi xin chân thành cám ơn cô Laurence Micheluti, INPG Grenoble về các phép đo điện trở lan tryền để xác định profile của vật liệu sol-gel chế tạo được tại ITIMS, Céline về các câu hỏi thú vị, và là người đã cùng tôi giải quyết các vấn đề nảy sinh trong quá trình làm thí nghiệm. Xin cám ơn Vân Anh, đại học Tewnte về việc đã cung cấp một số ISFET cho cả nhóm và chia sẻ những kinh nghiệm có giá trị, N. H. Lâm Viên Vật lý kỹ thuật ĐH Bách khoa Hà nội và khoa điện tử đại học Paris 11 đã giúp tôi hàn dây các ISFETs và chụp các bức ảnh của các vi điện cực chế tạo tại ITIMS.

Tôi cũng xin được nói lời cám ơn tới tất cả các đồng nghiệp khác ở ITIMS như anh N.A. Tuấn, V.A. Minh, Khanh, Loan, Hà Trần, Thanh Lê đã động viên và giúp đỡ tôi hoàn thành nhiệm vụ.

Xin cám ơn các bạn lưu học sinh việt nam tại Lyon, nhất là các cầu thủ bóng đá khu vực La Doua đã chia sẻ với tôi những giờ phút vui chơi sau những ngày làm việc căng thẳng.

Cuối cùng xin dành những lời giản dị và yêu thương tới bố, mẹ, em Giang và nhất là cho Thủy, người vợ yêu dấu, đã bên tôi suốt cả những năm xa nhà nơi xứ người.

Lyon tháng 11 năm 2004

Mai Anh Tuan

ANNEXE

SOL-GEL PREPARED SILICA-BASED MATERIALS FOR SENSOR AND OPTOELECTRONIC APPLICATION

Nguyen Nhu Toan[a], Mai Anh Tuan[a], Tran T. H.[a,b], Nguyen T. H.[b], Charles Bathou[c], Tran K. A.[a,b], Le Q. M.[b], and Nguyen D. C.[a]

a) International Training Institute for Material Science (ITIMS), 1 Dai Co Viet road, Hanoi,
b) Institute for Material Science, NCST, Hoang Quoc Viet road, Hanoi, Vietnam
c) Laboratoire d'optique des solids UMR 7601, Universite Pierre et Marie Curie, 4 Place Jussieu, F75252 Cedex 05 Paris, France

Abstract

This paper reviews our investigation results on silica-based materials prepared by sol-gel method and their applications. Spin-on glass (SOG) materials (undoped or doped with boron and phosphorus) were prepared and optimized. They were applied to the realization of MOSFET-based chemical sensors. A new technology was invented for the fabrication of sensors by using fully SOG diffusion source. Eu^{3+}-doped silica-titania materials with different refractive indexes were also prepared for wave-guides. Optical and photo-luminescence measurement results are presented and discussed here.

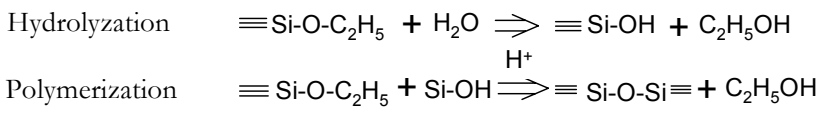
1. Introduction

Silica-based materials have many advanced applications such as wave-guides and photoluminescence devices for optoelectronics. In microelectronics, these materials are used for low-k dielectrics, multi-layer metallization planarization, diffusion sources, sensitive membranes, etc [i]. Sol-gel method, on the other hand, is simple, low cost and a wide range of materials can be produced by this method [2]. Preparation of advanced silica-based materials using the sol-gel method is an attractive approach for the modern optoelectronics and microelectronics. This paper reviews our recent research results on the preparation and applications of the silica-based materials using the sol-gel method for sensors and active wave-guides.

2. Preparation of spin-on glass (SOG) materials

SOG materials have been widely used as a diffusion source or a planarizing dielectric for multilevel metallization schemes in the fabrication of nowadays integrated circuits. SOGs are in general Si-O network polymers in organic solvents and prepared by the alkoxide method. The starting materials are silicon alkoxide

(tetraethoxysilane - TEOS or $Si(OC_2H_5)_4$), water (H_2O), isopropanol ($(CH_2)_2CH(OH)$) and hydrochloric acid (HCl). The main reactions are:



Because TEOS and water are immiscible, the reactions only begin when the solvent isopropanol is added. The reactions take place at 82°C, the boiling temperature of isopropanol. The reaction rate can be controlled by adding an acidic catalyst; HCl was used in this case. The basic mechanism of these sol-gel reactions is well known. However, recipes reported in the literature differ widely. Our goal was to design experiments to make SOG materials with good uniformity and long life-time.

In our experimental design [ii], there are four factors in the sol-gel reactions which are the amount of TEOS, water, HCl and the reaction time. Using this design, the effects of the ingredients in the sol-gel reactions were explored. The results showed that the more water in the reaction the thicker, rougher and larger shrinkage the obtained SOG layer. In addition, the water amount also had the largest effects compared to three other factors. From these experiments, some optimum recipes were obtained for good SOG layers, i.e. relatively thick (>100 nm), smooth and uniform:

10 ml TEOS, 23.5 ml Isopropanol, 4 ml HCl 1.75 N and 1.5 hours reaction time
10 ml TEOS, 23.5 ml Isopropanol, 4 ml HCl 1.125 N and 3.5 hours reaction time
15 ml TEOS 18.5 ml Isopropanol, 4 ml HCl 1.125 N and 1.5 hours reaction time
12.5 ml TEOS, 22.5 ml Isopropanol, 2.5 ml HCl 2.3 N and 2.5 hours reaction time

The addition of acetone into the silica sols after the reaction finished was found to prolong the life time of the obtained sols and to improve the uniformity of the silica gel layers. In fact, acetone is a good solvent and it reduces the polymerization reaction rate in the obtained SOG sol. As a result, the SOG sols have longer life-time and better uniformity due to smaller chains in the sol.

Based on the spin-on glass recipe, other silica-based materials with different doping impurities were prepared and investigated. Phosphorus and boron doped spin-on glass material was prepared with different concentrations.

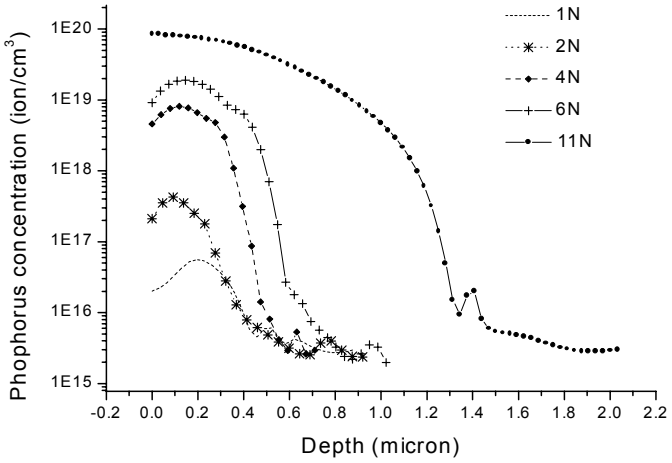


Figure 66. SRP profiles of P in Si diffused from P-doped SOG (P=1N-11N)

This material is used as diffusion source for P-N junction formation in silicon sensors. Figure 1 shows the phosphorus profiles in silicon samples diffused from phosphorus doped spin-on glass materials.

3. Applications of SOG materials for chemical sensors

Although the first ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) was created by Bergveld in 1970, this device is still under intensive study for chemical and bio-chemical sensors. ISFET is fabricated by the micro-electronic technology using the ion implantation for PN junction formation. In order to simplify the process, SOG materials (doped with phosphorus or boron) were used as a diffusion source for source/drain formation in the ISFET. The diffusion properties of impurities from SOG into silicon were investigated [i]. This diffusion technique has the advantages of simplicity and low-cost. A silicon wafer is spin-coated with SOG sol containing impurities. Afterward, the wafer is baked for solvent evaporation and annealed at high temperature (>800°C). The impurities diffuse into the silicon wafer during the annealing process. However, one of the problems of the SOG diffusion technology is the etching difficulty of the SOG layer after annealing. In fact, the SOG layer is a gel and it contains a lot of organic species after baking at temperature of less than 800°C. Therefore, the normal buffered HF solution could not effectively etch this SOG layer. In order to overcome this difficulty, SOG layer has to be annealed at

temperature of greater than 800°C in oxygen ambient to convert completely this layer into an oxide-like layer. After that, this layer can be removed normally by the buffered HF.

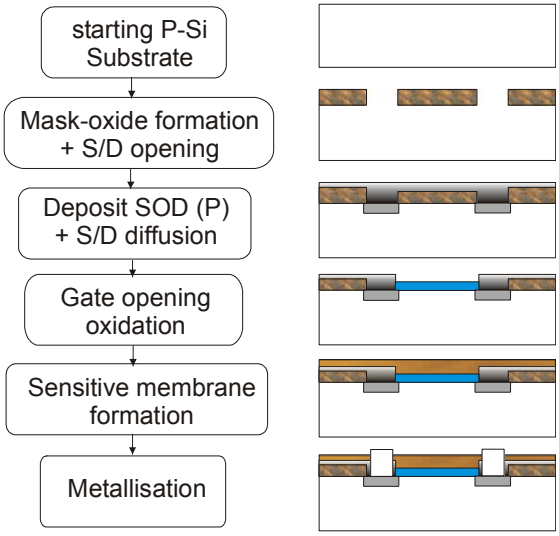


Figure 67. SOG-ISFET process flow

In order to use SOG as a diffusion source for ISFET realization, we invented a new process in which the etching difficulty can be avoided (Fig.2).

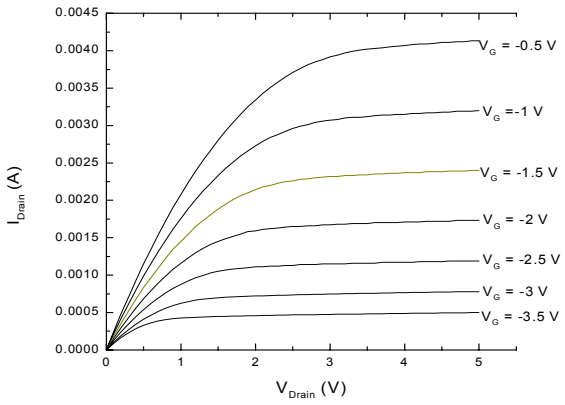


Figure 68. Current-voltage characteristics of a MOSFET fabricated by P-doped SOG (11N)

Differently from the normal ISFET process, the source/drain are formed before the gate opening in this process. By this way, the SOD layer is annealed at temperature of 1050°C during the source/drain diffusion process and it is now easily removed by the buffered HF solution. Using this process, we could control the threshold voltage of the FET device by controlling the out diffusion of impurity from SOG layer into the opened gate. Typical output characteristics of a MOSFET fabricated fully by SOG diffusion technique are presented in figure 3.

Results on pH ISFET and gas sensors fabricated by this technique will be published soon.

4. Preparation of Eu^{3+}-doped silica-titana materials

The high-refractive-index modulation and design flexibility of the silica-titania makes it a very attractive material for wave-guides in telecommunication. This material was realized by alkoxysilicate based sol-gel method as the same as the SOG material. However, in this case titanium isopropylorthotitanate (TPOT) diluted in acetylacetone (ACT) was added into the mixture of TEOS, HCl and Isopropanol before heating. By this way, the refractive index was tuned by controlling the TEOS/TPOT molar ratio, i.e. 90/10, 85/15, 80/20 and 75/25; The (TEOS+TPOT)/water ratio was 1:4 and 1:5; and TPOT/ACT was from 1:1 to 1:1.5. The sols were doped with Eu^{3+} by $Eu(CH_3COOH)_3$ and the ratio of $Eu(CH_3COOH)_3$/(TEOS+TPOT) was 5.10^{-2} , 10^{-2}, $7.5.10^{-3}$, and 5.10^{-3}.

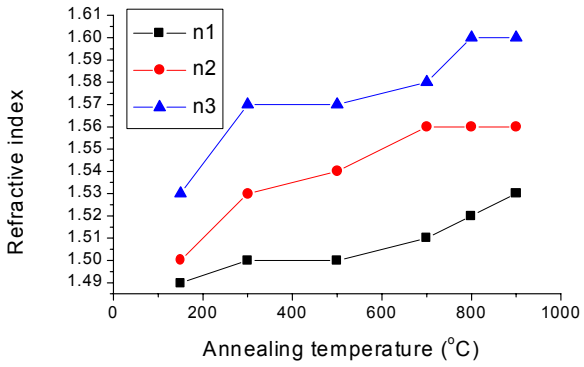


Figure 69. SiO2/TiO2 film thickness vs. annealing

The obtained sols were spin-coated on Si wafers and then they were dried at 50°C for 48 hours. Afterward, they were annealed at temperature from 150°C to 1000°C in N_2 ambient. Ellipsometry measurement were done to characterize the optical properties of the silica-titania layers.

The obtained thin films have different thickness and refractive index from 1.49 to 1.60 depending on the titania concentration as well as the annealing temperature as shown in figures 4 and 5 (d1, d2, d3 and n1, n2, n3 corresponding to SiO_2/TiO_2 ratio of 90/10, 85/15, 80/20 respectively)

This result also shows that the more TPOT the lower temperature the films condense and the refractive index become saturated. That is due to the lower crystallization temperature of TiO_2 compared with SiO_2.

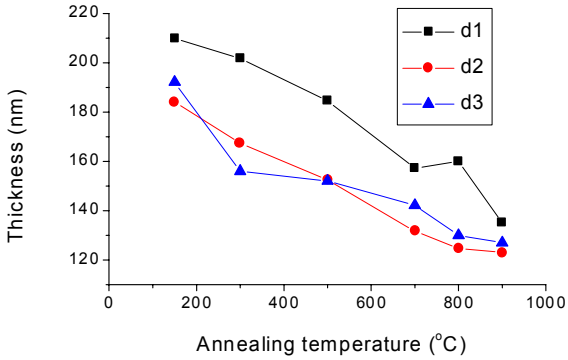


Figure 70. SiO2/TiO2 refractive index vs. annealing

The microstructure properties of silica-titania thin films were investigated by thermal, X-ray analysis and micro-Raman techniques.

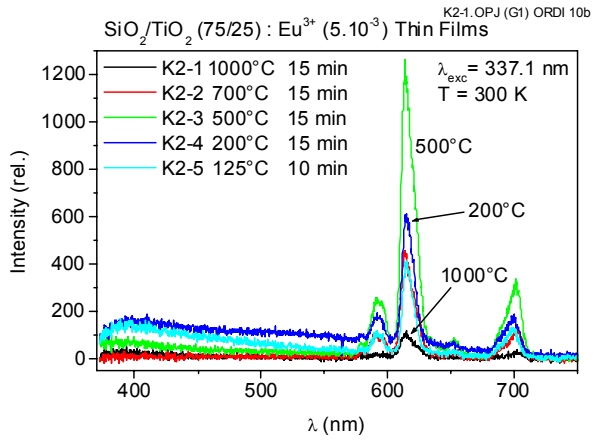


Figure 71. Fluorescence spectra of Eu3+ doped SiO2/TiO2 (75/25) thin films annealed at different temperatures

The optical properties of this material were studied by the photoluminescence and decay-time measurements. Figure 6 shows the fluorescence spectra of the silica-titania thin films.

Conclusions

The sol-gel process was investigated for the silica-based materials. Good spin-on glass and silica-titania materials were obtained and they show promising properties for sensors and integrated optics applications.

Silicon chemical sensors have been realized using doped spin-on glass diffusion source. New process was invented for the MOSFET based chemical sensors. Good devices have been obtained showing the potential applications of the materials and technology.

Reference

[1]. Nguyen Nhu Toan, Ph.D. thesis, University of Twente, The Netherlands 1999

[2]. N. N. Toan, T. D. Quyen, T. K. Anh, N. D. Chien, J. Holleman, P.H. Woerlee, IWOMS'99 proceeding, Hanoi, Vietnam, 1999, p. 521-524