



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique
Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi
Faculté des Sciences et des Sciences Appliquées
Département de Génie Electrique



Cours pour Doctorants spécialités:
Matériaux/Microélectronique

Chapitre4: Biocapteurs

1. Généralités sur les biocapteurs:

L'idée de biocapteur est née du besoin d'analyse en temps réel sans traitement préalable de l'échantillon et sans manipulation de produits dangereux. Le marché et les applications des biocapteurs sont très larges. Ils concernent non seulement le domaine médical pour le diagnostic, mais aussi les analyses environnementales et l'agroalimentaire. Le développement des biocapteurs a débuté dans les années 1960 avec l'introduction des premières électrodes à enzymes. Elles se sont étendues dans les années 1980 par la commercialisation de biocapteurs ampérométriques pour la mesure du glucose et en 1990 dans le domaine médical. Plus de 40 biocapteurs ont été commercialisés pour le diagnostic médical, pour mesurer les paramètres aussi divers que le taux de glucose, taux de cholestérol et certains analytes comme l'urée, les lactates. Ces dernières années, le domaine des biocapteurs a connu un développement remarquable sous la pression de plusieurs facteurs selon les domaines d'application:

Le besoin en capteurs fiables (pharmacie);

rapidité de mesure (monitoring médical);

La généralisation de l'automatisation dans le génie des procédés;

La recherche du moindre coût dans le domaine de l'analyse biomédicale ou environnementale. L'utilisation des techniques de microélectronique dans le domaine des biocapteurs permet en particulier d'envisager des productions massives à faible coût.

Les récents progrès en synthèse moléculaire et microélectronique, et plus spécialement en microlithographie, technologie des couches minces classiques et des films de Langmuir-Blodgett, permettent d'imaginer une nouvelle gamme de capteurs utilisables dans les processus biologiques dont les applications courantes se situent dans les domaines de la médecine, de l'agroindustrie, aussi bien que de la défense ou la protection de l'environnement [1,5].

2. Principe:

Un biocapteur est issu de l'association d'un élément biologique (enzyme, anticorps, antigène, fragment d'ADN, d'ARN, microorganisme) possédant une fonction de reconnaissance spécifique et un élément transducteur (électrode, microbalance à quartz, fibre optique) qui assure le transfert de l'événement biologique «reconnaissance de l'analyte» et la transforme en un signal exploitable (électrique ou lumineux) (figure1).

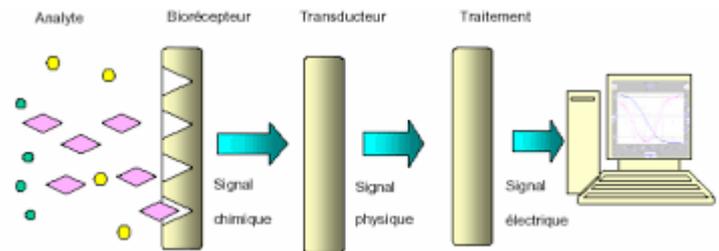
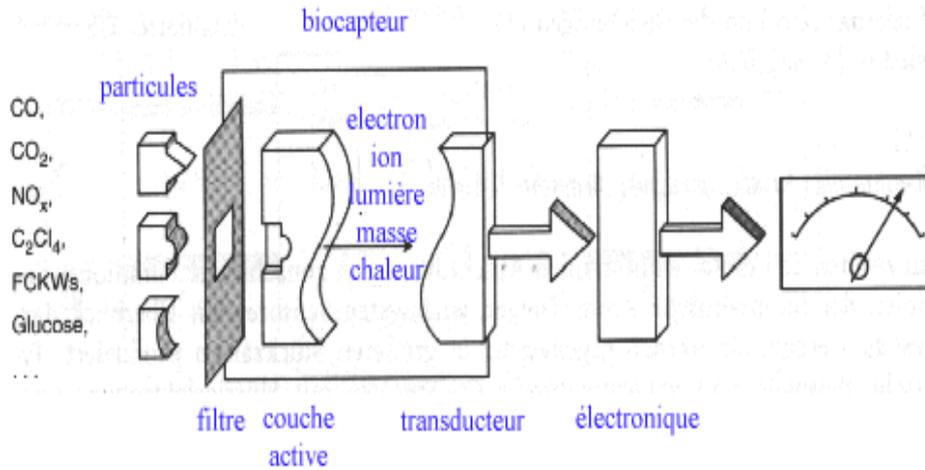


Figure1. Chaines de mesure biologique et de traitement de l'information utilisant un Biocapteur [1]

Un autre schéma plus simple sur la chaîne de mesure utilisant un Biocapteur comprenant un Biorecepteur suivi d'un transducteur est présenté en figure suivante :

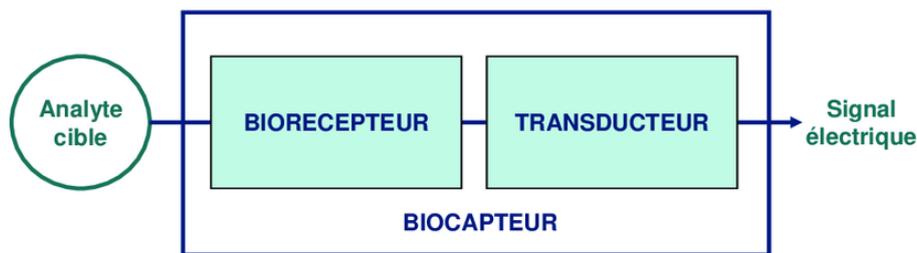


Figure2. Schéma simplifié d'une chaîne de mesure biologique utilisant un Biocapteur [1]

Divers procédés sont envisageables pour traduire le signal biologique en signal électrique. On connaît en particulier depuis quelques années de nombreuses tentatives de fixation de membranes sélectives sur la grille d'un transistor MOS en vue d'obtenir un composant de la famille des ISFETS. Cette procédure présente diverses difficultés dont la moindre n'est pas la réalisation de cette membrane poreuse, car on dispose de peu de moyens de contrôle en cours de fabrication, de la qualité de celle-ci. En outre les signaux à détecter sont généralement de faible amplitude ce qui en électronique analogique, et en milieu généralement bruité crée une difficulté supplémentaire.

La qualité du biorecepteur conditionne l'efficacité du dispositif en termes de sélectivité,

sensibilité, répétabilité et reproductibilité. La couche bioréceptrice doit répondre à certains critères : une bonne conservation de l'immunoréactivité, une quantité importante de molécules immobilisées avec un faible taux de dénaturation et une bonne stabilité vis-à-vis des variations de pH, de force ionique [5,12].

Trois grands types de biomolécules sont généralement utilisés comme éléments de reconnaissance. On distingue : les enzymes, les immunoespèces (anticorps, antigènes), 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 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 des modifications physiques de la couche sensible, modifications induites par la formation des complexes immuns (effets de géométrie, de masse, modification de propriétés électriques). Les

biocapteurs qui utilisent les fragments d'ADN exploitent l'appariement de deux monobrans d'oligonucléotides complémentaires. Avec un microréseau d'ADN, il est possible d'identifier la séquence d'un gène et de détecter des mutations génétiques [9].

Les biocapteurs peuvent être classés selon :

- La reconnaissance moléculaire utilisée (biorécepteur) : biocapteurs immunologiques, membranaires, à ADN, à microorganismes ou enzymatiques.
- Le transducteur associé : biocapteurs optiques, thermiques, mécaniques ou électrochimiques.

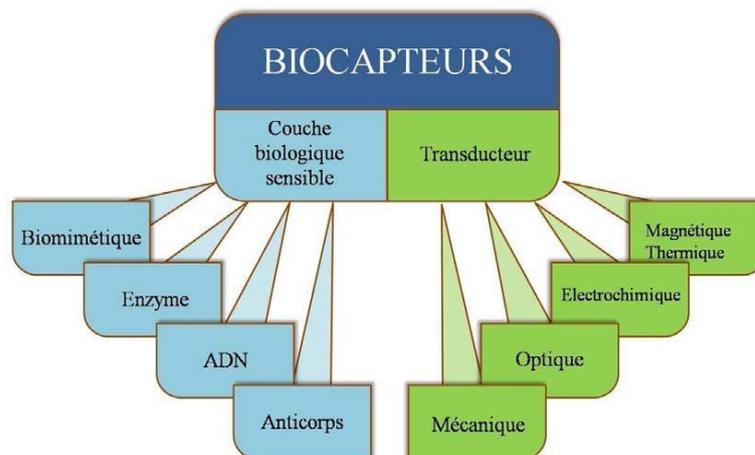


Figure3. Classification des Biocapteurs [12]

3. Types de biorécepteurs et de transducteurs :

Il existe un grand nombre de biorécepteurs et de transducteurs dans la littérature. Le choix est fait en fonction de l'application finale du biocapteur et des contraintes du problème. La figure suivante représente les différents types de biorécepteurs et de transducteurs.

3.1. Types de biocapteurs selon le transducteur:

La nature du transducteur sert généralement de base pour la classification des différents biocapteurs.

3.1.1. Transducteurs électrochimiques:

Ils transforment l'effet d'une interaction électrochimique analyte-électrode en un signal primaire (signal porteur de l'information). De tels effets peuvent être stimulés électriquement ou résulter d'une interaction spontanée en condition de courant nul [7]. Dans cette catégorie, on distingue : les transducteurs ampérométriques, potentiométriques, impédimétriques et conductimétriques [1,10].

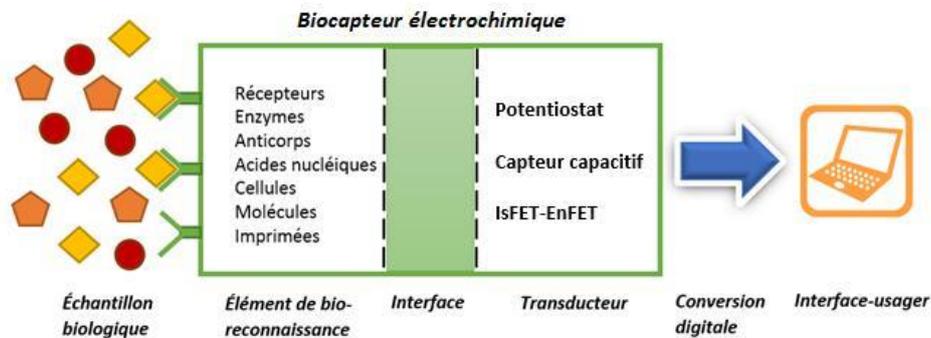


Figure4. Chaîne de mesure biologique utilisant un transducteur électrochimique [1]

On donne en figure suivante un exemple de Biocapteur électrochimique pour le dosage du glucose.

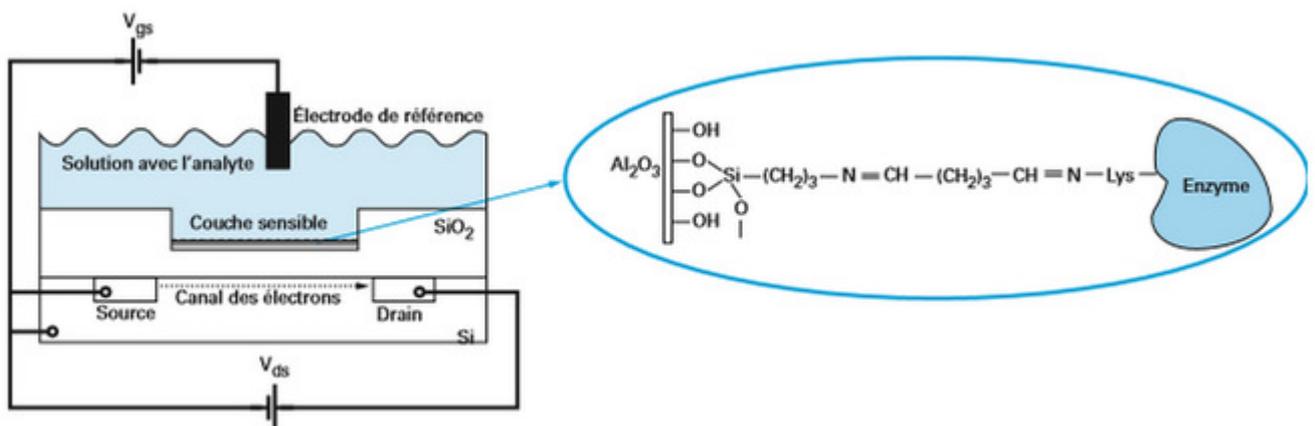


Figure5. Dosage du glucose par un Biocapteur électrochimique [5]

Enfin d'une façon générale un biocapteur électrochimique dans lequel le transducteur sera de type potentiométrique n'est jamais qu'une électrode sur laquelle va se produire une réaction d'oxydoréduction ou une réaction d'échange électronique entre l'espèce à détecter et le constituant de surface de l'électrode qui peut être spécifique de l'espèce à détecter ou non. Dans ce dernier cas, on ajoutera un intermédiaire sous forme d'une membrane ad hoc et c'est cette dernière qui assurera la spécificité du capteur. Parfois le matériau fixé sur l'électrode métallique sous forme d'un gel est convenable mais doit être protégé des risques de dissolution et ce sera alors le rôle de la membrane qui sera constituée d'un matériau hydrophobe d'origine végétale, animale ou synthétique [9].

Le problème principal est donc de trouver le matériau qui jouera ce rôle de membrane suffisamment poreuse pour permettre la diffusion et la réaction chimique et suffisamment solide pour assurer la tenue mécanique et la durabilité de l'ensemble. On a envisagé plusieurs procédés :

Tels la co-réticulation d'enzymes et de protéines inactives (par exemple en mélangeant l'enzyme à de la gélatine et en faisant réagir du glutaraldéhyde qui va créer des pontages entre les deux constituants créant ainsi un gel facile à associer au transducteur).

Une autre solution consiste à mélanger l'enzyme avec une solution de monomère dont on provoque la polymérisation (des couches bioactives à base de gels de polyacrylamide sont très faciles à réaliser).

Une troisième technique consiste à exploiter un support porteur de groupements fonctionnels (-OH, -COOH, -NH₂, etc.) que l'on active chimiquement et dans ces conditions il est facile de greffer l'enzyme sur ces groupements actifs (certains polyamides peuvent ainsi être facilement activés et en quelques minutes être associés aux transducteurs électrochimiques) [7].

3.1.2. Biocapteurs ampérométriques:

Les biocapteurs ampérométriques mesurent le courant généré à un potentiel constant par une réaction de type oxydoréduction. Le facteur important pouvant influencer le fonctionnement du biocapteur ampérométrique est le transfert d'électrons entre la molécule catalytique et la surface de l'électrode [7]. Son principe repose sur l'application d'un potentiel constant entre une électrode de travail et une électrode de référence. Le potentiel imposé promeut une réaction redox qui produit un courant ; la valeur de ce courant est proportionnelle à la concentration d'espèces électroactives présentes en solution. De nombreux biocapteurs ampérométriques sont basés sur la mesure de la consommation d'oxygène, ou la génération de peroxyde d'hydrogène. Les électrodes à H₂O₂ sont plus sensibles mais moins sélectives que les électrodes à O₂ [7,9]. Les biocapteurs ampérométriques sont rapides, plus sensibles, plus précis et plus justes que les biocapteurs potentiométriques [9].

Cependant, la sélectivité des biocapteurs ampérométriques est seulement gouvernée par le potentiel rédox des espèces électroactives présentes. En conséquence, le courant mesuré par l'instrument peut inclure la contribution de plusieurs espèces chimiques différentes. De plus, la spécificité du composant biologique peut être compromise par la sélectivité partielle de l'électrode. Cette absence de spécificité nécessite une préparation de l'échantillon, la séparation ou la compensation des signaux interfaciaux [7].

Le principe de détection de certaines espèces biologiques par la méthode ampérométrique est illustré en figure ci-dessous:

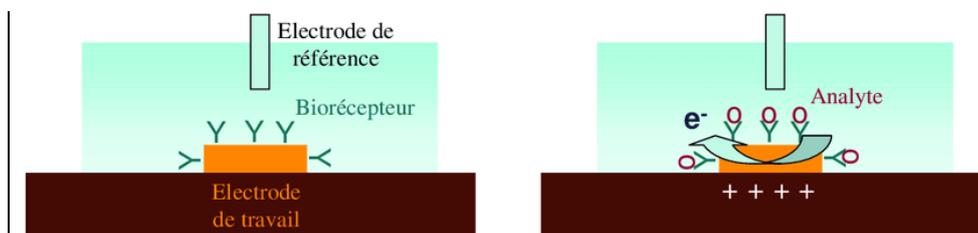


Figure6. Principe de la détection Ampérométrique [1]

3.1.3. Biocapteurs potentiométriques:

Ils sont basés sur la mesure du potentiel d'une électrode de travail par rapport à une électrode de référence. Le composé biologique fixé est le plus souvent une enzyme mais peut également être une cellule entière [10]. La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à doser.

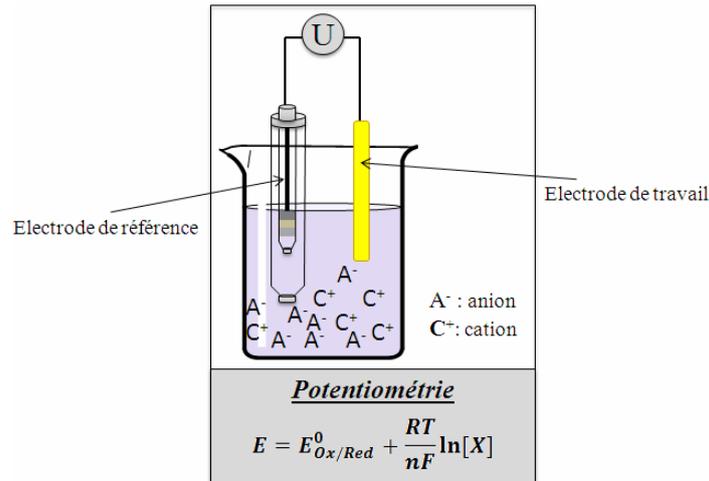


Figure7. Principe de la détection Ampérométrique [1]

Les biocapteurs potentiométriques ont l'avantage de disposer de temps de réponse très courts (entre 5 à 10 minutes). Leur fabrication est largement industrialisée et par conséquent est moins coûteuse.

La figure8 montre l'utilisation du transistor ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor) pour la détection de certaines espèces biochimiques comme le Paraoxan 1µm, Diclorvos 1µm, Organophosphorés [10,12].

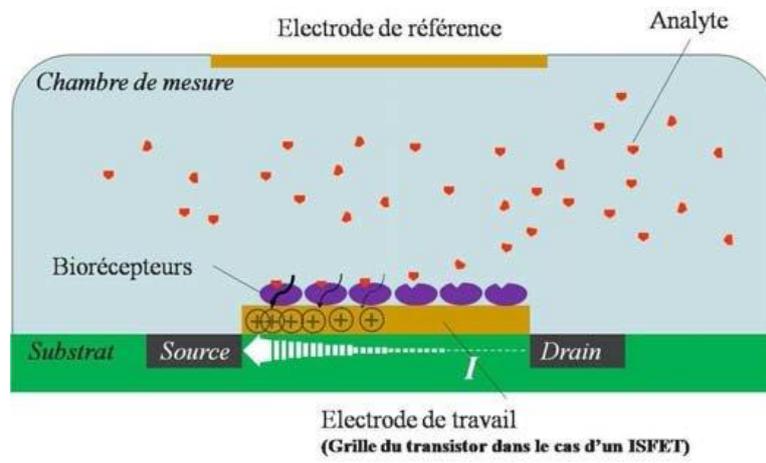


Figure8. Principe de la détection Ampérométrique a base de transistor ISFET [1]

3.1.4. Biocapteurs conductimétriques:

La conductimétrie est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie. Elle permet de mesurer les variations (consommation ou production) d'espèces chargées générées au cours des réactions enzymatiques [10].

La conductance d'un corps G est donnée par l'équation :

$$G = \gamma A/\lambda \quad (1) \quad [10]$$

γ (S.cm⁻¹) est la constante caractéristique d'un produit connu et est appelée la conductance

ou conductivité spécifique;

A/λ (cm) la constante géométrique de la cellule.

Les biocapteurs conductimétriques sont utilisés dans le domaine biomédical pour la quantification du glucose dans le sang et l'urine par exemple [13].

La figure 9 présente une chaîne de mesure biochimique utilisant un Biocapteur conductimétrique avec tout les accessoires de mesure en utilisant une détection synchrone avec enregistrement des mesures des concentrations biochimiques du glucose dans le sang ou dans l'urine [9,13].

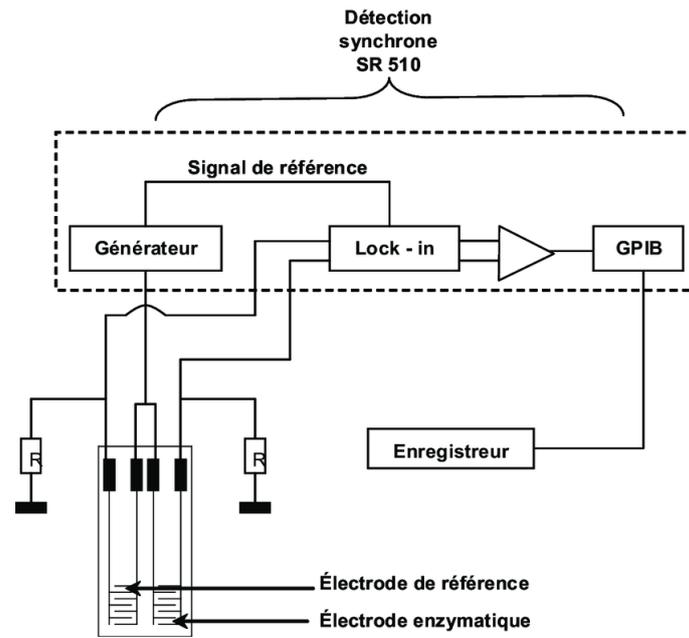


Figure 9. Principe d'une chaîne de mesure biochimique utilisant un Biocapteur conductimétrique [9]

3.1.5. Les transducteurs optiques : Biocapteurs optiques:

Les transducteurs optiques utilisent des technologies diverses basées sur des phénomènes optiques et sont le résultat d'interactions entre l'analyte avec le récepteur. Ce groupe peut être subdivisé selon le type de propriétés optiques utilisées dans les capteurs :

- L'absorbance, mesurée dans un milieu transparent.
- La réflectance, mesurée en milieu non transparent, utilisant généralement un indicateur immobilisé.
- La luminescence, basée sur la mesure de l'intensité de la lumière émise au cours d'une réaction chimique dans le système récepteur.
- L'indice de réfraction, mesuré comme le résultat d'un changement de composition d'une solution. Il peut y avoir aussi un effet de résonance de plasmons de surface.
- L'effet optothermique, basé sur la mesure d'un effet thermique causé par l'absorption de la lumière.
- La diffusion de la lumière, basée sur des effets causés par des particules de taille définie présentes dans l'échantillon.
- L'application de ces phénomènes à des capteurs est rendue possible grâce à l'utilisation de

fibres optiques dans diverses configurations. Ces dispositifs sont appelés optodes ou optrodes [9,10].

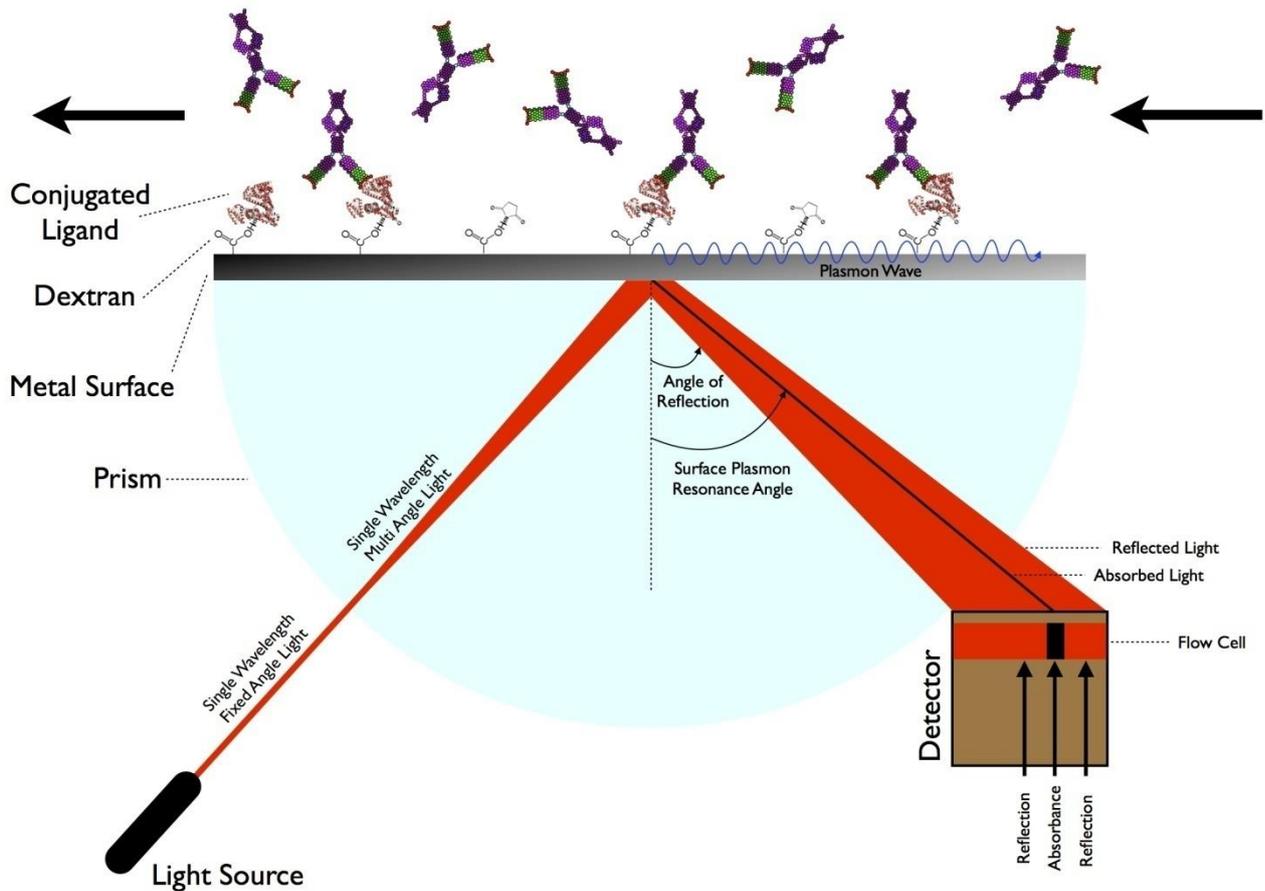


Figure10. Principe d'une de mesure biochimique utilisant un Biocapteur optique a Résonance plasmon de surface [9]

Le principe de ce type de Biocapteurs optiques illustre en figure10 est basé sur la **résonance des plasmons de surface** (ou en anglais : surface plasmon resonance) est un phénomène physique d'interaction lumière-matière principalement connu pour son utilisation comme méthode de mesure de la liaison d'un « ligand » sur un « récepteur » adsorbé à la surface d'une couche métallique.

La résonance de plasmons de surface est une oscillation de densité de charges pouvant exister à l'interface entre deux milieux ou matériaux ayant des constantes diélectriques de signes opposés comme un conducteur immergé dans un liquide diélectrique. Dans le cas d'un conducteur, les électrons libres (couche de valence) constituent un gaz (plasma) à sa surface. Son oscillation peut être décrite par une onde ayant un maximum au niveau de l'interface avec le diélectrique et décroissant de façon exponentielle (évanescence) dans les deux milieux. Ces plasmons de surface peuvent être mis en résonance à l'aide d'une onde électromagnétique remplissant certains critères comme la longueur d'onde² par rapport à la taille de la structure métallique [2,10].

3.1.6. Transducteurs gravimétriques:

Dans ce type de transducteurs, les capteurs sensibles à la masse transforment les variations de masse d'une surface spécialement modifiée en un changement de propriété du matériau support. La variation de masse est causée par une accumulation d'analyte [6.7].

3.1.7. Biocapteurs piézoélectriques :

Les dispositifs piézoélectriques mesurent une variation de fréquence d'un oscillateur à quartz, causée par l'accrochage d'une quantité d'analyte sur l'oscillateur (Figure 11). Ils peuvent être utilisés

autant en solution qu'en phase gazeuse. La vibration des cristaux piézoélectriques produit un champ électrique oscillant dans lequel la fréquence de résonance du cristal dépend de sa nature chimique, de sa taille, de sa forme et de sa masse. En plaçant le cristal dans un circuit oscillant de mesure, la fréquence peut être mesurée en fonction de la masse. Lorsque la variation de masse Δm est très faible par rapport à la masse totale du cristal, la variation de fréquence Δf est liée à Δm par la relation :

$$\Delta f = c f_0^2 \Delta m/A \quad (2)$$

f_0 est la fréquence de vibration du cristal dans le circuit,

A la surface d'un cristal de quartz,

C la constante obtenue à partir du matériau du cristal et son épaisseur [10].

Les cristaux piézoélectriques, parfois appelés microbalances à cristal de quartz, sont typiquement constitués d'un cristal de quartz et fonctionnent à des fréquences entre 1 et 10 MHz. Ces instruments peuvent être utilisés pour des liquides, avec une limite de détermination des fréquences de l'ordre de 0,1 Hz ; la limite de détection de masse liée à la surface de l'électrode est de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-11} g.

Les biocapteurs piézoélectriques apportent une réponse rapide mais leurs inconvénients résident dans la fixation de composés non spécifiques [10].

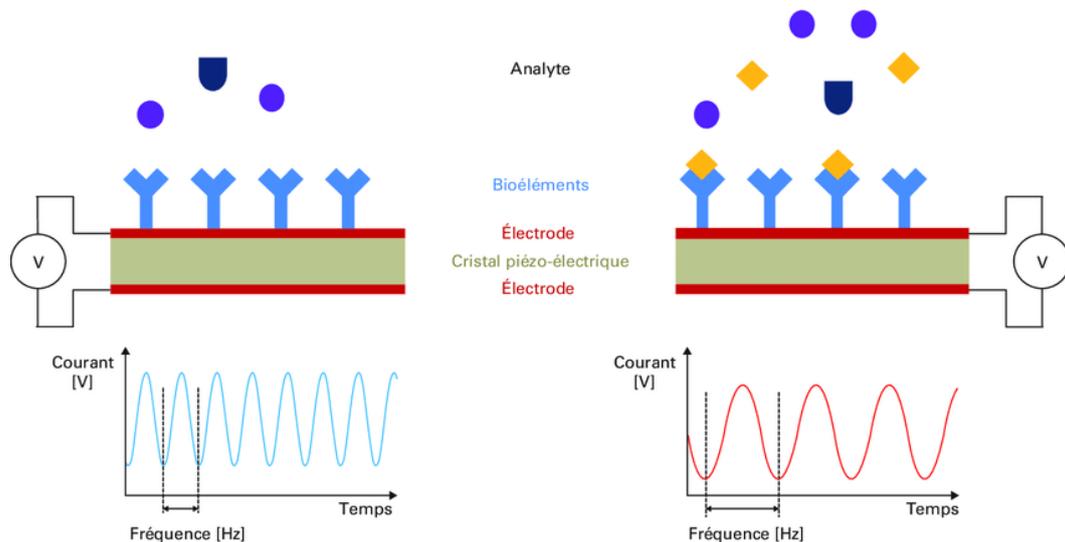


Figure 11. Principe général de fonctionnement des Biocapteurs piézoélectriques [12]

3.1.8. Biocapteurs acoustiques :

Les dispositifs à ondes acoustiques de surface utilisent la modification de la vitesse de

propagation d'une onde acoustique, affectée par le dépôt d'une masse définie d'analyte (Figure12). Les biocapteurs basés sur une transduction acoustique sont surtout utilisés pour la détection de micro-organismes. D'autres exemples d'applications concernent la détection d'organismes génétiquement modifiés [1].

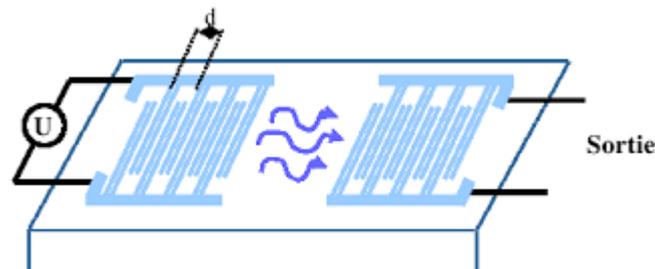


Figure12. Principe général de fonctionnement des Biocapteurs acoustiques [1]

3.1.9. Quartz:

Une deuxième approche consiste à greffer selon la procédure de Langmuir-Blodgett l'élément biosensible sur un quartz piézoélectrique intégré dans un oscillateur. On dispose alors d'une information directement numérique. En effet, il est connu de longue date, des physiciens des couches minces, que sous vide la masse superficielle d'un dépôt se formant sur une face d'un quartz vibrant, le plus souvent de coupe AT, est déterminée à partir de la dérive de fréquence résultant de ce dépôt.

L'anticorps est choisi comme biorécepteur dans ce travail dans le but de détecter un agent pathogène et comme mode de transduction, nous avons choisi la diffusion Raman parce qu'elle est non destructive, non invasive et permet d'analyser de très faibles quantités d'échantillons. La transduction piézoélectrique double la signature Raman par sa très haute sensibilité (mesure des masses de l'ordre du nanogramme) [12].

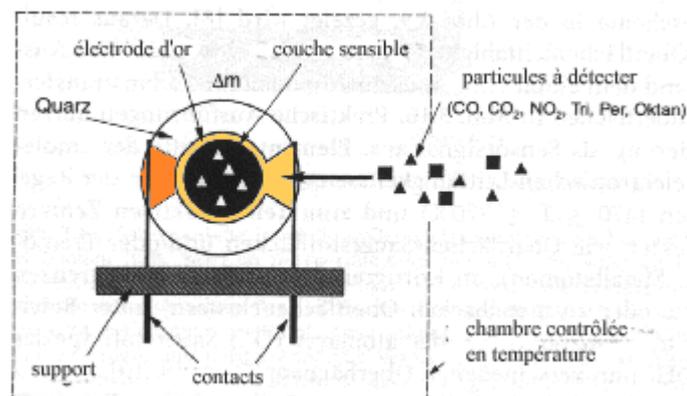


Figure13. Procédure de Langmuir-Blodgett utilisant le quartz comme oscillateur [1]

Il a été montré que, dans certaines conditions, cette procédure peut aussi être utilisée en phase liquide et là encore la fréquence d'oscillation du quartz immergé dans une solution décroît proportionnellement à l'accroissement de masse de l'électrode du quartz.

En modifiant la nature de l'électrode sensible il est donc possible d'imaginer toute une famille de monocapteurs sélectifs. La figure montre le schéma de principe de l'électronique associée [12,13].

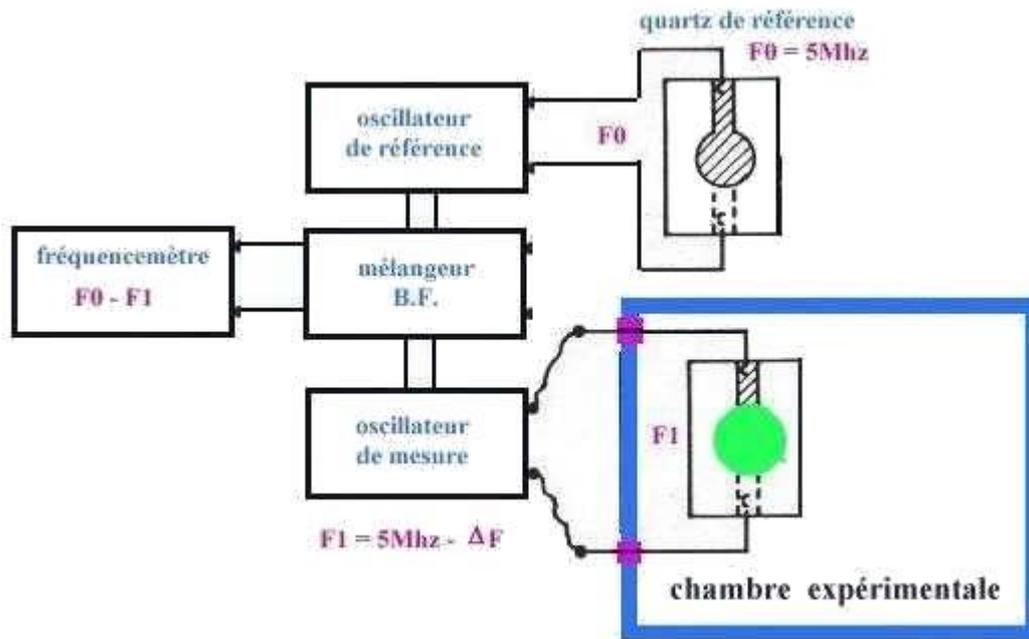


Figure14. Schéma de principe de l'électronique associée avec monocapteurs sélectifs [13]

On constate la présence de deux oscillateurs: l'un de référence, l'autre de mesure associés à deux quartz de même type. On pourra ainsi s'affranchir des dérives thermiques du capteur et mesurer la différence des deux fréquences avec une grande précision. Remarquons que la variation maximale de fréquence que peut accepter le quartz est d'environ de 2% de sa fréquence initiale. Au delà la vibration sera trop amortie et l'oscillateur ne fonctionnera plus. On utilisera donc de préférence un quartz de fréquence initiale élevée (5MHz) afin d'avoir une plage de mesure relativement étendue (100kHz avec une précision de mesure de 1Hz soit environ 10^{-8} g).

Notons enfin qu'il est possible de déposer sur le quartz une couche poreuse à l'humidité. On dispose alors d'un capteur d'humidité très sensible. Il suffit pour reconditionner le quartz de le chauffer afin d'évaporer l'eau adsorbée. Cette faculté est peu employée, mais par contre c'est un inconvénient pour les quartz utilisés dans les oscillateurs à fréquence très stable, c'est pourquoi les quartz vibrants sont généralement intégrés dans un boîtier étanche, sous vide de préférence afin d'éviter toute dérive due à une adsorption de vapeur d'eau [13].

4. Microtechnologies:

Enfin en exploitant certaines techniques de la microélectronique (microlithographie) on peut déposer sélectivement des couches actives selon une géométrie définie par des masques et obtenir des capteurs microniques et multiparamètres. A titre d'exemple la figure ci-après montre un réseau de capteurs déposés sur substrat souple de polyimide. Chaque capteur comporte deux électrodes en couche mince de platine de 60nm d'épaisseur dont l'une (celle de

référence) est recouverte de AgCl et deux électrodes, dites de travail, constituées d'une couche de platine recouverte d'une couche active. La topologie des diverses électrodes et des conducteurs de liaison est obtenue par lithogravure. Ce capteur étant destiné au dosage du lactate et du glucose une double membrane sélective de type hydrogel de 4 μ m d'épaisseur est déposée en 2 étapes et aussi lithographiée. Les couches actives ont une surface de 0.4mm² tandis que les couches d'isolement (photoresist) ont 1 μ m d'épaisseur [6,7].

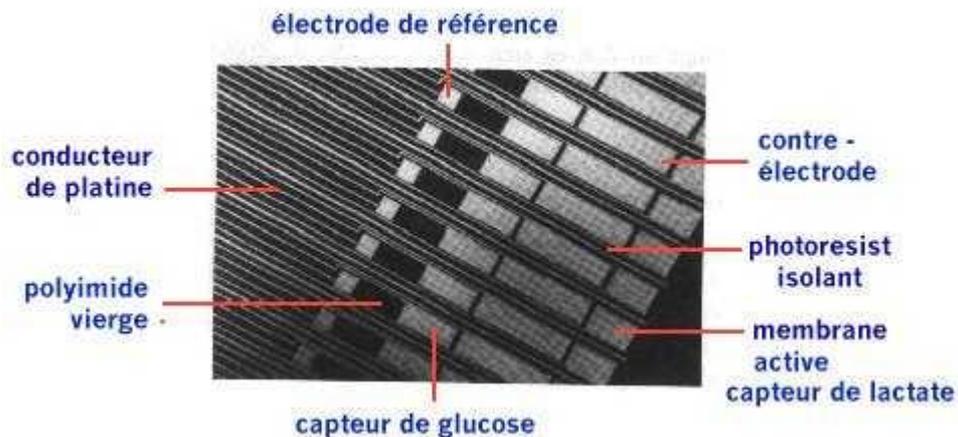


Figure15. Microstructure de deux Microbiocapteurs de glucose et de lactate [6]

Un tel dispositif sera ensuite découpé au niveau de la couche de photoresist en autant de microcapteurs individuels de 0.7 mm de largeur montés dans une sonde aiguille et destinés à des mesures in vivo [6].

Références bibliographiques:

1. Boudrant J & al., capteurs et mesures en biotechnologie, Lavoisier (Paris), 1994.
2. Ahlers H., Multisensorikpraxis, Springer Verlag (Heidelberg), 1997.
3. Popescu M. & al., analyse et traitement physicochimique des rejets atmosphériques industriels, Lavoisier (Paris), 1998
4. Förstner U., Umweltschutztechnik, Springer Verlag (Heidelberg), 1992
5. Taright Y., Concept de nez électronique, thèse de doctorat, Rouen, 1999
6. Nenov T. & al., Ceramic Sensors, Technomic Publishing Company (Basel), 1996
7. Horn M., Makadmini L., Sensor und Messysteme, Bad Nauheim, März 11-13, 1996
8. Le Coz Ch., Mesures et Environnement, Presses des ponts et Chaussées (Paris), 1997
9. Göpel W., Sensors - A Comprehensive Survey, Vol.2: Chemical and Biochemical Sensors, VCH Weinheim (Basel), 1991
10. Moseley P.T., Tofield B.C., Solid State Gas Sensors, IOP Publishing (London), 1987
11. Zdanevitch I & al., Temperature dependence of gas sensitivities on a catalytic thin film, Sensors and Actuators B, 13-14 (1993), pp 679-681.
12. Hubin M, Debrie R, Valleton JM., Biocapteurs à quartz piézoélectrique, CAPTEURS 89, PARIS, juin 1989, pp 35-43
13. Bizet, K., Gabrielli, C., Perrot, H. and Thérasse, J., La microbalance à quartz électrochimique : perspectives d'application en biologie médicale. Immunoanal Biol Spéc 1995. 10: 205- 211.
14. Alocilja, E. C. and Radke, S. M., Market analysis of biosensors for food safety. Biosensors and Bioelectronics 2003. 18: 841- 846.
15. Paddle, B. M., Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. Biosensors & Bioelectronics 1996. II: 1079- 1113.

