

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

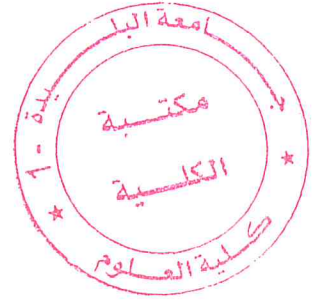
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة سعد دحلب البليدة 1

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1



كلية العلوم – دائرة الفيزياء
Faculté des Sciences
Département de Physique



**MEMOIRE
POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MASTER EN PHYSIQUE**

Option : Nanophysique

THÈME

**Etude et simulation de surfaces fonctionnalisées pour
les réactions enzyme-substrat pour la bio-mesure dans
un microcanal**

Présenté par :

Sarah Semiani

Soutenu le 11/10/2018 devant le jury composé de :

Dr. S. Aoudj	MCB, USDB-1	Président
M. A. Benhaffaf	MAA, USDB-1	Examineur
Dr. A. Hassein-Bey	MCB, USDB-1	Encadreur
A.L.S.Hassein-Bey	Doctorante LMD USDB-1	Co-Encadreur

ملخص

العديد من تفاعلات الإنزيم المحفز طاردة للحرارة بكميات قليلة جدًا . يمكن أن تصل أجهزة الاستشعار البيولوجي استنادًا إلى قياس هذه الحرارة إلى كشف وقياس تركيز الحليلة. هذا يمثل نوع المستشعر الحيوي الأكثر قابلية للتطبيق بشكل عام.

الهدف من هذا العمل هو تنفيذ مختلف الظواهر multiphysical (ميكانيكا السوائل، وعلى microfluidics، تبادل الحرارة، والطاردة للحرارة رد فعل الإنزيم الركيزة، transducing طبقات حساسة الكهربائية مقاوم، ...) في COMSOL. بدءًا من الأعمال السابقة القائمة على دراسة ومحاكاة تمييز الأنواع المتناهية، في محاولة للوصول إلى تقديم محاكاة سلوك الطبقة الحساسة للحرارة على أساس المواد باستخدام طريقة العناصر المحدودة .

Résumé

De nombreuses réactions catalysées par des enzymes sont exothermiques, générant de très petites quantités de chaleur. Des biocapteurs basés sur la mesure de cette chaleur peuvent arriver à la détection et mesure de concentration d'analyte. Ceci représente le type de biocapteur le plus généralement applicable.

Le travail de ce projet consistera à implémenter les différents phénomènes multiphysiques (mécanique des fluides, microfluidique, échange de chaleurs, réaction exothermique enzyme-substrat, transduction électro-résistive des couches sensibles, ...) dans comsol multiphysics. En partant de travaux précédents sur l'étude et la simulation de la dilution d'espèces dans microcanal, essayer d'arriver à prévoir par simulation par la méthode des éléments finis le comportement de la couche thermosensible à base de matériaux à transition de phase.

Abstract

Many enzyme catalyzed reactions are exothermic, generating very small amounts of heat. Biosensors based on the measurement of this heat can arrive at the detection and measurement of analyte concentration. This represents the type of biosensor most generally applicable.

The work of this project will consist in implementing the various multiphysical phenomena (fluid mechanics, microfluidics, heat exchange, enzyme-substrate exothermic reaction, electro-resistive transduction of sensitive layers, ...) in comsol multiphysics. Starting from previous work on the study and the simulation of the dilution of species in microchannel, try to arrive to predict by simulation by the method of the finite elements the behavior of the thermosensitive layer based on materials with phase transition.

Remerciement

Ce travail de master a été mené au niveau de l'université de Blida 1, ma profonde reconnaissance va à mon encadreur **Dr. A. Hassein-Bey** pour son entière disponibilité, son soutien régulier, ses précieux conseils et pour ses enseignements et son savoir.

Je tiens aussi à remercier les professeurs du département de physique pour le savoir qu'ils m'ont transmis tout au long de mon parcours de master.

Je tiens également à remercier **Mlle A.L.S Hassein-Bey** ma Co-promoteur pour son soutien et pour son aide et ses précieux conseils.

Je remercie aussi tous le corps professoral et administratif de la spécialité Nano-Physique,

je remercie tout particulièrement le chef de département de physique **M. Aziz Mouzali**.

Je remercie **Dr. Sallah Eddine Aoudj** pour avoir accepté de présider mon jury de Master ainsi que **M. Abderahmane Benhaffaf** mon examinateur.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidés de près ou de loin à bien mener cette étude.

Dédicace

C'est avec une profonde gratitude et sincérité

Que je dédie ce modeste travail de master

❖ *À mes chers Parents qui ont sacrifié leur vie pour ma*

Réussite et m'éclairé mon chemin par leurs

Conseils judicieux

J'espère qu'un jour,

Je pourrais leur rendre un peu de ce qu'ils ont

Fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie

Je dédie aussi ce travail

❖ *À mon mari, mes frères et sœurs, mes beaux frères, mes belles sœurs, les deux familles Boufrina et Semiani, mes amis et mes professeurs*

Semiani Sarah

Liste des symboles et des abréviations

μ-TAS	<i>Micro-Total-Analysis-System</i>
BioMEMS	<i>Biologic Micro-Electro-Mechanical Systems</i>
PDMS	<i>PolyDiMethylSiloxane</i>
LOC	<i>Lab-On-a-Chip</i>
MEMS	<i>Micro-Electro-Mechanical Systems</i>
Re	Nombre de Reynolds
R_H	Résistance Hydraulique
SU8	Résine Negative
LIGA	Lithographie, Galvanoformung, Abformung
PH	Potential Hydrogen
TELISA	Thermometric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Table des matières

Résumé.....	2
Remerciement.....	4
Liste des symboles et des abréviations.....	6
Liste des illustrations, graphiques et tableaux.....	10
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE 1	16
ÉTAT DE L'ART DES MICROSYSTÈMES	16
1.1. Systèmes Micro électromécanique (MEMS).....	17
1.1.1. MEMS, que sont-ils ?	17
1.1.2. Domaines d'application des MEMS.....	17
1.1.3. La micro fabrication	19
1.1.3.1. Les méthodes de la micro fabrication.....	20
1.2. BIOMEMS.....	36
1.2.1. Introduction générale.....	36
1.2.2. Applications des BioMEMS.....	37
1.2.2. Matériaux utilisé dans les BIOMEMS	38
1.3 Les biocapteurs.....	39
1.3.1. Historique	39
1.3.2. Définition	40
1.3.3. Les différents types de biocapteurs.....	41
CHAPITRE 2.....	60
BIOCAPTEUR A BASE DE COUCHE FONCTIONNALISE	60
2.1 Les enzymes comme biorecepteur	61
2.1.1 Les enzymes, Introduction et historique.....	61
2.1.2 Définition et généralités	62
2.1.3 Classification des enzymes.....	64

2.1.4.	Avantages et inconvénients	65
2.1.4.	Les cofacteurs	66
2.1.5.	La catalyse enzymatique	67
2.1.6.	Le modèle de Michaelis & Menten L'équation de Michaelis & Menten ...	69
2.1.7.	Les constantes cinétiques.....	70
2.1.9	Facteurs influençant la vitesse des réactions enzymatiques	71
2.1.10	L'immobilisation de l'enzyme	74
2.1.11	Effets de l'immobilisation des enzymes :	78
2.1.12	La fabrication de puces de capteurs enzymatiques.....	79
2.1.13	Conclusion.....	80
2.2	Les oxides de vanadium	80
2.2.1	Le composé VO ₂	80
2.2.2	Les propriétés physiques de VO ₂	80
Chapitre 3.....		82
MODÉLISATION DU PROCESSUS DE MESURE À BASE D'UN BIOCAPTEUR.....		82
3.1	Introduction	83
3.2	lois de comportement.....	83
3.3	Nombre de Reynolds	84
3.4	Nature de l'écoulement	85
3.5	Équation de Navier-Stokes	86
3.6	Résistance hydraulique.....	88
3.7	Diffusion et mélange	88
3.8	Etude d'une cinétique de réaction.....	92
3.9	Méthode séparative.....	92
3.10.	Méthode des éléments finis	93
3.11.	Comsol Multiphysiques	94

Chapitre 4.....	96
MODÉLISATION ET SIMULATION D'UN BIOCAPTEUR À BASE DE RÉACTION ENZYMATIQUE EXOTHERMIQUE	96
4.1 Définition du model :	100
4.1.1 Paramètres de modèle	101
4.1.2 La physique du modèle	102
4.2 Résultat et discussion :	107
4.2.1 La température :	107
4.2.2 Concentration des espèces	108
Conclusion Générale.....	110

Liste des illustrations, graphiques et tableaux

Figure 1 : Les différents applications des MEMS.....	19
Figure 2 : La révélation par dissolution en fonction du type de résine	21
Figure 3: Masque utilisé en recherche en laboratoire. Les motifs ont une précision inférieure au micromètre.....	21
Figure 4: profil de gravure obtenu avec (a) une gravure chimique humide isotrope et (b) une gravure anisotrope sèche dans un système de gravure par plasma ou par ions réactifs	23
Figure 5: Un processus de micro-usinage en vrac humide est utilisé pour fabriquer une membrane avec des éléments piézorésistifs	24
Figure 6: caractéristiques gravées de manière anisotrope dans une plaquette (100) avec (a) un masque carré (schématique) et (b) un masque rectangulaire (micrographie au microscope électronique à balayage des rainures en V et en U résultantes.....	25
Figure 7: G.M.Rebeiz, 3eme atelier canadien sur les MEMS, exposé invité, août 2003.....	27
Figure 8: Micrographie SEM des cantilevers en polysilicium illustrant (a) la déviation vers le haut de la poutre et (b) le problème de friction[5].....	28
Figure 9: Procédé de micro-usinage de surface en silicium polycristallin pour la fabrication d'un curseur à rail central	29
Figure 10: Séquences de fabrication de LIGA: (a) irradiation synchrotron de résine photosensible, (b) développement de résine photosensible exposée, (c) électroformage de microstructure métallique, (d) fabrication d'insert de moule, (e) remplissage de moule et (f) démoulage.....	30
Figure 11: Échantillon de nickel produit par la méthode LIGA. La longueur totale est de 3,1 mm et la largeur de l'échantillon au centre est de 200 mm [5]. ..	31
Figure 12: Emballage hermétique.....	32
Figure 13: AlN (gauche), 96 % Al ₂ O ₃ (Haut), et 92% Al ₂ O ₃ (droite) boîtiers de niveau puce avec une métallisation en couche épaisse	33

Figure 14: Capteur de pression micro-usiné en vrac représenté en coupe. Le capteur contient un mince diaphragme de silicium formé par attaque de la tranche de silicone avec un hydroxyde alcalin. la déviation du diaphragme dépend de la pression et est détectée par des piézorésistances dopées au bore	34
Figure 15: Chambre PCR micro-usinée.....	35
Figure 16: Schéma de base d'un <i>BioMems</i>	37
Figure 17: Microlaboratoires (a et b (puce à ADN)) et (c) réseau d'aiguilles.....	39
Figure 18: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur	40
Figure 19: Exemple d'un biocapteur manométrique : biocapteur à glucose développé par Jenkins & Delwiche (précision du biocapteur 0.2 mM, gamme de travail : de 0 à 5 mM)	41
Figure 20: Exemple d'un biocapteur piézoélectrique	42
Figure 21: Exemple d'un biocapteur thermique (gamme de travail : de 0,5.....	43
Figure 22 : Représentation de la Green Fluorescent Protein (référence PDB : 1EMA).....	44
Figure 23: (a) Principe d'un biocapteur à onde évanescente. (b) Exemple d un biocapteur à onde évanescente	45
Figure 24: Les différents types de détection électrochimique	47
Figure 25 : Schéma du principe de fonctionnement des trois types de biocapteurs ampérométriques:(a) sans médiateur, (b) avec médiateur,(c) avec transfert direct	49
Figure 26: paramètres que les médecins et les consommateurs souhaitent évaluer en utilisant des capteurs	51
Figure 27: Focus biocapteurs	51
Figure 28: surveillance à distance des patients prévisions de revenus du marché europe 2006-2015	51
Figure 29 : Acteurs du marché : Hardware	52
Figure 30 : Laboratoire sur puce « <i>lab on chip</i> ».....	53
Figure 31: Un microréacteur chimique à base de microcanal.....	54
Figure 32: Les Microcanaux fabriqués en différents matériaux : (a) Microcanaux en PDMS, (b) microcanaux en silicium, (c) microcanaux en verre.....	54

Figure 33: Structure chimique du PDMS.....	55
Figure 34: Évaluation du module d'Young	56
Figure 35: Angle de contact naturel du PDMS.....	57
Figure 36: Les différentes phases de réalisation du moule par photolithographie.	57
Figure 37: Exemple d'un moule permettant la réalisation du générateur de gradient de la figure 31	58
Figure 38: Moulage et finalisation du PDMS.....	58
Figure 39: Exemple de démoulage	59
Figure 40: Exemple de réalisation finalisée	59
Figure 41: Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine	62
Figure 42: Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine....	63
Figure 43: Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine (le glucose oxydase).....	63
Figure 44: Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine (le glucose des hydrogénase).....	64
Figure 45: Schéma du mécanisme de la catalyse enzymatique de la GDH.....	67
Figure 46:(a) Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme. (b) Effet de la diminution de l'énergie d'activation sur le nombre de molécules susceptibles de réagir.....	68
Figure 47: Schéma du mécanisme d'un cycle de catalyse enzymatique (type protéase).....	69
Figure 48: Relation hyperbolique entre la vitesse de la réaction enzymatique (V) et la concentration initiale du substrat ($[S]_0$) pour une concentration en enzyme ($[E_0]$) donnée.....	70
Figure 49: Représentation de Lineweaver et Burk (avec K_M , la constante de Michaelis, $[S]_0$ la concentration initiale du substrat et V_{max} , la vitesse maximale de la réaction enzymatique).	72
Figure 50: Effet de la température sur l'activité enzymatique. Activation par la chaleur (zone A) et dénaturation thermique (zone B)	72
Figure 51: Effet du pH sur l'activité enzymatique.....	73
Figure 52: Adsorption des enzymes sur un support.....	76
Figure 53: Réticulation et co-réticulation des enzymes.....	76
Figure 54: Greffage covalent des enzymes.	77

Figure 55: Encapsulation des enzymes.....	78
Figure 56: Mesures de résistance électrique en fonction de la température d'un film mince de VO ₂	81
Figure 57: Différents exemples de micro-fluidique. a) veines dans une feuille d'érable, b) puce micro fluidique fabriquée au L.O.F.	83
Figure 58 : Générateur de gradient développé au laboratoire SATIE de l'ENS Cachan.	84
Figure 59: Caractérisation du type d'écoulement en fonction du nombre de Reynolds Re.	86
Figure 60: Résolution de l'équation de Poiseuille dans le cas d'une canalisation circulaire.	87
Figure 61: (a) Profil d'un écoulement plan, (b) Profil d'un écoulement section rectangulaire.	87
Figure 62: (a) Exemple d'un circuit microfluidique, (b) exemple d'un circuit électrique.	88
Figure 63: (a) Exemple d'un circuit en Y et (b) la simulation du transport de matière	88
Figure 64: (a) $Pe > 1$, Convection des 2 produits, (b) $Pe < 1$, convection et diffusion des 2 produits	89
Figure 65: Schéma de principe d'un circuit en T.....	92
Figure 66: Exemple d'un filtre en H	93
Figure 67: Comsol Multiphysiques.....	94
Figure 68: Modules de COMSOL	95
Figure 69: Simulation d'un biocapteur enzymatique avec Comsol.....	100
Figure 70: La physique de l'écoulement laminaire.....	102
Figure 71: La réaction chimique.....	104
Figure 72: La physique de réaction de surface.....	104
Figure 73: La physique de transfert de chaleur dans les fluides.....	105
Figure 74 : La physique de transport d'espèces diluées.....	106
Figure 75 : La température due au dégagement de chaleur causé par la réaction enzyme-substrat.	107
Figure 76 : concentration de l'espèce A à $t=100s$	108
Figure 77: concentration de l'espèce A à $t=0s$	108

Figure 78 : concentration de l'espèce B à t=50s.....	109
Figure 79 : concentration de l'espèce B à t=100s.....	109
Tableau 1 : Les applications des MEMS.	18
Tableau 2: Classification des enzymes.	65
Tableau 3 : Exemple de facteur d'accroissement de la vitesse de réaction.	66
Tableau 4: paramètre pour la simulation d'un biocapteur enzymatique	101

INTRODUCTION GENERALE

La surveillance des maladies d'origine alimentaire et des flambées de mortalité dues à la contamination de la nourriture par des pathogènes constituent une priorité mondiale en terme d'efforts pour la santé par les pouvoirs publics et les industries agroalimentaires. Ces maladies infectieuses sont responsables de 40% des 50 millions de décès recensés chaque année dans le monde notamment en Afrique subsaharienne. Il est donc nécessaire de trouver des techniques d'analyse efficaces, faciles à mettre en œuvre, peu coûteuses, très sensibles, spécifiques et permettant une détection rapide de ces pathogènes.

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.

CHAPITRE 1

ÉTAT DE L'ART DES MICROSYSTÈMES

1.1. Systèmes Micro électromécanique (MEMS)

À la fin des années 80, un nouveau domaine est apparu parmi les chercheurs et ceux qui s'intéressent au monde de la technologie, connu sous le nom de microsystèmes ou micro électromécanique systèmes (*MEMS*) qui est le nom le plus commun, indépendamment du nom, les questions sont :

Que sont-ils et quels sont ses domaines d'application.

1.1.1. MEMS, que sont-ils ?

Les micro-électromécaniques systèmes (*MEMS*) sont une technologie de processus utilisée pour créer de minuscules dispositifs ou systèmes Intégrés qui combinent des composants mécaniques et électriques. Elles sont fabriquées en utilisant des techniques de traitement par lots de circuit intégré (*IC*) et peut varier en taille de quelques micromètres à millimètres. Ces appareils (ou systèmes) ont la capacité de détecter, contrôler et agir à l'échelle micro, et générer des effets à l'échelle macro [1].

1.1.2. Domaines d'application des MEMS

Aujourd'hui, MEMS à haut volume peut être trouvé dans une diversité d'applications à travers plusieurs marchés (tableau 1):

L'expérience acquise avec ces premières applications MEMS en a fait une technologie habilitante pour de nouvelles applications biomédicales (souvent appelées bioMEMS) et des communications sans fil composées à la fois de systèmes optiques, également appelés systèmes micro-opto-électromécaniques (MOEMS) et de radiofréquences (RF) MEMS [1].

Tableau 1 : Les applications des MEMS [1].

Automotive	Électronique	Médical	Communications	Défense
Capteur de navigation interne	Têtes de disque	Capteur de pression artérielle	Composants de réseau à fibres optiques	Guidage des munitions
Capteur de compresseur de climatisation	Têtes d'impression à jet d'encre	Stimulateurs de muscle et systèmes d'administration de médicaments	Relais RF, commutateurs et filtres	Surveillance
Capteurs de force de freinage et accéléromètres de contrôle de suspension	Télévision à écran de projection	Capteurs de pression implantés	Écrans de projection dans les appareils de communication portables et l'instrumentation	Systèmes d'armement
Capteurs de niveau de carburant et de pression de vapeur	Capteurs de tremblement de terre	Prothèses	Oscillateurs à tension contrôlée (VCO)	Capteurs embarqués
Capteurs d'airbag	Capteurs de pression avionique	Instruments analytiques miniatures	Séparateurs et coupleurs	Stockage de données
Pneus "intelligents"	Systèmes de stockage de masse	Pacemakers	Lasers accordables	Contrôle d'aéronef

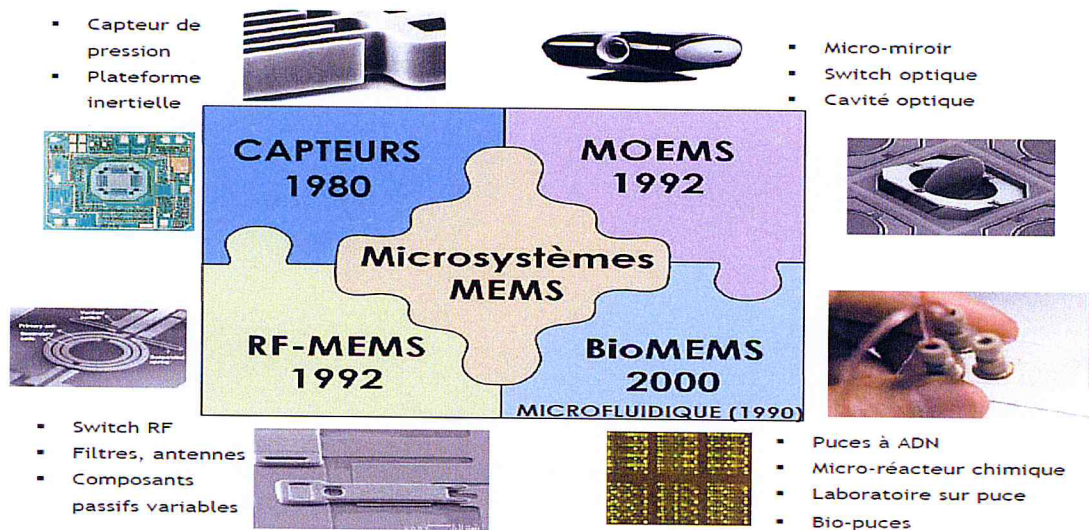


Figure 1 : Les différentes applications des MEMS [1].

1.1.3. La micro fabrication

La micro fabrication est de plus en plus au centre de la science et de la technologie modernes.

De nombreuses possibilités technologiques découlent de la capacité de fabriquer de nouveaux types de microstructures ou de reconstituer des structures existantes dans des versions de taille réduite.

Les exemples les plus évidents sont en microélectronique. Les microstructures devraient également être l'occasion d'étudier les phénomènes scientifiques de base qui se produisent à de petites dimensions : un exemple est le confinement quantique observé dans les nanostructures. Bien que la micro fabrication repose sur la microélectronique et que la plupart des recherches en micro fabrication se soient concentrées sur les dispositifs microélectroniques, Cependant, les applications dans d'autres domaines émerge rapidement.

Ceux-ci comprennent des systèmes pour la microanalyse, les réacteurs à micro-volume, la synthèse combinatoire, les systèmes micro-électromécaniques (MEMS) et les composants optiques [2].

1.1.3.1. Les méthodes de la micro fabrication

- **La photolithographie**

Permet la délimitation des zones accessibles à la gravure et des zones non accessibles.

- La lithographie est une technique d'impression créée à la fin du 18e siècle par Aloys Senefelder. Du grec lithos (pierre) et graphein (écrire) le principe est de reporter sur une pierre calcaire plane un motif à l'aide d'un mélange gras (cire, suif et noir de fumée). La pierre est ensuite passée à l'eau forte (acide nitrique en solution aqueuse) le gras du motif repousse la solution, il sert de masque à l'attaque de la pierre. Le motif est alors en relief et une fois encré peut être imprimé. La technique évolue ensuite tout le long du 19e siècle passant de la pierre, à la plaque de cuivre ou de zinc, les techniques du report de motif et de sa gravure s'industrialisent.

- Le procédé de photolithographie est employé pour la première fois par l'inventeur de la photographie Nicéphore Niepce vers 1815. Il permet le report d'une épreuve photographique sur une pierre lithographique. Celle-ci est recouverte d'une couche fine d'une émulsion sensible. Le négatif de la photographie est posé sur la surface séchée, puis lesté par une plaque de verre. L'ensemble est exposé à la lumière pendant quelques heures, les zones sombres du négatif protègent l'émulsion. Toutes ces parties non exposées sont ensuite dissoutes mettant à nu la pierre qui est ensuite attaquée par le mordant. Toute l'émulsion est ensuite évacuée avant encrage et impression. Le négatif a servi de masque pour délimiter les zones.

- La photolithographie dans la production des MEMS découle des mêmes principes à des échelles micrométriques. Sur le substrat est déposée une couche de résine photosensible, puis le masque comportant le motif est posé. Une insolation est réalisée sur l'ensemble. La zone insolée voit sa solubilité augmenter ou diminuer selon qu'elle est positive ou négative. La résine soluble est éliminée le substrat est alors mis à nu selon les zones choisies et peut alors subir les traitements suivant comme la gravure, des dépôts, etc. [3].

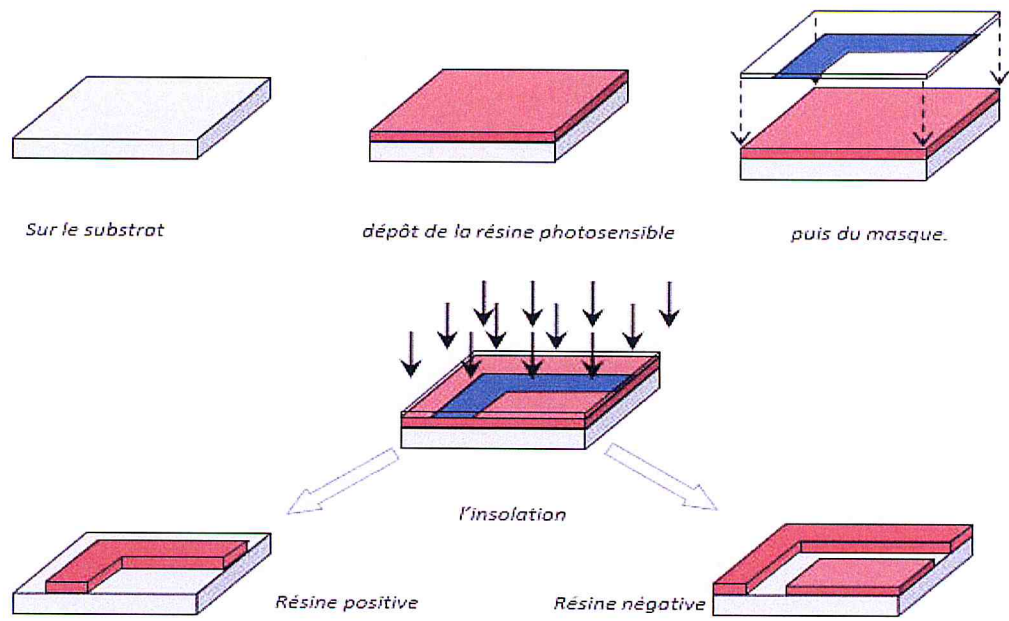


Figure 2 : La révélation par dissolution en fonction du type de résine [3].

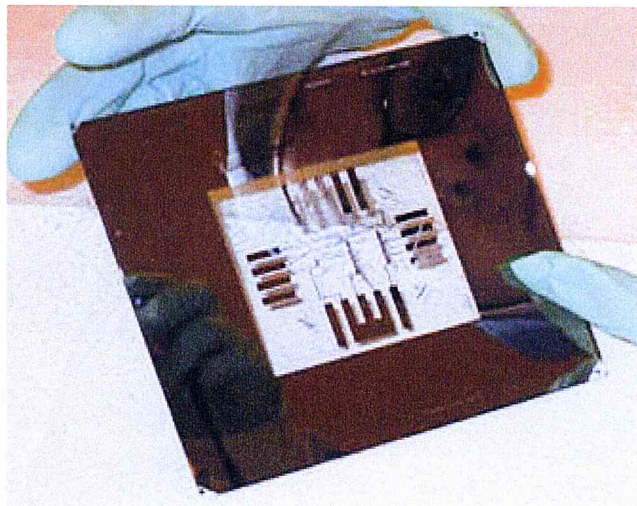


Figure 3: Masque utilisé en recherche en laboratoire. Les motifs ont une précision inférieure au micromètre [3].

❖ **Matériaux pour la microfabrication**

Le silicium est le matériau le plus utilisé pour la fabrication des microsystèmes. En effet, il est [4] :

- Très répandu (fabrication de CI).
- Très grande pureté (99,9999999%).
- Facilement micro usiné.
- Fortement piézorésistif.
- Semi-conducteur (l'intégration des fonctions capteurs et actionneurs avec L'électronique associée).
- Très bonnes propriétés physiques.
- Limite d'élasticité : 7 GPa.
- Module d'Young : 160 GPa.
- Bon conducteur thermique.
- Propriétés optiques peu intéressantes.
- Ses propriétés varient avec la température.
- Il garde son intégrité jusqu'à 500°C.
- Matériau stable.

❖ **Micro-usinage de volume**

Le *bulk micro machining* ou Micro-usinage de volume est la plus ancienne des méthodes. On parle de volume, parce qu'il repose sur un bloc de matériaux, généralement du silicium, dans lequel on va graver le MEMS en créant des trous, canaux, crevasses, etc.

C'est une technique dite soustractive, parce que le substrat est retiré pour révéler la structure désiré. Elle est utile pour les structures épaisses et les formes relativement grossières [5].

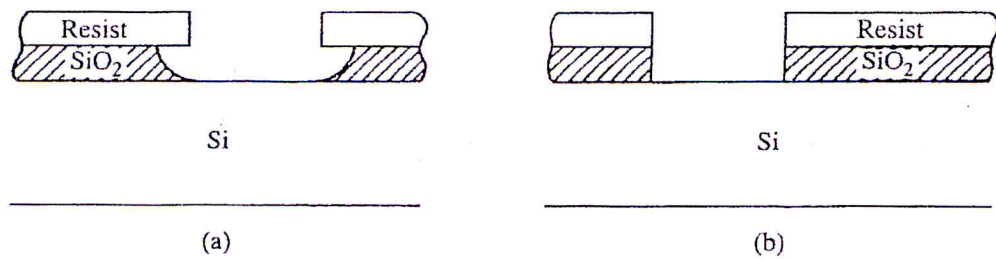


Figure 4: profil de gravure obtenu avec (a) une gravure chimique humide isotrope et (b) une gravure anisotrope sèche dans un système de gravure par plasma ou par ions réactifs [5].

- **Gravure chimique humide**

Au début des MEMS, ce processus de fabrication reposait sur une gravure chimique humide (*wet etching*) utilise entre autres de l'hydroxyde de potassium ou de l'hydroxyde de tétra méthyle ammonium. Le principe est simple.

On plonge le silicium dans un bain contenant l'agent chimique et les parties non protégées par un film en polymère s'érodèrent pour révéler la structure désirée. Cette solution a le mérite d'être rapide et facile à mettre en place. Par contre, elle a le grand inconvénient d'être isotrope. Cela signifie que l'agent chimique va attaquer le substrat dans toutes les directions et il ne sera pas possible de réellement guider la direction de l'excavation. Concrètement, cela veut dire qu'il est presque impossible de descendre en dessous d'un demi pitch de 50 nm [5].

Lorsque l'on s'essaye à des gravures plus fines, le système est trop imprécis et certains motifs seront impossible à réaliser.

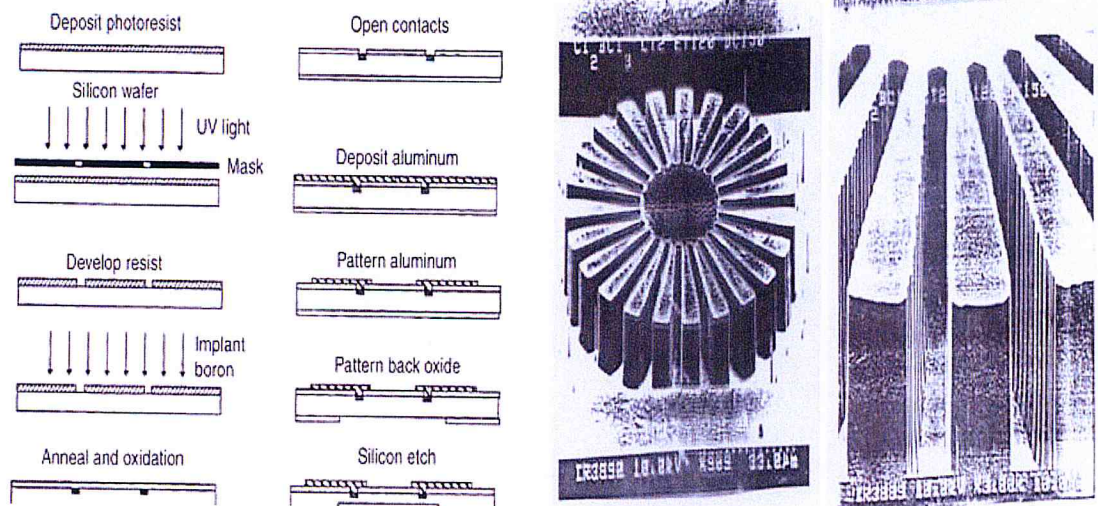


Figure 5: Un processus de micro-usinage en vrac humide est utilisé pour fabriquer une membrane avec des éléments piézorésistifs [5]

- **Gravure ionique réactive profonde**

Pour pallier en partie ce problème, les fondeurs utilisent une gravure ionique réactive profonde (*deep reactive ion etch* ou *DRIE*). C'est un processus hautement anisotrope, c'est-à-dire qu'il est possible de contrôler la direction de l'excavation pour obtenir des motifs plus précis. Cette méthode est aussi utile pour la création de structures verticales et elle a l'avantage d'être rapide. En plus d'être utilisé dans les MEMS, ce processus permet de créer des liens TSV (*Through Silicon Via*), c'est-à-dire des interconnexions traversant les dies qui sont empilés les uns sur les autres [5].

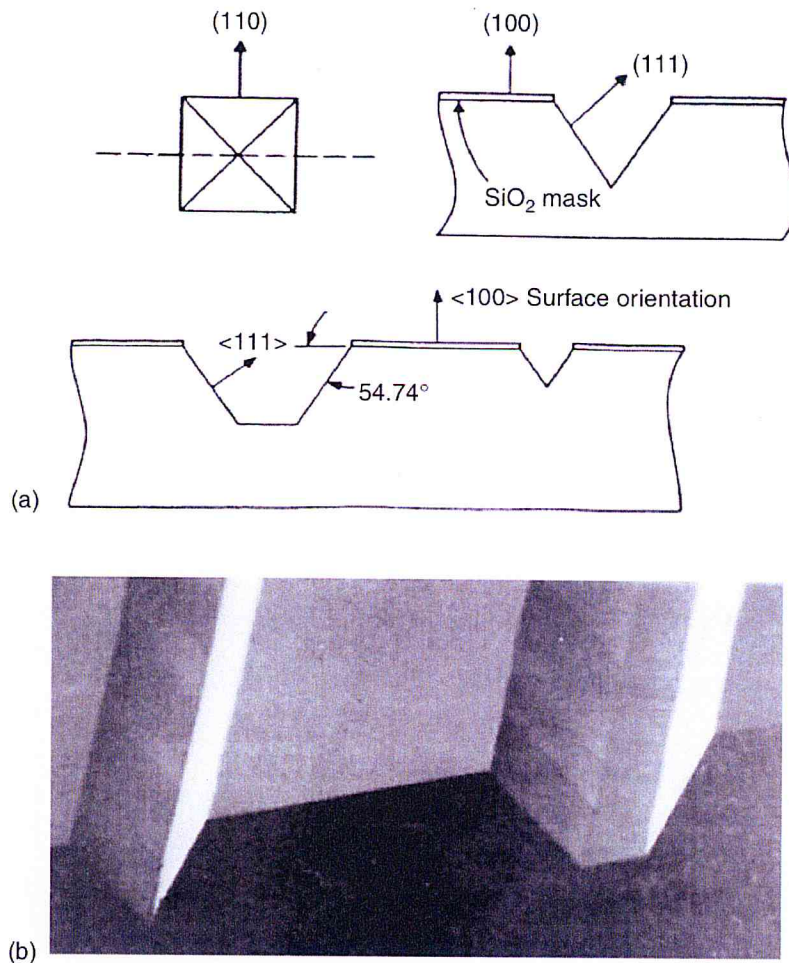


Figure 6: caractéristiques gravées de manière anisotrope dans une plaquette (100) avec (a) un masque carré (schématique) et (b) un masque rectangulaire (micrographie au microscope électronique à balayage des rainures en V et en U résultantes [5].

La gravure ionique réactive profonde utilise en principe le processus de fabrication Bosch, nommé après la compagnie qui en détient le brevet, qui demande la répétition de deux étapes. Dans un premier temps, le wafer est placé presque verticalement et les ions d'un plasma, généralement de l'hexafluorure de soufre, viennent bombarder le silicium. Cette technique est en principe isotrope. Pour obtenir une plus grande précision et une gravure anisotrope, la seconde étape (la passivation) demande la déposition chimique d'un film passif qui va ralentir les effets du bombardement. Le film va protéger l'ensemble et les ions vont alors attaquer le bas de la tranchée que l'on souhaite graver et non les parois. Chaque étape ne dure que quelques secondes et

sont alternées de très nombreuses fois. Par exemple, graver une tranchée de 0,5 mm dans un wafer va demander d'alterner 100 bombardements et 1 000 dépositions.

Il existe une autre méthode qui n'est pas officielle. Le processus cryogénique gèle le wafer à - 100 °C. La gravure isotrope des ions est alors ralentie pendant que l'on bombarde le silicium verticalement. On peut ainsi mieux contrôler la direction des ions. Le grand inconvénient est que le masque qui va servir à graver les motifs à tendance à craquer à cette température.

Même avec une gravure ionique réactive profonde, le micro-usinage de volume est une technique peu chère, mais réservée à des MEMS peu complexes et relativement larges, comme les capteurs de pression de pneus. Pour faciliter la création de structures en 3D, on combine souvent ce processus de fabrication au wafer bonding que nous traiterons plus loin. Les fondeurs font aussi appel à cette méthode lorsque les problèmes de strictions sont trop importants avec le micro-usinage de surface. [5].

❖ **Micro-usinage de surface et LIGA**

Le *surface micromachining*, ou le micro-usinage de surface, est une méthode dite additive, car elle demande l'ajout de plusieurs couches de matériaux dans lesquels seront gravés les mécanismes. C'est une technique qui implique un gaspillage plus important que le micro-usinage de volume. En effet, une grande partie des films de substrat utilisés sont détruits une fois la structure fabriquée, mais à cette échelle, le coût engendré est sans conséquence.

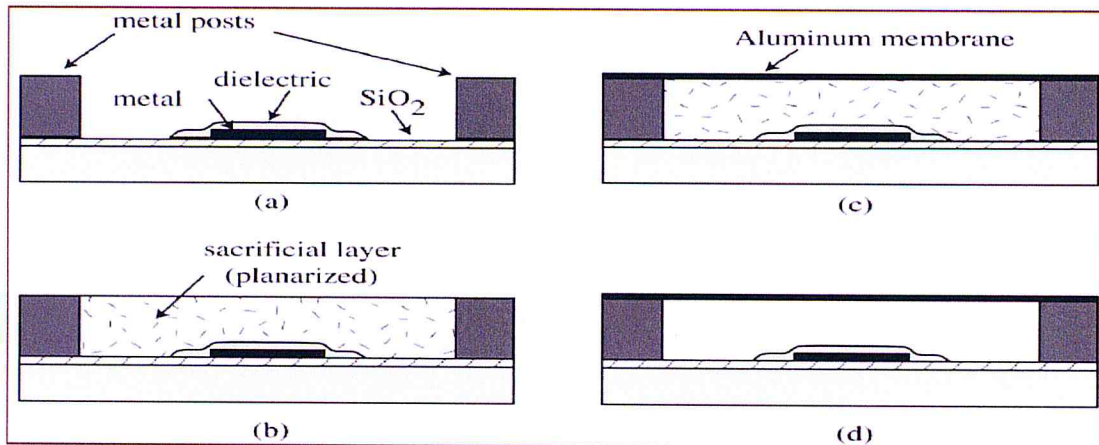


Figure 7: G.M.Rebeiz, 3eme atelier canadien sur les MEMS, exposé invité, août 2003 [5].

Au départ, cette méthode était limitée à la fabrication de pièces fines d'environ deux micromètres d'épaisseur. La raison était que les substrats qui pouvaient être déposés étaient nécessairement très fins. Avec les années, l'utilisation de films plus épais s'est généralisée, tout comme les technologies permettant de lier des wafers entre eux. Aujourd'hui, le micro-usinage de surface est la méthode de fabrication la plus utilisée, car elle permet des structures plus petites et plus complexes. C'est celle qui se rapproche aussi le plus des procédés de fabrication des puces électroniques. Les capteurs qui font appel à ce processus de fabrication utilisent souvent des structures capacitives [5].

- **Empiler des couches les unes sur les autres**

Très schématiquement, des films sont déposés sur un substrat, puis des motifs sont gravés à l'aide de procédés photo-lithographiques. On dépose deux types de couches : structurelles ou sacrificielles. Les premières vont servir à fabriquer les pièces du MEMS. Les secondes sont seulement là pour soutenir les architectures durant leur fabrication. Une fois le motif gravé sur la couche structurelle, la couche sacrificielle est détruite à l'aide d'une excavation chimique.

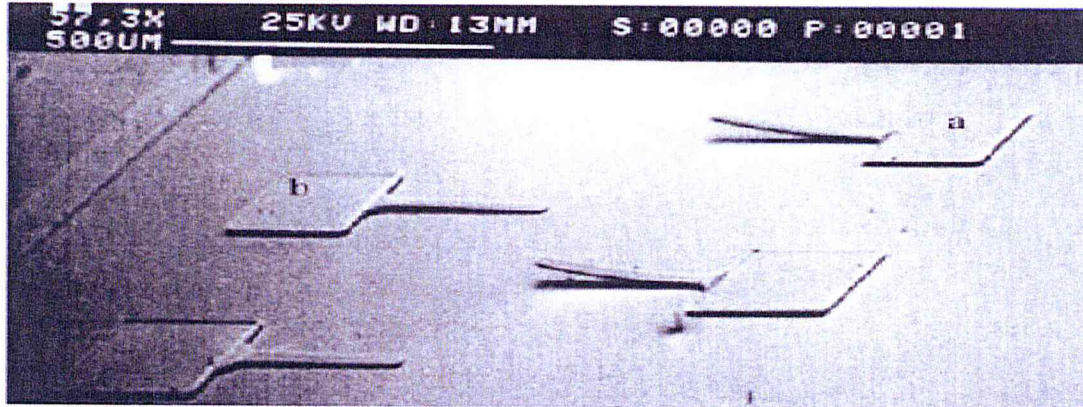


Figure 8: Micrographie SEM des cantilevers en polysilicium illustrant (a) la déviation vers le haut de la poutre et (b) le problème de friction[5]

Au tout début de l'histoire des MEMS, la couche sacrificielle était faite d'oxyde de silicium et le film structural était en polysilicium. Aujourd'hui, les entreprises travaillent beaucoup sur les matériaux qui varient en fonction de ce que l'on cherche à fabriquer et mesurer. On utilise des métaux, des oxydes et nitrures de silicium, du verre et même des polymères.

Chaque entreprise dispose d'un système qui lui est propre. Chez STMicroelectronics, une des méthodes utilisées pour la fabrication de ses gyroscopes consiste à prendre une première couche d'oxyde de 2 μm d'épaisseur et de la placer sur le wafer en silicium pour servir d'isolant électrique. Le fondeur ajoute ensuite une fine couche de poly-silicium qui va servir à fabriquer les interconnexions, puis il rajoute une autre couche d'oxyde de 2 μm . Enfin, il place une couche de poly-silicium qui va servir à fabriquer les pièces immobiles et amovibles du MEMS. Le wafer est gravé à l'aide d'un masque qui va dessiner les formes désirées. Les bouts non exposés au laser seront ensuite retirés à l'aide d'une solution à l'azote afin d'éviter les effets de strictions, courant durant l'excavation [5].

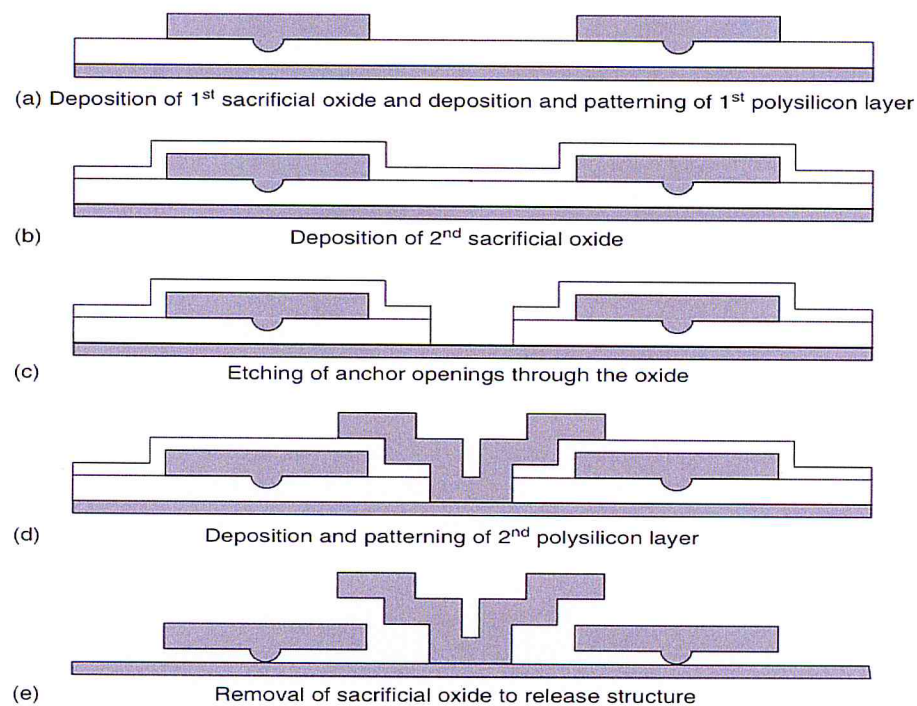


Figure 9: Procédé de micro-usinage de surface en silicium polycristallin pour la fabrication d'un curseur à rail central [5].

- **LIGA**

LIGA (*Lithographie, Galvanoformung, Abformung*) est un acronyme allemand qui signifie Lithographie, Galvanoplastie, Moulage et qui désigne les trois étapes de ce processus de fabrication. Très simplement, une couche de *polyméthacrylate* de méthyle (abrégé *PMMA* et plus connu sous le nom commercial déposé de Plexiglas) va être bombardée par un rayon X qui va graver un motif. On va ensuite prendre une empreinte de la structure en remplissant les crevasses et espaces vides à l'aide de l'électrodéposition d'un métal qui débordera de la structure pour créer une base. Le plexiglas est ensuite détruit pour révéler le moule en métal. Ce dernier sera rempli d'un polymère, d'un métal, d'un plastique, ou une combinaison de ces matériaux et servira à la fabrication d'une pièce mécanique. On utilise souvent une méthode d'injection plastique ou le hot embossing, une méthode par pressage, pour créer une structure à partir du moule qui sera ensuite détruit à l'aide d'un agent chimique ou retiré, si on souhaite reproduire une forme en masse. En effet, le moule peut être réutilisé un nombre incalculable de fois tout en maintenant une excellente précision [5].

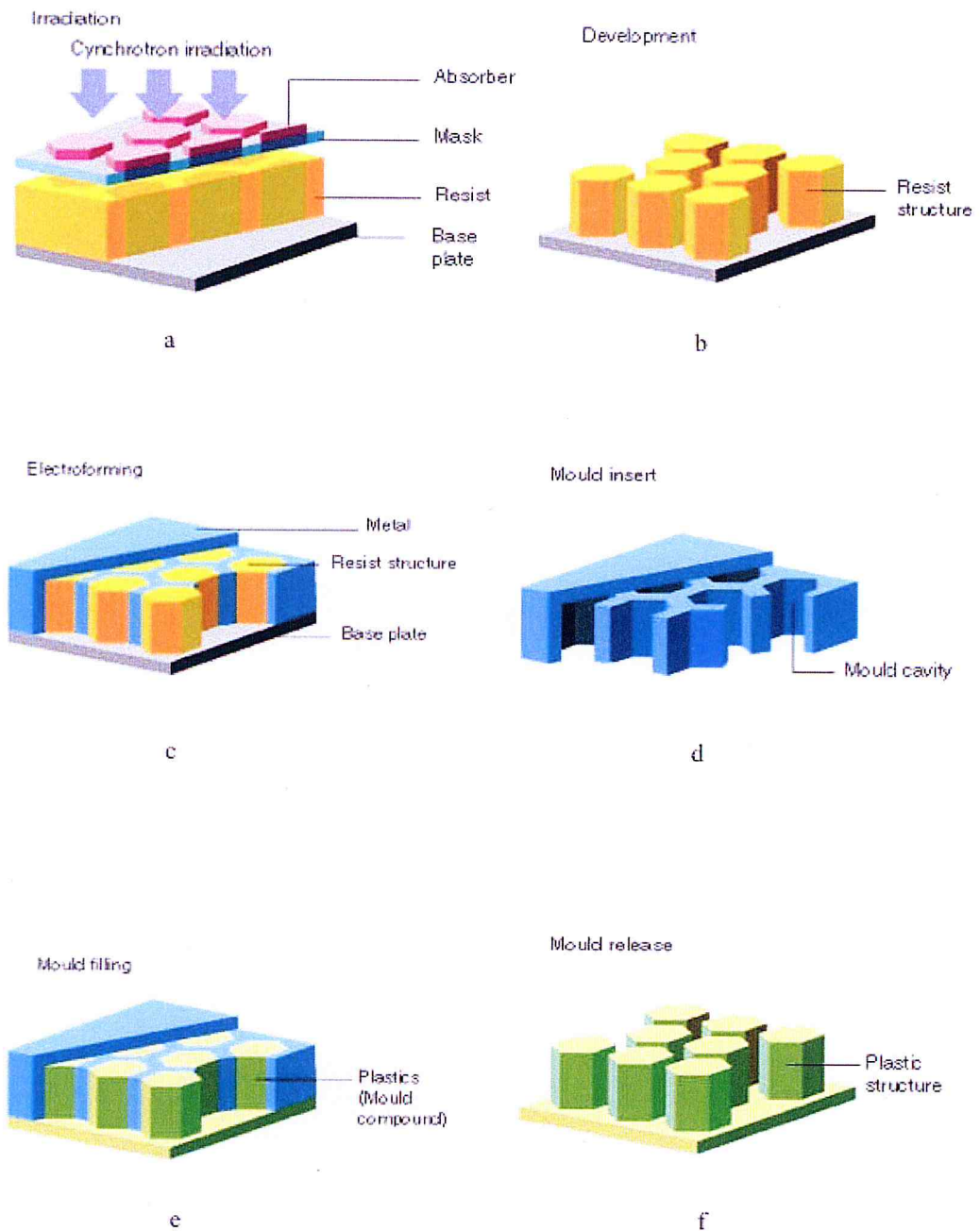


Figure 10: Séquences de fabrication de LIGA: (a) irradiation synchrotron de résine photosensible, (b) développement de résine photosensible exposée, (c) électroformage de microstructure métallique, (d) fabrication d'insert de moule, (e) remplissage de moule et (f) démoulage [5].

Le rayon X est issu d'un synchrotron, un très grand instrument électromagnétique que l'on peut caractériser d'accélérateur de particules. Sa courte longueur d'onde offre une résolution spatiale élevée, ce qui signifie que l'on peut graver des structures grandes et fines. Ces dernières années, les fondeurs font aussi souvent appel à un laser ultraviolet plus classique, un synchrotron étant souvent difficile à obtenir (il y en a moins de 50 dans le monde). Cette technique est un peu plus limitative, mais elle offre de bons résultats et est utilisée dans la fabrication de puces fluidiques, comme les laboratoires sur puce. Les métaux utilisés pour la fabrication des moules ou des pièces sont relativement classiques. On trouve de l'or ou du cuivre pour une application électrostatique et du nickel ou un alliage en nickel pour un MEMS reposant sur les forces électromagnétiques.

LIGA est un des processus les plus récents. Cette technique permet de créer des MEMS moyennement complexes et d'une hauteur pouvant atteindre trois millimètres (100 μm avec une gravure au laser ultraviolet). Pour faciliter la fabrication d'un MEMS complexe, on combine souvent cette technique avec le micro-usinage de surface, chacun étant responsable d'une partie de la structure [5].

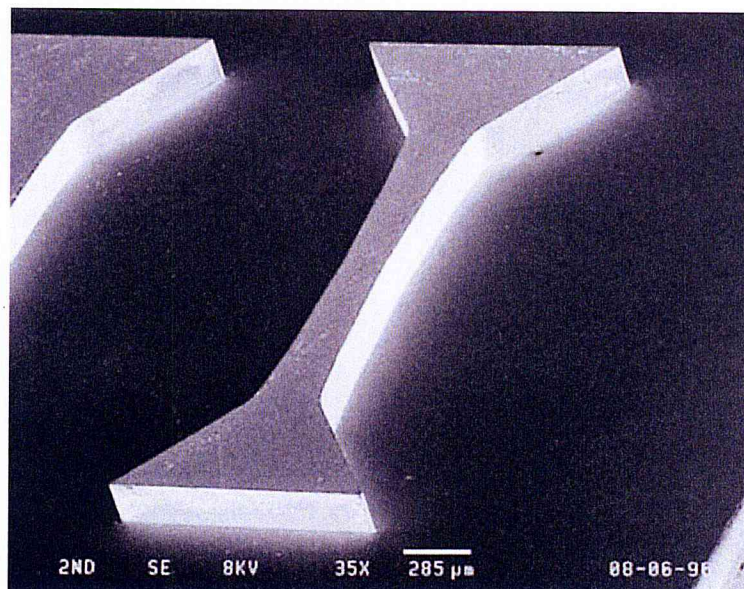


Figure 11: Échantillon de nickel produit par la méthode LIGA. La longueur totale est de 3,1 mm et la largeur de l'échantillon au centre est de 200 μm [5].

❖ La fixation de pastilles et le *packaging*

Les MEMS demandent des boîtiers adaptés aux mécanismes qu'ils vont abriter. Les *packagings* sont souvent personnalisés en fonction de l'utilisation et de l'environnement dans lequel le composant va évoluer. Il y a néanmoins trois grands types de boîtier. Le QFN qui est souvent utilisé pour les capteurs grand public, le Cerdip (*Ceramic Dual Inline Package*) qui est destiné aux environnements difficiles et le *Wafer Scale Packaging (WSP)* qui commence à être utilisé pour certains capteurs inertiels et qui est le plus petit et le plus fragile de tous [5].

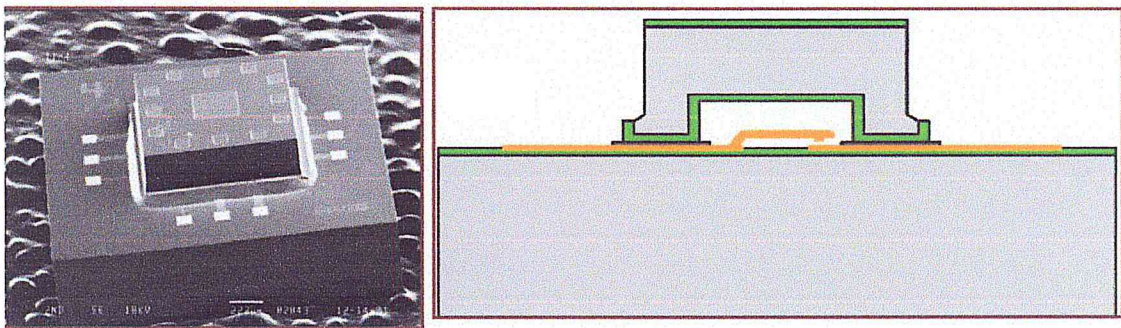


Figure 12: Emballage hermétique [5].

Avant d'intégrer le MEMS dans un boîtier, on utilise souvent la technique du *wafer bonding* qui peut être traduit littéralement comme « collage de *plaquette* » et qui est parfois désigné en français par le terme de « fixation de pastilles ». Il s'agit d'une technologie qui permet d'isoler la partie mécanique des dangers environnementaux comme des températures élevées, l'humidité ou l'oxydation. On peut le comparer à un toit en substrat utilisé pour améliorer les fonctionnalités et performances d'un MEMS. Il existe aujourd'hui plusieurs méthodes de *wafer bonding*. Par souci de concision et pertinence, nous n'en étudierons que trois : la soudure directe, la soudure anodique et l'assemblage par verre fritté. Les deux premières sont les méthodes sans couche intermédiaire les plus courantes. La dernière est une méthode populaire nécessitant une couche intermédiaire [5].

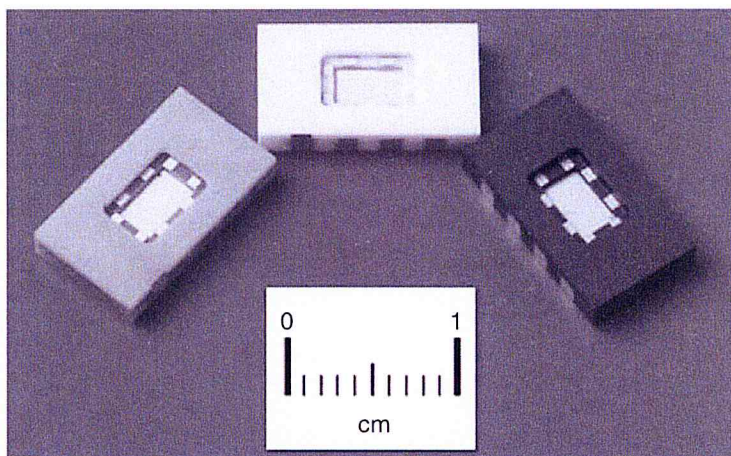


Figure 13: AlN (gauche), 96 % Al_2O_3 (Haut), et 92% Al_2O_3 (droite) boîtiers de niveau puce avec une métallisation en couche épaisse [5].

- **La fixation de pastilles sans couche intermédiaire**

La soudure directe (*direct bonding* ou *silicon fusion bonding* en anglais) est utilisée, entre autres, pour la fabrication d'accéléromètres, de micro-valves ou micro-pompes. Très schématiquement, on fait chauffer deux matériaux qui vont être collés l'un à l'autre. Les inconvénients sont que les deux substrats doivent avoir un coefficient de dilatation thermique identique ou très similaire. Les *wafers* passent par un recuit qui demande souvent une température variant entre 700 °C et 1 100 °C. On peut souder du silicium à du silicium, du silicium à un oxyde, du silicium à un nitrure, un oxyde à un oxyde et un nitrure à un nitrure. La liste est donc relativement large. Il faut tout de même que les deux matériaux soient très lisses, très propres et sans défaut et qu'ils aient un rayon de courbure large (environ 5 μm) afin de tolérer les modifications physiques qui vont avoir lieu lors de la phase de recuit.

Grossièrement, la soudure a lieu en trois étapes. On nettoie les surfaces et on groupe ensuite les deux substrats. Ce processus, qui a lieu à température ambiante, va déjà « coller » les matériaux ensemble. Enfin, on passe le tout dans un four pour solidifier la connexion afin que la structure ne s'écroule pas lorsque l'on va polir le MEMS, par exemple. Le problème de cette technique est qu'elle peut parfois déformer le composant et créer des défauts en raison de la chaleur très élevée qu'elle demande.

La soudure anodique est aussi appelée soudure électrostatique, car elle repose sur cette force d'adhésion pour joindre les deux substrats. Elle est principalement utilisée pour coller du silicium à du verre ou un métal à du verre. On utilise cette méthode pour la fabrication de certains MEMS micro-fluidiques, par exemple.

On prend un verre borosilicaté qui tolère des températures tournant entre 200 °C et 500 °C et qui atténue les problèmes liés à la différence de coefficient de dilatation thermique entre le silicium et le verre. Concrètement, on va placer les deux matériaux ensemble. On va les chauffer et générer ensuite un courant électrique d'une tension de 50 V à 1 000 V suivant le type de verre et le type de soudure que l'on recherche. La moyenne tourne entre 300 V et 400 V. Très schématiquement, les ions sodium contenus dans le verre vont s'échapper lors du passage du courant électrique pour ne laisser que les charges négatives qui vont interagir avec les charges positives du silicium pour sceller les matériaux. On refroidit ensuite le tout. Cette technique a le grand avantage de demander des températures largement inférieures à celles de la soudure directe. C'est un processus qui déforme moins les wafers et qui ne demande pas de surfaces aussi lisses et propres [5].

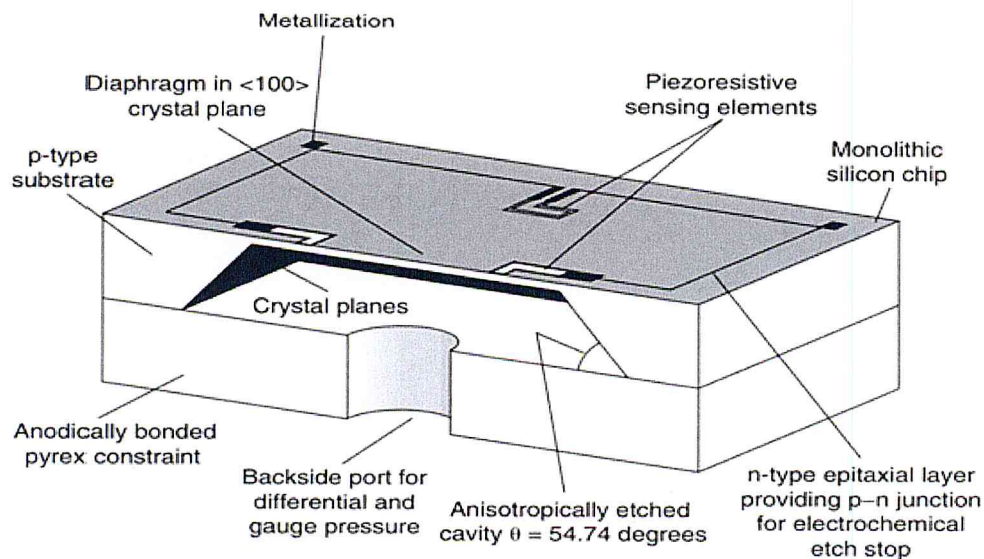


Figure 14 : Capteur de pression micro-usiné en vrac représenté en coupe. Le capteur contient un mince diaphragme de silicium formé par attaque de la tranche de silicone avec un hydroxyde alcalin. la déviation du diaphragme dépend de la pression et est détectée par des piézorésistances dopées au bore [5].

- **La fixation de pastille avec une couche intermédiaire**

Enfin l'assemblage par verre fritté (*glass frit bonding*) est utilisé dans la fabrication de gyroscopes et capteurs vendus dans les produits grand public. Cette technique est proche de la soudure directe, puisqu'elle ne demande pas un courant électrique, mais uniquement une phase de recuit. Elle se distingue néanmoins par l'utilisation d'une «colle» (couche intermédiaire) qui contient de la poudre de verre aux particules de moins de 15 μm , des solvants, des charges inorganiques (tels que de la cordiérite ou du silicate de baryum) et un liant organique.

Très schématiquement, on va appliquer la colle, puis joindre les deux matériaux. On va d'abord attendre qu'elle sèche pendant environ cinq minutes, puis on va chauffer l'ensemble graduellement pour atteindre une température proche de 500 °C. Il est impératif que les deux wafers soient correctement alignés et que la colle ne déborde pas à l'intérieur du mécanisme sous peine de le ruiner. Cette technique permet de connecter une longue liste d'éléments. Elle est aussi plus facile à réaliser que les deux autres, car les matériaux n'ont pas besoin d'être aussi lisse et propre [5].

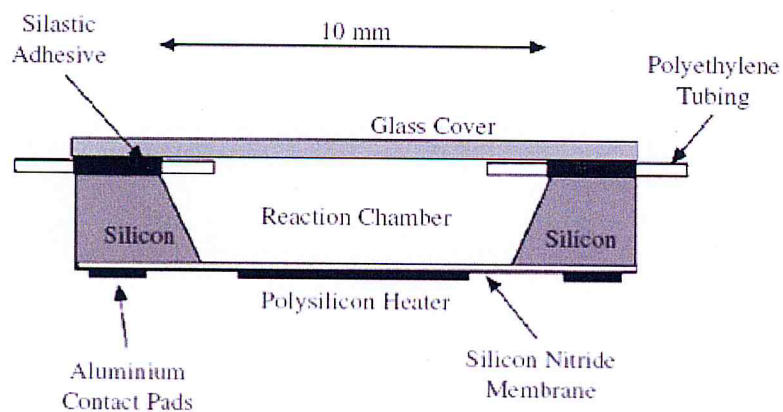


Figure 15: Chambre PCR micro-usinée [5].

1.2. BIOMEMS

Imaginez :

- Au cours d'une visite médicale, votre médecin vous fait une prise de sang totalement indolore grâce à un petit patch contenant des centaines de micro-seringues. Il dépose le patch sur une plateforme CDLab qu'il introduit dans un analyseur qui vous rappellera le lecteur CD. En quelques minutes, il reçoit les analyses sur son ordinateur, détermine l'espèce bactérienne ou virale à l'origine de votre infection avant de vous prescrire un traitement ciblé et adéquat [6].
- Un micro-dispositif qui, une fois implanté sur la rétine, rétablit la vue à des patients aveugles [6].
- Au lieu de recourir à une chirurgie risquée, votre médecin vous injecte dans le sang une microcapsule qui va parcourir votre corps et atteindre l'organe malade. Une fois sur la cible, la capsule est activée à distance pour effectuer le traitement ou libérer les médicaments nécessaires [6].
- Un patch ou un microdispositif planté sur ou sous la peau qui, selon la concentration du glucose dans le sang, déclenche ou non une libération d'insuline, évitant ainsi aux diabétiques les injections régulières et la surveillance permanente de leur glycémie [6].

➤

1.2.1. Introduction générale

Ces possibilités ne sont qu'un exemple d'une révolution en marche grâce aux bio-micro-technologies. Il s'agit d'une miniaturisation des systèmes de détection, d'analyse et de traitement au service de la biologie, de l'environnement, de la médecine et de l'agroalimentaire. Au cours de la dernière décennie, les premiers développements de miniaturisation ont d'abord concerné des dispositifs électromécaniques ou MEMS (pour *Micro Electro Mechanical Systems*) tels que les accéléromètres et les capteurs de pression qui ont eu un large succès commercial. Cette technologie s'est rapidement étendue aux domaines biologique et médical pour donner naissance à ce qui est connu sous les noms de "BioMEMS", "biosensors", "lab on chips" ou " μ -TAS" (pour *Micro-Total Analysis Systems*). Ces dispositifs sont généralement composés d'une partie

microfluidique incluant des microcanaux, des microvalves, des micropompes, des micromixeurs, des microréacteurs pour la manipulation des différents liquides ou objets biologiques, d'une plateforme de détection plus au moins complexe contenant un ou plusieurs capteurs, et de la composante biologique qui peut être intégrée (biorécepteur) ou momentanément introduite pour les besoins d'analyse [6].

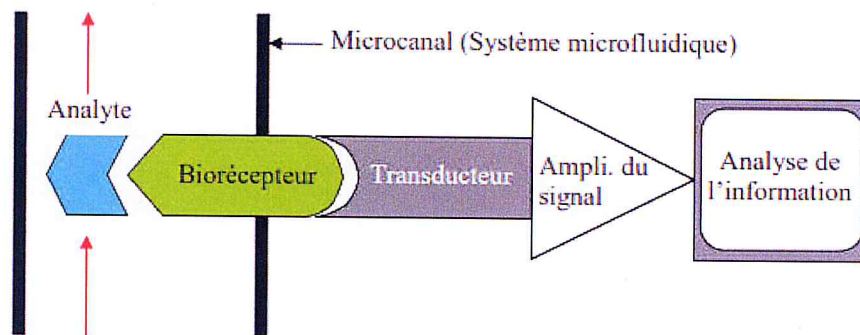


Figure 16: Schéma de base d'un *BioMems* [6].

1.2.2. Applications des *BioMEMS*

L'explosion de la recherche et des applications dans ce domaine a entraîné une multiplication de la nomenclature et des concepts techniques. Nous tenterons donc tout d'abord d'établir une nomenclature précise basée sur les fonctionnalités et les degrés d'intégration des différents systèmes. Les termes de *bioMEMS* et bio-microsystèmes sont de plus en plus utilisés pour désigner, d'une manière générale, la grande panoplie des microdispositifs destinés aux sciences de la vie. Ces derniers peuvent être classés en 5 grandes catégories [6] :

- Micropuces ou «*Microarrays*» : Elles sont basées essentiellement sur l'hybridation (brins d'ADN) ou la reconnaissance moléculaire (*ligand-récepteur*) qui sont généralement détectées par fluorescence sans l'intervention d'un transducteur intégré. Actuellement, beaucoup de développements se font sur des puces à protéines, à lipides ou à saccharides, qui s'ajoutent aux puces à ADN déjà commercialisées.
- Biocapteurs ou «*Biosensors*» : Ils sont composés de *biorécepteurs*

immobilisés sur un transducteur qui peut être optique ou plus généralement électromagnétique, électrochimique, piézoélectrique, calorimétrique ou acoustique. Le principe de base d'un biocapteur est de transformer une propriété biochimique d'un phénomène biologique en un signal électrique. Le premier biocapteur a été développé en 1950 par Leland Clarke pour mesurer la concentration en oxygène dissout dans le sang grâce à des électrodes fonctionnalisées.

- Laboratoire sur puces ou «Lab on chips, μ TAS»: Ce sont des microdispositifs multifonctionnels et plus élaborés qui permettent, selon leur degré d'intégration, une fonction de transduction, mais surtout de préparation des échantillons, séparation, analyse, de culture cellulaire ou tissulaire. En plus du transducteur, ces composants contiennent un système microfluidique (microcanaux) pour gérer les fluides à analyser.
- Dispositifs implantables ou «*implantable devices*»: Ce sont des microsystèmes soit *biohybrides* soit en contact direct avec un système vivant à l'exemple des organes artificiels, les interfaces cerveau-machine et les systèmes de libération médicamenteuse.
- Les *micro/nanomachines*: Ce sont des dispositifs qui peuvent être injectés dans les liquides corporels, qui n'ont pas forcément une composante biologique, mais dont la fonction est de cibler puis d'interagir avec le système vivant.

1.2.2. Matériaux utilisés dans les *BIOMEMS*

Les matériaux composants les *BioMEMS* sont classés en trois catégories. La première regroupe les matériaux traditionnels de la technologie MEMS et de la microélectronique fortement relatés dans la littérature depuis plusieurs décennies (diélectriques, métaux, semi-conducteurs).

Les matériaux plastiques et polymères forment la seconde catégorie. La forte biocompatibilité, la capacité d'intégration de matériaux hydrogels et la simplicité de fabrication induite par les polymères, associées aux faibles coûts et aux méthodes rapides de prototypage des matériaux plastiques, les rendent très attractifs. Enfin, l'utilisation, encore peu répandue, d'entités biologiques telles que les protéines, les cellules et les tissus, ouvre des perspectives nombreuses et excitantes. Elle autorise le développement d'outils pour comprendre leur fonctionnement biologique et permet une

synthèse et une production dirigées de ces structures pour réaliser des organes artificiels .

Le domaine du diagnostic biologique et biomédical est le secteur de recherche le plus vaste de la famille des *BioMEMS*. De nombreux dispositifs se distinguent de manière significative à travers leur topologie, leur technologie et leurs applications. Ces micro dispositifs, nommes *BioChips*, sont utilisés pour la détection et la quantification de cellules, de micro-organismes, de virus, de protéines, d'acides nucléiques, d'ADN et de petites molécules dans un environnement extérieur donne [4].

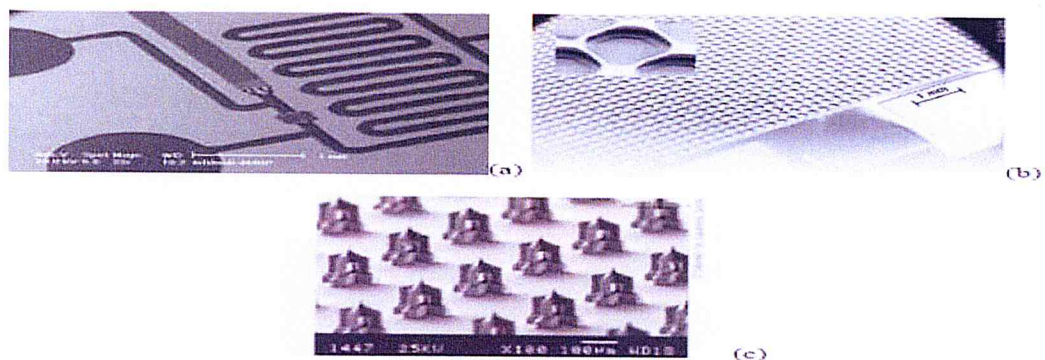


Figure 17: Microlaboratoires (a et b (puce à ADN)) et (c) réseau d'aiguilles micro-usinées [4].

1.3 Les biocapteurs

1.3.1. Historique

Le premier biocapteur a été l'œuvre de Leland Clark en 1950 dans le but de mesurer la concentration en oxygène dissous dans le sang . En 1962, ce même biocapteur est adapté afin de quantifier le taux (ou concentration) de glucose dans le sang. Puis en 1967, Updike et Hicks élaborent les premières électrodes enzymatiques. Depuis les années 70, un effort considérable a été fait dans leur développement du fait de leurs applications dans des domaines diverses et variés (médecine, agro-alimentaire, ou contrôle environnemental) [7].

En effet, de par leur petite taille, leur facilité d'utilisation et la possibilité de les utiliser sur site, les biocapteurs sont des éléments d'analyse particulièrement avantageux et intéressants.

1.3.2. Définition

Un biocapteur est un système analytique alliant des technologies différentes issues par exemple de la biologie moléculaire, la microélectronique, l'optique et l'informatique. Il se compose d'un élément biologique, que l'on appelle « ligand » ou biorécepteur, lui-même lié à un transducteur (pouvant être optique ou plus généralement électromagnétique, électrochimique, piézoélectrique, calorimétrique ou acoustique) permettant de transformer un signal biochimique en un signal physique quantifiable (figure 18). Selon l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) , un biocapteur est un appareil qui utilise des réactions biochimiques spécifiques par des enzymes isolées, des immuno-systèmes, des tissus, organites ou des cellules entières pour détecter des composés chimiques en général par des signaux électriques, thermiques ou optiques [7] .

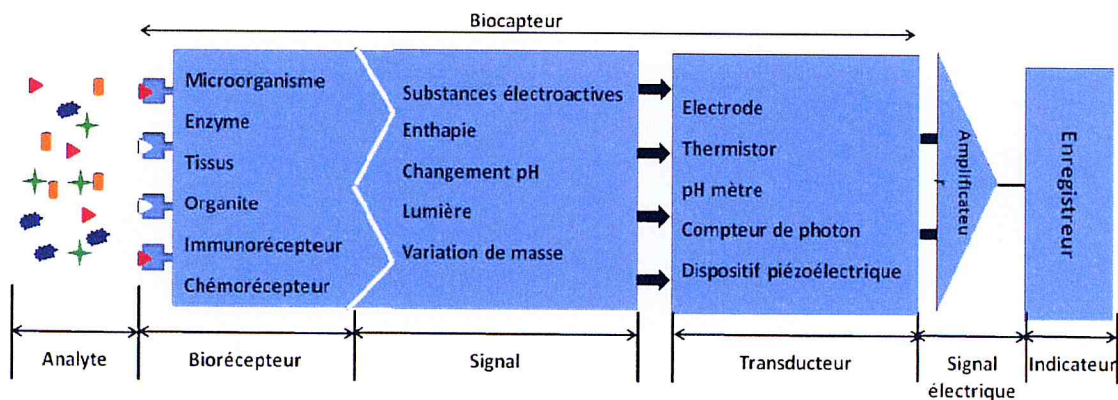


Figure 18: Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur [7].

Comme l'illustre la figure 18, ils existent différents types de biorécepteur :

- Les enzymes qui sont les plus utilisées et les plus commercialisées. En effet, elles présentent un grand nombre d'avantages notamment la reproductibilité des lots mais par contre il peut y avoir une instabilité de leur fonctionnement et la nécessité d'utiliser un cofacteur ou plusieurs enzymes associées pour un même biocapteur.
- Les microorganismes (cellules entières) principalement utilisés en cas de systèmes réactionnels complexes puisque les enzymes et cofacteurs essentiels y sont intrinsèquement présents.

- Les tissus et organites (structures spécialisées contenues dans les cellules) aussi bien d'origine animale que végétale. Ils sont surtout utilisés pour la détection des aminoacides de par leur robustesse et leur bonne cohésion.
- Les immunorécepteurs et les chémorécepteurs fonctionnant sur le principe réaction antigène/anticorps qui induit généralement une faible variation de signal (variation de potentiel par exemple). Cette modification est très difficile à détecter, c'est pourquoi il faut amplifier le signal (en utilisant par exemple un marquage de l'antigène ou de l'anticorps) qui catalysera la production d'un composé détectable.

1.3.3. Les différents types de biocapteurs

❖ Biocapteurs manométriques :

Les biocapteurs manométriques reposent sur la détection des changements de pression. En effet, une variation de la concentration d'un gaz dans une cavité close peut être considérée comme un changement de la pression partielle du gaz. Le ligand est, en général, une enzyme qui permet de transformer l'espèce à détecter en gaz. Ce type de capteur présente l'avantage de ne jamais être en contact direct avec l'échantillon à analyser comme l'illustre la figure 19 [7].

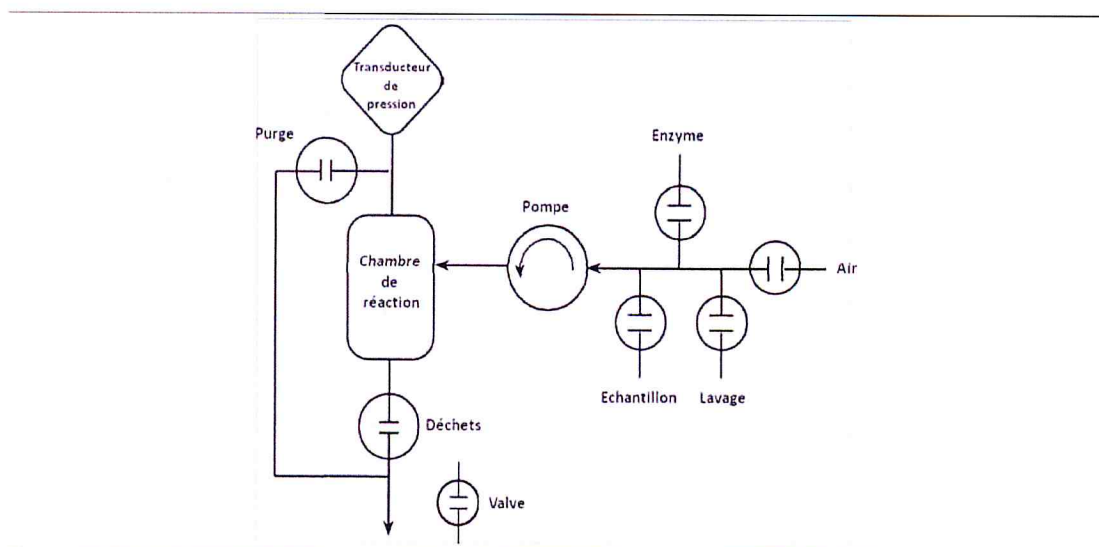


Figure 19: Exemple d'un biocapteur manométrique : biocapteur à glucose développé par Jenkins & Delwiche (précision du biocapteur 0.2 mM, gamme de travail : de 0 à 5 mM) [7].

❖ Biocapteurs piézoélectriques

Ces biocapteurs sont basés sur la mesure de l'oscillation d'un cristal de quartz sur lequel est immobilisé le composé biologique (figure 3). En effet, un cristal de quartz présente l'avantage de pouvoir osciller sous l'effet d'un stimulus électrique lorsqu'il est plongé partiellement ou totalement dans un milieu liquide. Cette caractéristique permet de quantifier tout changement de masse à la surface du cristal de quartz à condition que les propriétés physico-chimiques du milieu soient connues. Effectivement, une modification de la masse va entraîner un changement quantifiable de la fréquence de résonance. Ces biocapteurs présentent l'avantage de donner des réponses rapides mais ont une sélectivité qui dépend de la couche active et peuvent manquer de sensibilité en fonction du système oscillant utilisé [7].

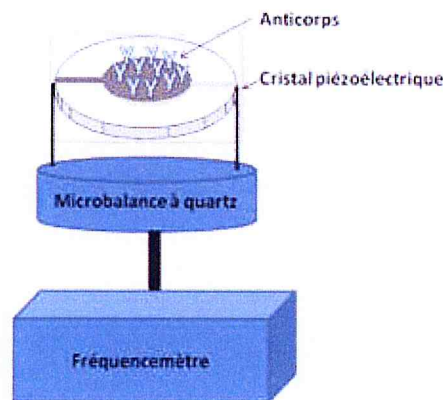


Figure 20: Exemple d'un biocapteur piézoélectrique [7].

❖ Biocapteurs thermiques

Ces biocapteurs, développés dans les années 1970, permettent de transformer un signal biochimique en un signal thermique. Un microcalorimètre ou une résistance thermique, raccordé au composé biologique, permet de mesurer les modifications d'enthalpie ou de température dues à une réaction entre le biorécepteur et l'espèce à détecter (figure 21). Lorsque ces biocapteurs thermiques sont immunochimiques, on les appelle « *TELISA* » (*Thermometric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Ces biocapteurs ont été utilisés notamment dans la détection d'insuline. Les principaux

avantages de ce genre de biocapteurs sont leur rapidité de réponse, leur reproductivité, l'absence d'interférence des produits dérivés et d'interférence électrochimique ou optique et la stabilité des colonnes d'enzymes. Cependant, leur coût est relativement élevé du fait de la lourde instrumentation nécessaire à leur mise en œuvre, l'obligation d'un prétraitement pour des échantillons spécifiques et l'aviissement (encrassement) pour une utilisation prolongée [7].

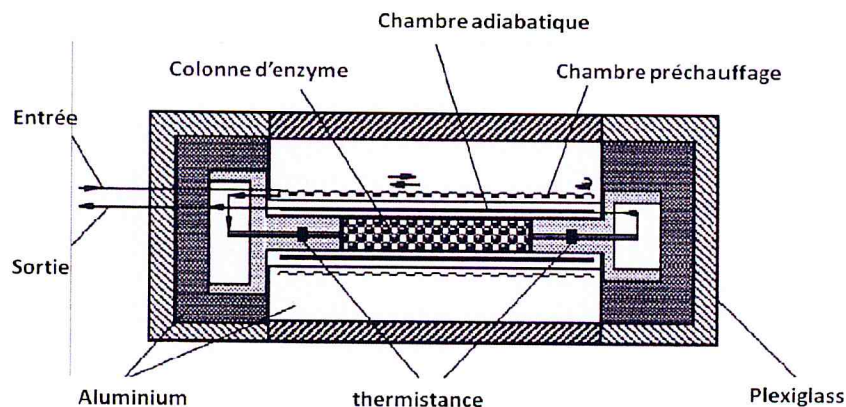


Figure 21: Exemple d'un biocapteur thermique (gamme de travail : de 0,5 à 16 mmol.L⁻¹) [7].

❖ Biocapteurs optiques :

De nombreuses techniques optiques ont été adaptées afin d'être utilisées pour l'élaboration de biocapteurs. Les principales méthodes sont : la mesure de l'absorbance, de la chemiluminescence, de la fluorescence, de la résonance plasmonique de surface ou encore de l'onde évanescente [7].

- **Biocapteurs mesurant l'absorbance**

Dans ce type de biocapteurs, l'interaction entre le biorécepteur et l'espèce à détecter induit l'apparition d'une coloration. Par exemple, un anticorps secondaire, marqué par une enzyme (la phosphatase alcaline) va révéler la formation d'un complexe immun (interaction antigène anticorps). En effet, l'ajout du substrat de cette dite enzyme provoque une coloration détectable à une certaine longueur d'onde provoquant une modification de l'absorbance [7].

- **Biocapteurs mesurant la fluorescence**

Le principe est le même que celui exposé ci-dessus pour les biocapteurs à absorbance. Deux cas de figure se présentent : soit nous avons une détection du type light off (diminution de la fluorescence après contact avec la molécule cible) ; soit une détection de type light on (augmentation de la fluorescence après contact avec la molécule cible). La spécificité de ces biocapteurs est accrue par la modification génétique . Un promoteur de gène spécifique à un réactif ou un groupe de réactif donné est inséré dans une cellule [7].

Ce promoteur est fusionné à un gène codant permettant l'expression d'une protéine facilement détectable. Un des gènes les plus couramment utilisé est le gfp responsable de la production de la Green Fluorescent Protein (GFP), protéine naturellement fluorescente (figure 5) [7].

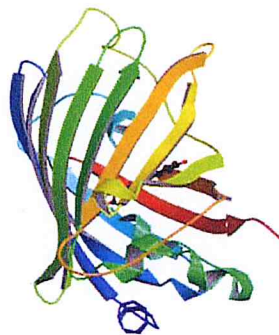


Figure 22 : Représentation de la Green Fluorescent Protein (référence PDB : 1EMA) [7].

- **Biocapteur utilisant le principe de l'onde évanescente**

Un faisceau de lumière polarisée, illuminant l'interface entre deux milieux, donne naissance à un faisceau réfléchi et à un faisceau réfracté. Cependant, selon l'angle d'incidence, la lumière peut être totalement réfléchie. Dans ce cas, une onde électromagnétique pourra être générée, cette onde est aussi appelée onde évanescente et elle se propage perpendiculairement à la surface de l'interface (figure 23a). La zone balayée par l'onde est appelée « champ évanescent ». Cette onde évanescente de par son énergie va modifier l'indice de réfraction du milieu et donc une

variation de l'angle de résonance sera observée. Cette variation pourra être mesurée par le capteur, ce phénomène est également appelé « miroir résonant ».

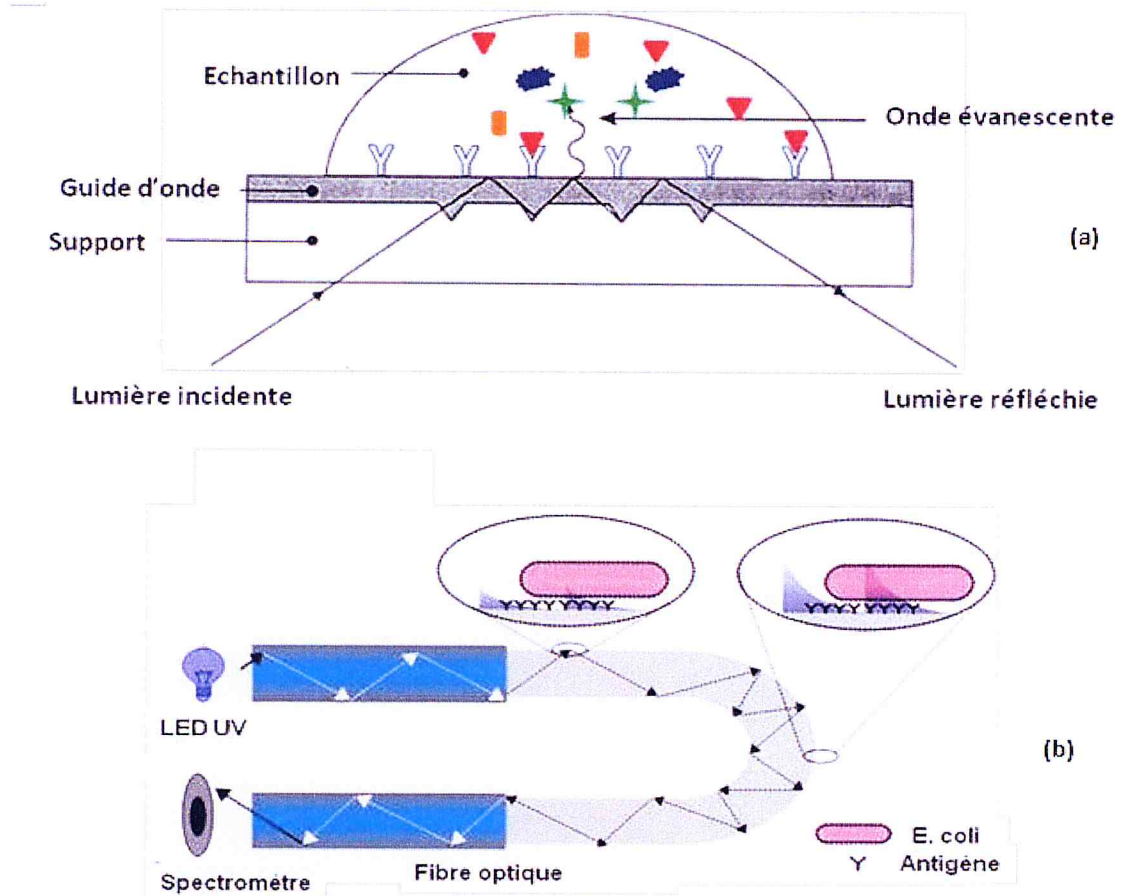


Figure 23: (a) Principe d'un biocapteur à onde évanescente. (b) Exemple d'un biocapteur à onde évanescente [7].

Cette méthode a pour avantage de permettre un suivi en temps réel des interactions ligand-analyte. De plus, aucun marquage des molécules n'est nécessaire. Dans cette optique, R. Bharadwaj et al. ont élaboré un biocapteur permettant la détection d'une bactérie (*E. coli*). Ce biocapteur, illustré figure 23b, est basé sur le changement de l'absorbance induite par le contact entre la bactérie cible et le capteur.

❖ Biocapteurs à résonance plasmonique de surface (SPR)

Le phénomène de résonance plasmonique de surface (SPR) se base également sur le principe d'onde évanescente et est décrit par les lois de la mécanique

quantique. La mesure du phénomène SPR peut se faire de deux manières.

Soit par la mesure de la variation de l'angle de résonance. En effet, les photons de l'onde évanescente entrent en résonance avec les nuages électroniques d'une fine couche de métal déposée à l'interface appelée aussi plasmon ce qui va induire une chute de l'intensité du faisceau réfléchi selon un certain angle (angle de résonance). Cet angle varie proportionnellement à la quantité d'espèce à détecter se fixant sur les ligands spécifiques à l'interface [7].

Soit par la mesure de la modulation de la longueur d'onde de l'angle réfléchi. En effet, un faisceau parallèle polychromatique arrive à l'interface ce qui va exciter la surface plasmonique. Cette excitation, du fait du transfert de l'énergie optique et de sa dissipation sur la couche plasmonique qui l'accompagnent, provoque une modification de la longueur d'onde de l'angle réfléchi. La fixation de l'espèce à détecter sur les ligands va induire une variation de la longueur d'onde proportionnelle à la quantité fixée. Cette variation est due à la modification de l'indice de réfraction induite par la fixation de l'analyte.

H.S. Jang *et al.* ont mis au point un biocapteur SPR (fibre optique) permettant la détection de l'antigène prostatique spécifique en tant que biomarqueur du cancer de la prostate [7].

❖ **Biocapteurs à ondes acoustiques**

Les biocapteurs à ondes acoustiques de surface reposent sur la possibilité de créer une onde acoustique à partir de matériaux piézoélectriques. Une onde acoustique de surface est une onde acoustique mécanique qui se propage à la surface d'un cristal piézoélectrique. L'amplitude de l'onde, ainsi que sa vitesse, sont modifiées par la nature du milieu en contact avec la surface du piézoélectrique. Pour l'instant, l'intérêt pour ce type de biocapteurs reste très limité en comparaison de celui porté aux biocapteurs à résonance plasmonique de surface et ce malgré leurs avantages [7] :

- Une sensibilité aux changements de masse tout comme les biocapteurs à SPR
- Une insensibilité aux effets physiques secondaires ce qui permet de ne pas

recalibrer les appareils à chaque changement de tampons.

- L'utilisation de matériaux moins nobles que ceux nécessaires pour l'élaboration de biocapteurs à SPR du fait de la possibilité de mettre en place des chimies de couplage de molécules plus variées.

❖ Biocapteurs électrochimiques

Les biocapteurs électrochimiques ont pour principe l'immobilisation du biorécepteur sur l'électrode. L'addition d'un substrat provoque une réponse biochimique, transformée en un signal électrique pouvant être amplifié et mesurable. Les biocapteurs électrochimiques ont donc pour principaux avantages leur simplicité, leur coût de revient relativement faible et leur rapidité de réponse. En revanche, ils peuvent manquer de sélectivité. En effet, quand le potentiel appliqué est élevé, si l'échantillon à analyser contient des substances *électro-actives contaminantes* ou des protéines, celles-ci vont avoir tendance à s'agglomérer sur l'électrode. Ces biocapteurs peuvent être ampérométriques, potentiométriques ou conductimétriques (figure 24) [7].

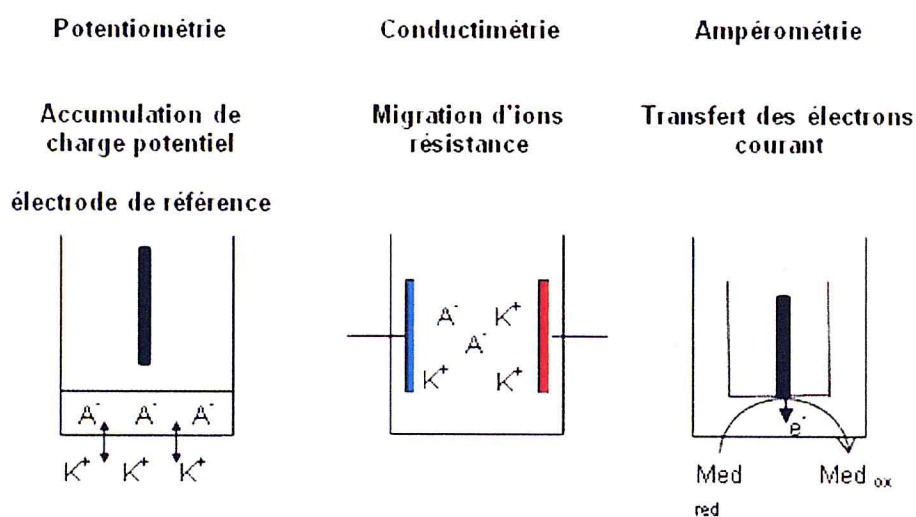


Figure 24: Les différents types de détection électrochimique [7].

- **Biocapteurs potentiométriques**

Les biocapteurs potentiométriques mesurent la différence de potentiel entre une électrode active et une électrode de référence. Ils sont composés d'une membrane sensible à une espèce donnée. En mettant cette surface en contact avec l'espèce spécifique à celle-ci, un potentiel proportionnel au logarithme de la concentration est engendré. Ces biocapteurs mesurent généralement les variations de pH et de concentrations ioniques. Il existe deux modes d'utilisation de ces biocapteurs : soit on impose un courant dans le circuit, c'est la potentiométrie à courant imposé ; soit on impose aucun courant, c'est la potentiométrie à courant nul [7].

De plus, ce type de biocapteurs présente l'avantage d'avoir un temps de réponse très court. Leur fabrication est abondamment développée dans le domaine industriel ce qui rend leur confection moins coûteuse.

- **Biocapteurs conductimétriques**

Les biocapteurs conductimétriques reposent sur le principe de modification de la conductance, G , d'un milieu par métabolisation d'espèces non chargées en espèces intermédiaires ou inversement. La conductance d'un corps est donnée par la relation ci-dessous :

$$G = \gamma \frac{S}{l} \quad (1)$$

S Surface de la section perpendiculaire à la direction du courant.

l Longueur du corps.

γ Conductance spécifique ou conductivité, caractéristique du corps.

L'utilisation de ces biocapteurs se fait en courant alternatif, de préférence à fréquence élevée, afin d'éviter une polarisation des électrodes et toute électrolyse qui entraînera une modification de la résistance. Ils ont l'inconvénient de ne présenter aucune sélectivité intrinsèque, donc une bonne connaissance de la composition du milieu est indispensable [7].

• **Biocapteurs ampérométriques :**

Les biocapteurs ampérométriques font partie des dispositifs les plus répandus et les plus commercialisés. Ces biocapteurs ont une place particulière dans ce domaine puisque la biotechnologie analytique a débuté par eux suite aux travaux de Clark en 1956. Par la suite, un grand nombre de travaux ont été réalisés par différentes équipes. Ces dispositifs reposent sur la mesure du courant produit lors d'une réaction chimique. De ce fait, ce type de capteur nécessite un biorécepteur qui consomme ou produit une espèce électro-active. La détection d'un substrat en solution est alors réalisée via l'oxydation ou la réduction de cette espèce directement à la surface de l'électrode (potentiel constant et enregistrement de l'intensité) [7].

On distingue trois groupes de biocapteurs ampérométriques: les biocapteurs ampérométriques sans médiateur, avec médiateur et à transfert électronique direct (figure 25) [7].

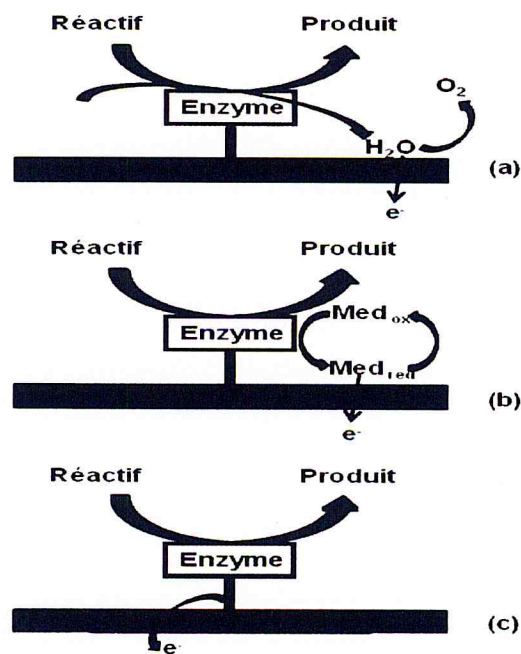


Figure 25 : Schéma du principe de fonctionnement des trois types de biocapteurs ampérométriques: (a) sans médiateur, (b) avec médiateur, (c) avec transfert direct [7].

Le principe du premier groupe de biocapteurs ampérométriques repose sur une détection indirecte de l'espèce cible. En effet, le courant d'oxydation (ou de réduction) enregistré à l'électrode sera dû à l'oxydation (ou la réduction) d'une espèce électro-active résultante de la réaction enzymatique. Dans le cas des biocapteurs ampérométriques du second groupe, une molécule, appelée médiateur, sera utilisée. C'est ce médiateur qui réagira à l'électrode pour donner soit un courant d'oxydation, soit un courant de réduction. De plus, il présente l'avantage d'abaisser le potentiel de détection et de faciliter le transfert des électrons. Enfin, le troisième groupe est basé sur le transfert direct des électrons entre le site actif de l'enzyme et l'électrode [7].

1.3.4. Le marché des biocapteurs

❖ Le marché des biocapteurs dans le domaine de la santé [8] :

- Marché en très forte expansion :
 - Marché global incluant capteurs et biocapteurs : 13.1 Milliards de dollars en 2017.
 - Croissance très forte pour les capteurs ou ensemble de capteurs de type implantable, portable et mobile.
 - 515 millions de capteurs portables, implantables et mobiles pour la « santé et le bien-être » seront vendus en 2018.
 - 5 Millions de capteurs médicaux jetables en 2018.
- Marché dominé par les USA et l'Europe : 60%, mais croissance du marché APAC.
- Dominé par les PME mais entrée en jeux de multinationales [8].



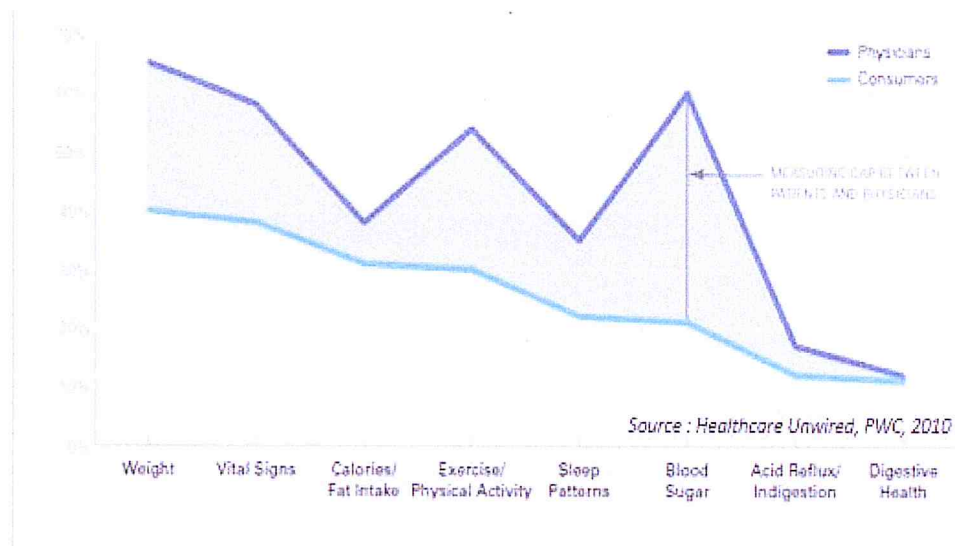


Figure 26: Paramètres que les médecins et les consommateurs souhaitent évaluer en utilisant des capteurs [8].

Marché global des biocapteurs 8 milliards de dollars en 2012

50% des biocapteurs produits sont des **biocapteurs du glucose** → marché très compétitif et chute des prix

Key Players : AgaMatrix Inc, Cranfield Biotechnology Institute, LifeSensors, Medtronic, Siemens Healthcare et surtout industrie pharmaceutique

ADVANCED BLOOD GLUCOSE MONITORING SYSTEMS

Figure 27: Focus biocapteurs [8].

Principaux paramètres de santé surveillés par les biocapteurs disponibles sur le marché :

Glycémie - Pression artérielle - Pouls - ECG - Respiration - Saturation en oxygène.

❖ Le marché de la surveillance à distance

- Le marché des dispositifs intégrant des capteurs pour le suivi des maladies chroniques est fortement lié au marché du « *Remote Monitoring and Treatment* » (RMT).
 - Marché Européen du RMT estimé à 430 millions d'euros en 2014. (*Frost et Sullivan 2010*).
 - Croissance constante du marché qui dépasse les attentes des observateurs.
 - L'Allemagne, le Royaume-Uni, la France, l'Italie et l'Espagne sont les acteurs dominants sur la scène Européenne.
- Marché dominé par les USA et l'Europe [8].

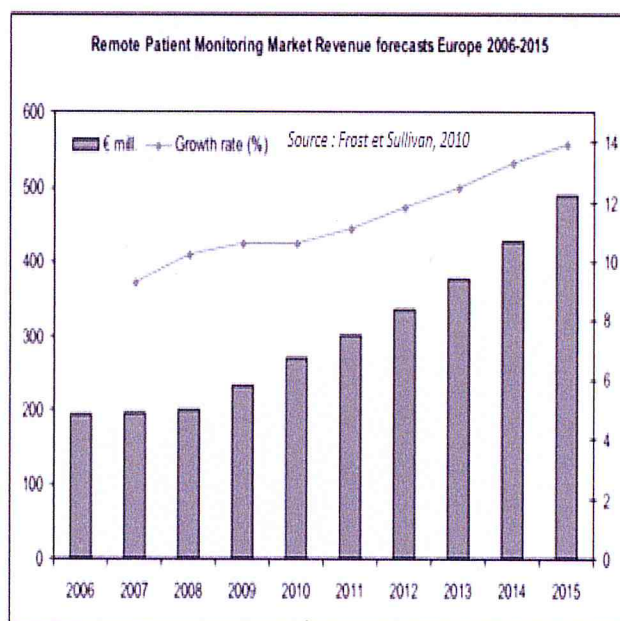


Figure 28: surveillance à distance des patients prévisions de revenus du marché europe 2006-2015 [8].



Figure 29 : Acteurs du marché : Hardware [8].

Le résultat des études cliniques sera déterminant pour l'évolution du marché

1.4 MICROFLUIDIQUE

1.4.1 Définition

La microfluidique concerne l'étude des écoulements et leur mise en œuvre dans des réseaux de micro-canaux ayant des dimensions à l'échelle du micron. Son essor est considérable dans un grand nombre de domaines industriels comme l'alimentaire, les biotechnologies, l'analyse chimique... La microfluidique est à la croisée des chemins de la biologie, de la physique, de la chimie et de l'ingénierie. Elle tire profit des progrès concernant la micro- électronique pour sa réalisation, et des phénomènes physiques qui ont lieu à ces échelles par la réduction de taille des géométries.

Grâce à la microfluidique, on peut envisager l'arrivée prochaine de systèmes d'analyse complets qui, à partir d'une simple goutte d'échantillon, véhiculeront les liquides vers des capteurs pour en extraire des informations sur leur contenu (figure 30) [9].

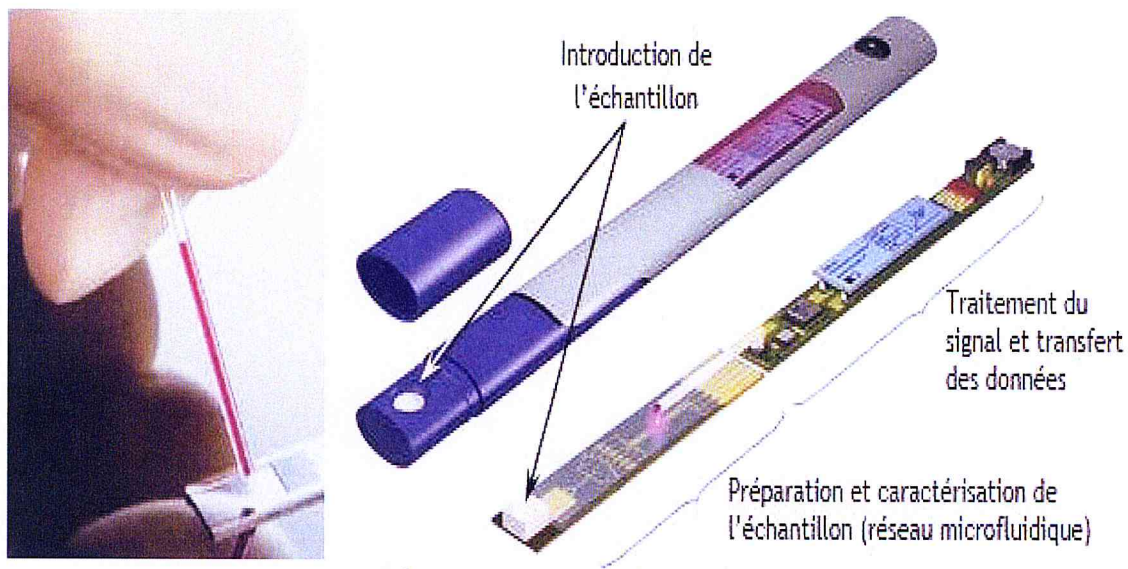


Figure 30 : Laboratoire sur puce « *lab on chip* » [9].

Cette ressource aborde la microfluidique, en posant les principes physiques de base des écoulements à ces échelles et leur exploitation. Elle présente ensuite les outils technologiques utilisés pour la réalisation de canaux de dimensions micrométriques [9].

1.4.2 Les microcanaux

Le microcanal est un élément fondamental pour la plupart des systèmes microfluidiques. Il joue un rôle important dans la réalisation des dispositifs microfluidiques (figure 31). Ces microcanaux sont en générale utilisés comme moyen d'acheminements des fluides mais ils jouent le rôle d'éléments constitutifs pour réaliser des microréacteurs, des micromélangeurs, des microséparateurs dans les *BIOMEMS*. La géométrie des microcanaux ainsi que leurs conception technologique sont indispensable pour le bon déplacement du liquide au sein du système microfluidique dans les conditions désirées pour les applications auxquelles elles sont dédiées [9].

Microcanaux
d'introduction de fluide

Chambre
de mélange

Chambre de
réaction

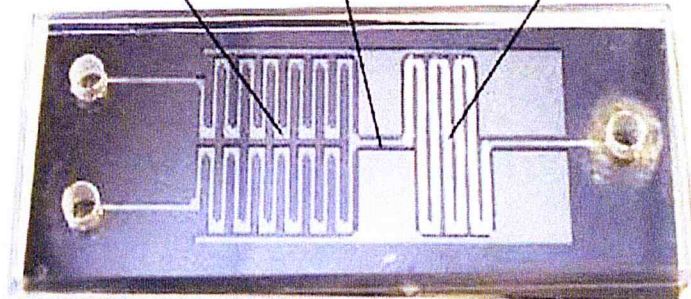


Figure 31: Un microréacteur chimique à base de microcanal [9].

Les microcanaux peuvent être fabriqués par l'utilisation de différents matériaux tels que : des polymères, du verre, des métaux ainsi que silicium de classe microélectronique (figure 32). La section d'un microcanal peut aussi présenter différentes formes : circulaire, semi-circulaire, rectangulaire, triangulaire ou même trapézoïdale. Selon la forme et le matériau utilisé, ces microcanaux peuvent être fabriqués à l'aide de divers procédés technologique dont le microusinage en surface, le microusinage en volume, le moulage ainsi que l'usinage conventionnel avec des "micro- cutters" [9].

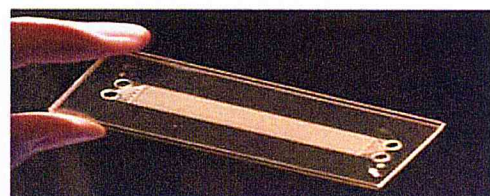
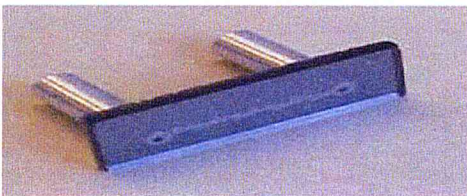
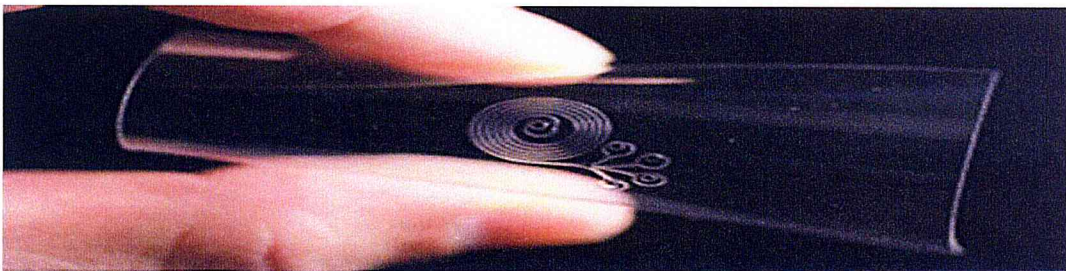


Figure 32: Les Microcanaux fabriqués en différents matériaux : (a) Microcanaux en PDMS, (b) microcanaux en silicium, (c) microcanaux en verre [9].

1.4.3 Généralités sur le PDMS

❖ Introduction

▪ Chimie

Le Polydiméthylsiloxane (PDMS), aussi appelé diméthicone est un polymère organo-minéral appartenant aux siloxanes (R₂SiO), mot dérivé de : Silicium, Oxygène et Alkane. Les siloxanes ont été découverts au début du vingtième siècle par F. S. Kipping. Le PDMS fait donc partie de la famille des silicones qui sont des siloxanes polymérisés. La formule brute du PDMS est (C₂H₆OSi)_n et sa formule éclatée est CH₃[Si(CH₃)₂O]_nSi(CH₃)₃, n étant le nombre de répétition du monomère. Son unité de répétition possède donc une masse molaire de 74 g. Sa structure est simple et basée sur l'alternance entre atomes de silicium et d'oxygène (figure 33) [10] :

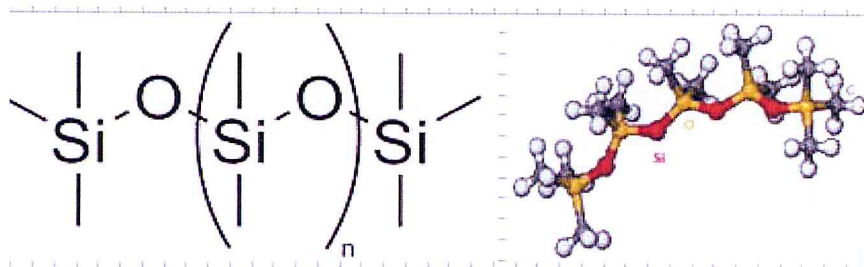


Figure 33: Structure chimique du PDMS [10].

Sa conformation la plus stable est la conformation dans laquelle tous les groupements méthyles sont en position trans (figure 33 à droite).

Les liaisons covalentes que le silicium crée avec l'oxygène pour former le squelette des macromolécules sont très stables. Ceci permet au PDMS d'avoir des bonnes propriétés de résistance à haute température (sa stabilité thermique couvre un domaine de température assez large entre (-50 et 200 °C), aux rayons UV et IR, et à de nombreuses agressions extérieures [10].

• Propriétés mécaniques

En fonction de la taille de la chaîne de monomères, le PDMS peut être presque « liquide » (n faible) ou « solide » (n grand). Au niveau macromoléculaire, nous constatons que la molécule est très flexible. Trois raisons expliquent ce comportement, d'une part la liaison Si-O est plus longue que la liaison C-C, d'autre part l'angle de

valence Si-O-Si (140°) est plus ouvert que l'angle C-C-C (110°) et finalement la chaîne présente un faible encombrement stérique. Cette mobilité théorique est confirmée expérimentalement par la température de transition vitreuse (T_g) particulièrement faible du PDMS ($T_g \sim -123^\circ\text{C}$) [10].

Cette flexibilité l'amène à faire partie de la famille des polymères viscoélastiques. Cela signifie qu'aux temps d'écoulement longs (ou aux températures élevées), il agit comme un liquide visqueux, semblable au miel, et qu'aux temps d'écoulement courts (ou aux basses températures) il agit comme un élastique rigide, semblable au caoutchouc. En d'autres termes, si vous laissez un morceau de PDMS sur une surface non plane durant quelques jours (temps d'écoulement long), il coulera pour épouser les formes de la surface et pour se mouler à toutes les imperfections extérieures. A l'inverse, si vous enroulez le même PDMS sur lui-même pour former une sphère et que vous le jetez sur la même surface (temps d'écoulement court), il rebondira comme une boule en caoutchouc.

Le module d'élasticité (module d'Young) E du PDMS change en fonction de son état de réticulation, mais il est typiquement autour de 3 MPa. Le module d'Young du PDMS que nous utilisons a été mesuré à plusieurs reprises au laboratoire. Il a été évalué à $2,75 \pm 0,2$ MPa (figure 34) [10].

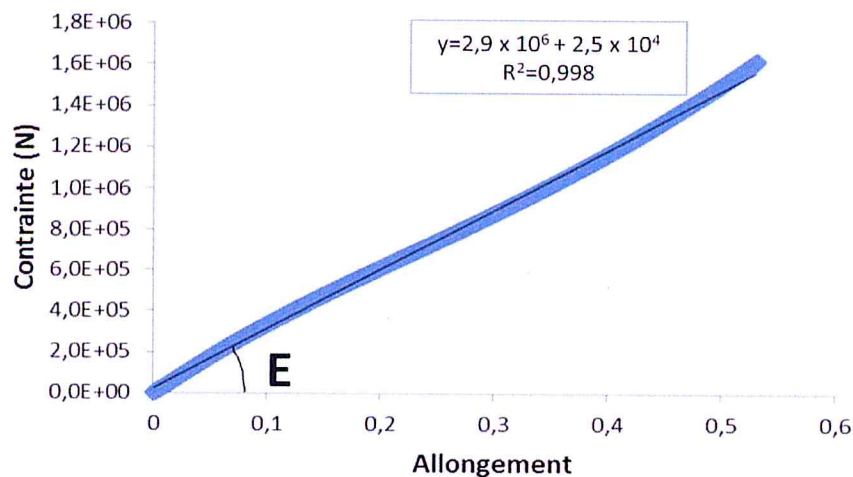


Figure 34: Évaluation du module d'Young [10].

L'allongement relatif est défini comme étant $\varepsilon = (L - L_0) / L_0$ avec L , la longueur étirée et L_0 la longueur initiale. La contrainte σ est définie comme étant la force appliquée sur la surface (épaisseur x largeur éprouvette). Nous pouvons alors facilement en déduire le module avec l'équation $\sigma = E.X. \varepsilon$ [10].

- **Propriétés de mouillage**

Après réticulation, le PDMS est un élastomère hydrophobe à cause des groupes méthyls présents en surface. Ainsi les solvants polaires comme l'eau ont du mal à mouiller le PDMS (l'eau forme des gouttes et ne s'étale pas) alors que des contaminants hydrophobes peuvent facilement s'adsorber à la surface. Son angle de contact est de 110° et l'hystérèse est de 15° en moyenne (Figure 35) [10].

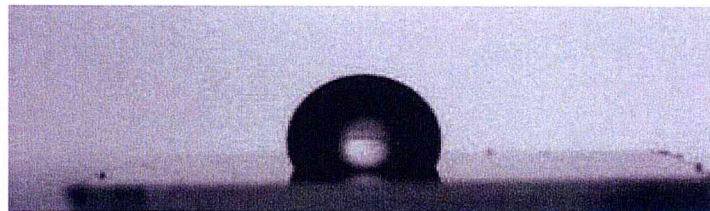


Figure 35: Angle de contact naturel du PDMS [10].

- ❖ **Moulage de Polymère**

En microfluidique, on utilise principalement du PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) pour ses propriétés de transparence, de facilité de mise en forme et de biocompatibilité (forte porosité à l'air). On exploite son élasticité pour intégrer des éléments flexibles au sein des canaux. Pour sa mise en forme, on réalise un moule obtenu par photolithographie à l'aide de résine épaisse (jusqu'à 200 microns – résine type SU8) [9].

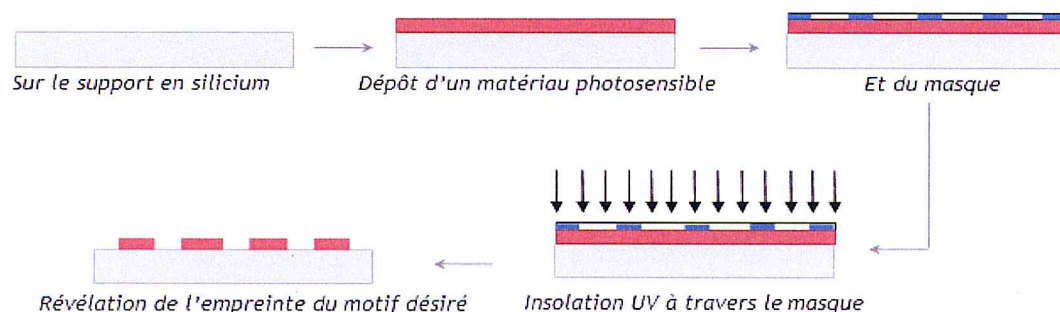


Figure 36: Les différentes phases de réalisation du moule par photolithographie [9].

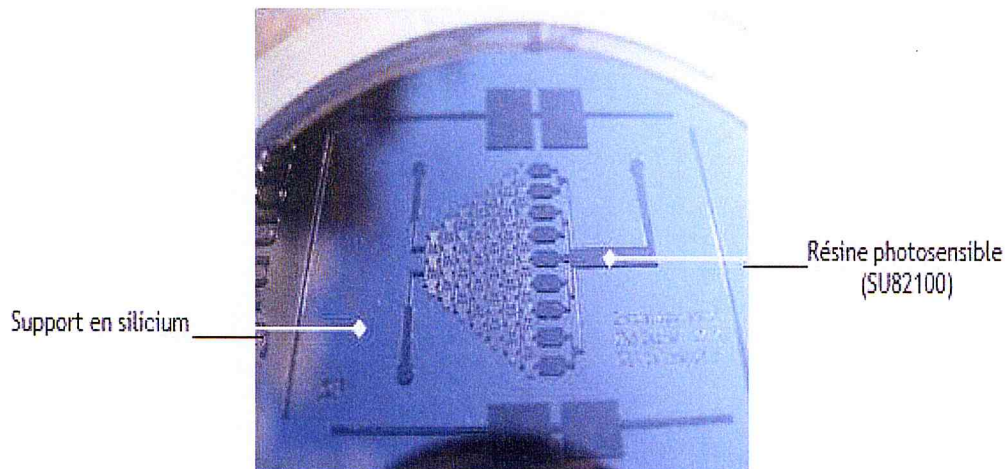


Figure 37: Exemple d'un moule permettant la réalisation du générateur de gradient de la figure 31 [9].

Le PDMS (élastomère) est alors « coulé » sur les motifs du moule et, en réticulant, on obtient une empreinte dans le PDMS (figure 39 et 40). Après perçage des trous d'accès fluïdique, le PDMS est collé sur une plaque de verre afin de refermer les canaux (figure 38). Il ne reste plus qu'à placer des tubes pour y injecter les liquides à l'aide soit de pousse- seringues, ou sous pression contrôlée [9].

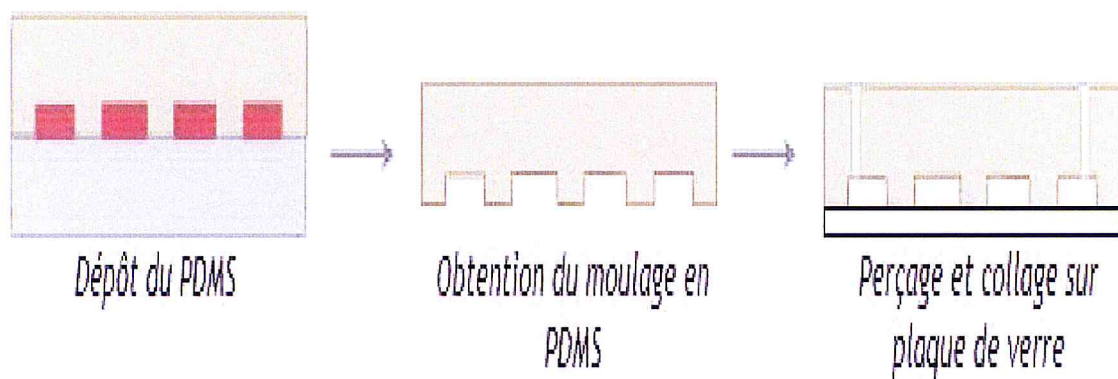


Figure 38: Moulage et finalisation du PDMS [9].

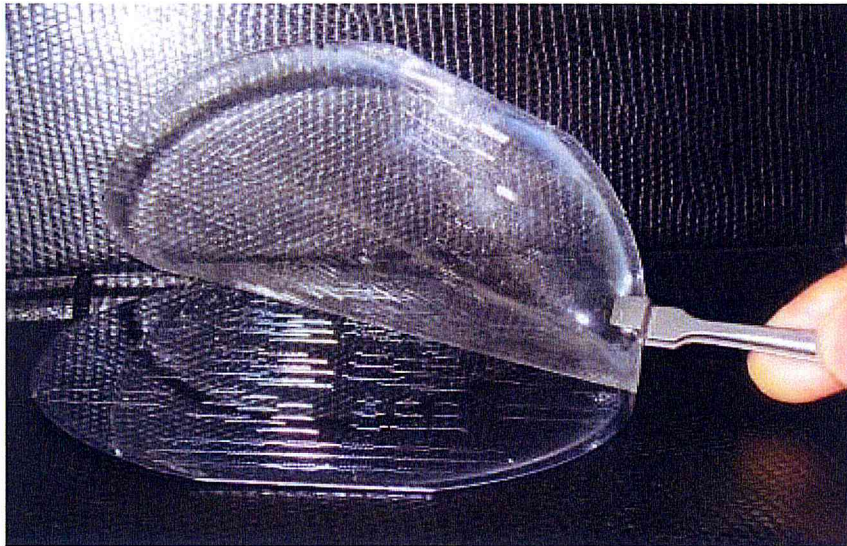


Figure 39 : Exemple de démoulage [9].

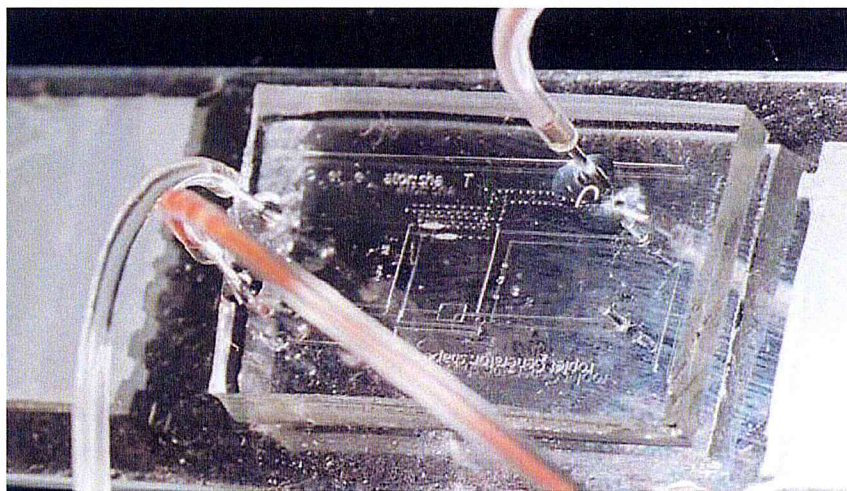


Figure 40 : Exemple de réalisation finalisée [9].

CHAPITRE 2

BIOCAPTEUR A BASE DE COUCHE FONCTIONNALISE

2.1 Les enzymes comme biorecepteur

Une grande partie de la recherche a été orientée vers le développement des biocapteurs basés sur les enzymes comme agent de reconnaissance biologique. Le travail présenté dans cette étude est aussi centré sur l'utilisation des enzymes comme biorecepteur [7].

2.1.1 Les enzymes, Introduction et historique

Les enzymes sont responsables des transformations biochimiques (catalyse) des molécules du vivant. De ce fait, cette méthode de catalyse possède un fort potentiel pour des applications industrielles diverses et variées. Lazzaro Spallanzani, moine et physiologiste italien, a été le premier à suggérer le phénomène de catalyse enzymatique à la fin du XVIII^e siècle. Il observa l'action des sucs gastriques de requin sur des aliments. En 1815, Louis Joseph Gay-Lussac décrivit la fermentation alcoolique par des micro-organismes [7].

La première enzyme (la diastase) ne fut découverte qu'en 1833 par Anselme Payen et Jean-François Persoz. En traitant un extrait aqueux de malt avec de l'éthanol, ils firent précipiter une substance, sensible à la chaleur et capable d'hydrolyser l'amidon : la diastase. Enfin, en 1836, Theodor Schwann isolera la pepsine qu'il avait déjà décrite en 1834. C'est la première enzyme isolée à partir d'un tissu animal. Henri et Brown furent les premiers, en 1902, à proposer un modèle dans lequel il y a formation d'un complexe intermédiaire enzyme- substrat. L'uréase, capable de donner, à partir de l'urée, de l'ammoniaque et du CO₂, fut la première enzyme à être cristallisée et ce en 1926. La pepsine, la trypsine et la chymotrypsine ont ensuite été cristallisées par Northrop et Coll. Ceux-ci démontrèrent de plus que les cristaux de protéines étaient des enzymes pures. Dans les années 30, Otto Warburg établit les bases de la purification des enzymes, ce qui permit d'explicitier un grand nombre de phénomènes physiologiques (la glycolyse dans le muscle, la luminescence chez le ver luisant et finalement la synthèse de l'ADN). En 1955, Sanger établit la séquence des 600 acides aminés qui compose l'insuline, avant qu'en 1966, Merrifield et Wang ne mettent au point une voie de synthèse. Progressivement, le champ d'application des enzymes s'est élargi, avec notamment des applications dans le domaine médical (comme par

exemple le traitement des désordres digestifs par des enzymes pancréatiques), en chimie analytique ou encore dans le domaine agro-alimentaire (par exemple l'utilisation de l'amylase et de la glucose isomérase pour la production de sirop de fructose à partir d'amidon de maïs), pour devenir une science à part entière, l'enzymologie [7].

2.1.2 Définition et généralités

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique et chirale. Elles sont constituées de plusieurs acides α -aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1000 kDa.

L'ordre, dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des enzymes (figure 41) [7].

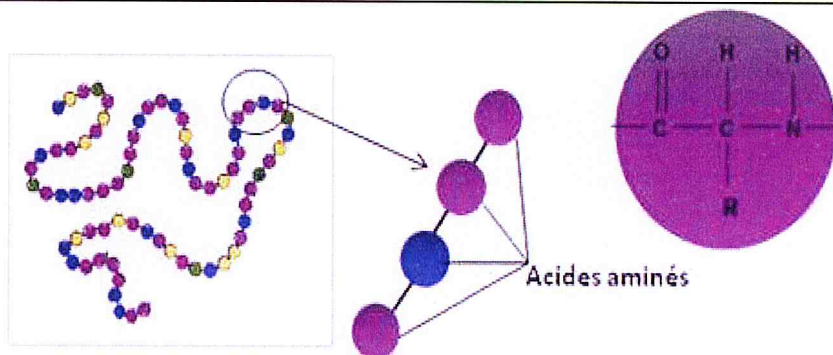


Figure 41: Représentation schématique de la structure primaire d'une protéine [7].

Ces protéines vont avoir tendance à se replier sur elles-mêmes afin de former des arrangements secondaires principalement en hélices α et en feuillets β (figure 42) ; cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes [7].

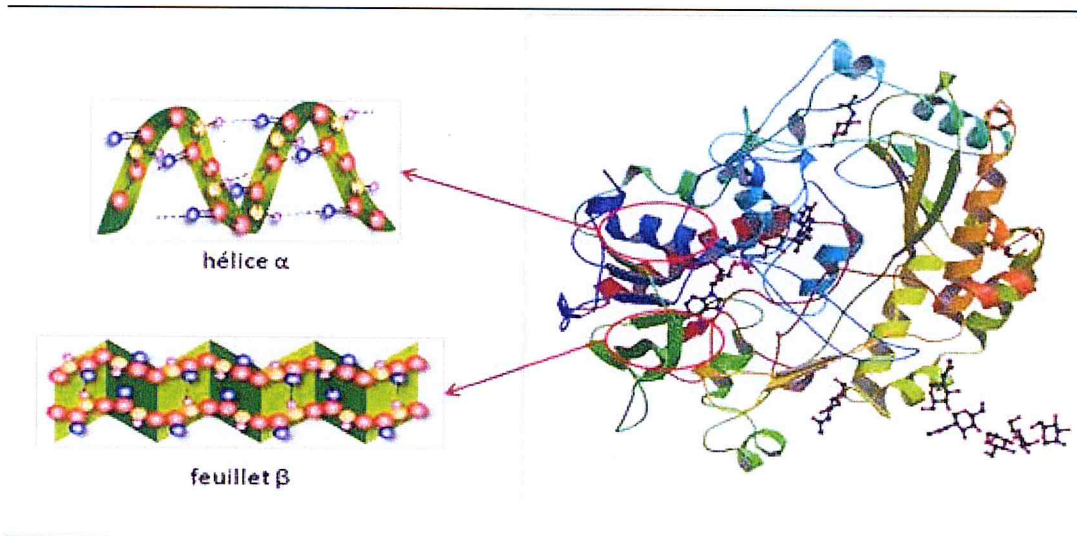


Figure 42: Représentation schématique de la structure secondaire d'une protéine [7].

L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une structure tertiaire qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures (figure 43)

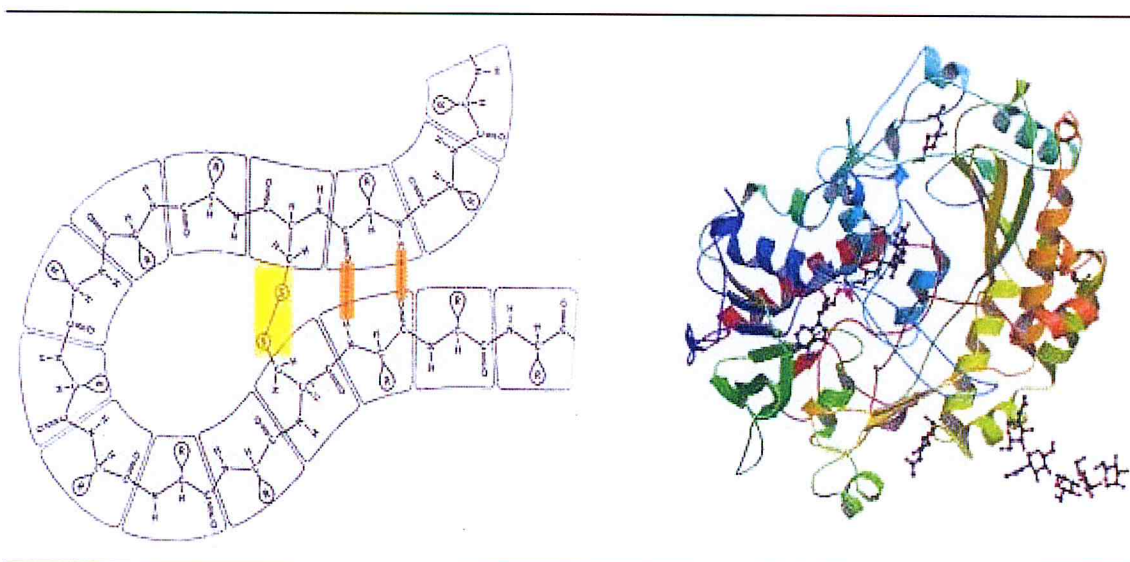


Figure 43: Représentation schématique de la structure tertiaire d'une protéine (le glucose oxydase) [7].

Une structure quaternaire peut même être décrite pour les très grosses enzymes (figure 44). Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier *via* une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif [7].

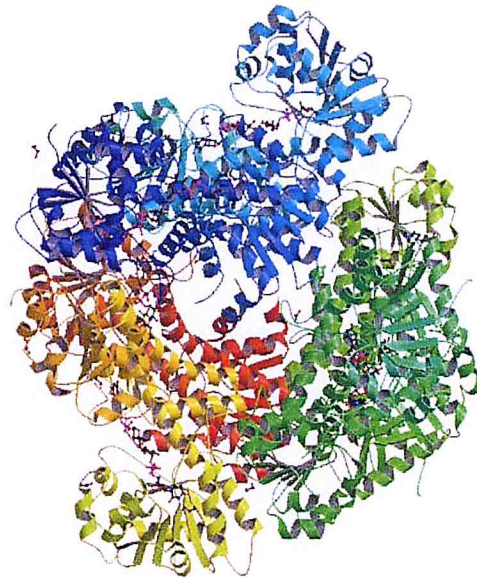


Figure 44: Représentation schématique de la structure quaternaire d'une protéine (le glucose des hydrogénase) [7].

2.1.3 Classification des enzymes

Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie, indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. C'est en fonction de leur activité catalytique que celles-ci sont classées. Une nomenclature a été proposée par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie divisant les enzymes en six grandes classes (tableau 2).

Tableau 2: Classification des enzymes [7].

E.C (classe)	Classification	Type de réaction catalysée
E.C.1	Oxydoréductases	Oxydo-réduction
E.C.2	Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
E.C.3	Hydrolases	Hydrolyse
E.C.4	Lyases	Élimination de groupement et formation de doubles liaisons
E.C.5	Isomérasés	Isomérisation
E.C.6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

Chaque classe est divisée en sous-classe et chaque sous-classe en sous- sous-classe. Un "numéro" de classification est associé à chaque enzyme et est appelé "*EC number*". Il se présente de la manière suivante : EC [numéro de la classe].[numéro de la sous- classe].[numéro de la sous-sous-classe].[numéro individuel de série dans la sous-sous classe]. Prenons l'exemple du glucose oxydase : EC 1.1.3.4. Ce chiffre est explicité ci-dessous [7] :

- EC 1 : Oxydoréductase
- EC 1.1 : Agissant sur le groupe CH-OH du donneur
- EC 1.1.3 : Avec l'oxygène comme accepteur

Le dernier chiffre est le numéro individuel de l'enzyme.

2.1.4. Avantages et inconvénients

Les enzymes présentent plusieurs groupements fonctionnels variés qui leur confèrent des propriétés de régio-, chimio- et stéréo-sélectivité. De plus, elles ont un facteur d'accroissement de la vitesse de réaction (jusqu'à 10^{17} fois plus rapide que pour des

réactions non catalysées, tableau 3) et sont capables de catalyser jusqu'à 10^5 évènements par seconde [7].

Tableau 3 : Exemple de facteur d'accroissement de la vitesse de réaction [7].

Enzymes	Facteur d'accroissement de la vitesse de réaction	Réaction mise en jeu
Chymotrypsine	10^7	protéase digestive
Lysozyme	$2 \cdot 10^8$	hydrolase acide
Uréase	10^{14}	$(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$

Cependant, elles ne présentent pas seulement des avantages. En effet, leur coût est très élevé et leur solubilité est limitée dans les solvants organiques. De plus, elles présentent une dépendance vis-à-vis d'un cofacteur ou coenzyme et leur grande spécificité limite leur champ d'application. Enfin elles montrent une instabilité importante même dans des conditions dites douces (dénaturation notamment vis-à-vis de la température, hydrolyse en présence d'acides, bases ou protéases ...) [7].

2.1.4. Les cofacteurs

Le bon fonctionnement des enzymes nécessite la présence d'une molécule, appelée cofacteur (Nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), Flavine adénine dinucléotide (FAD)). En effet, le processus de catalyse de l'enzyme entraîne une modification de celle-ci au cours de la réaction enzymatique (figure 45). Les cofacteurs vont interagir avec l'enzyme afin qu'elle retrouve son état initial et puisse amorcer un nouveau cycle catalytique. De ce fait, ils ont un rôle d'accepteur et/ou de donneur d'électrons et de protons [7].

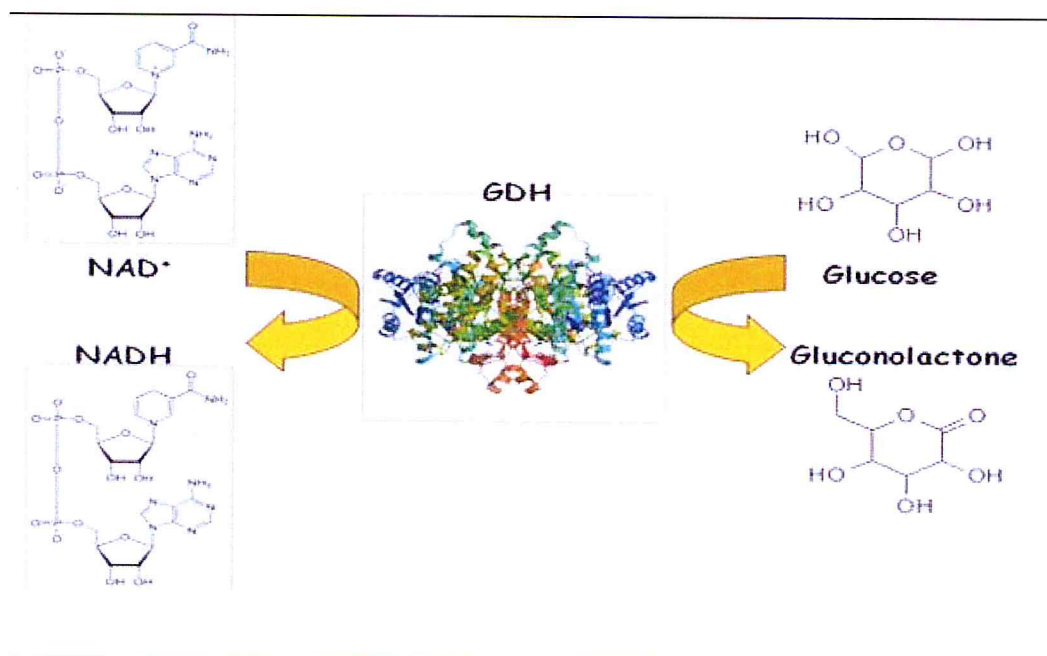


Figure 45: Schéma du mécanisme de la catalyse enzymatique de la GDH [7].

Cette famille de molécules, présentes à l'état naturel dans les cellules des organismes vivants, est donc nécessaire à l'activité des enzymes. Cela peut poser des problèmes pour les diverses applications des enzymes.

2.1.5. La catalyse enzymatique

La catalyse enzymatique repose sur les mêmes principes que les autres catalyses. Un catalyseur, ici l'enzyme, va permettre d'augmenter la vitesse d'une réaction et ce sans modifier les fonctions thermodynamiques de celle-ci. Le catalyseur va permettre d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction et d'augmenter le nombre de molécules susceptibles de réagir. En effet, l'état de transition se retrouve à une énergie inférieure, en présence d'enzyme, ce qui a pour résultat d'abaisser l'énergie d'activation comme illustré sur la figure 14a. Cette diminution de l'énergie d'activation augmente le nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps comme on peut le voir sur la figure 14b. Ces phénomènes sont à mettre en relation avec les notions de *Turn Over Number (TON)* et *Turn*.

Over Frequency (TOF). Le TON représente le nombre de moles de substrat converties par le catalyseur. Le TOF peut être défini comme le nombre de moles de substrat converties par le catalyseur par unité de temps [7].

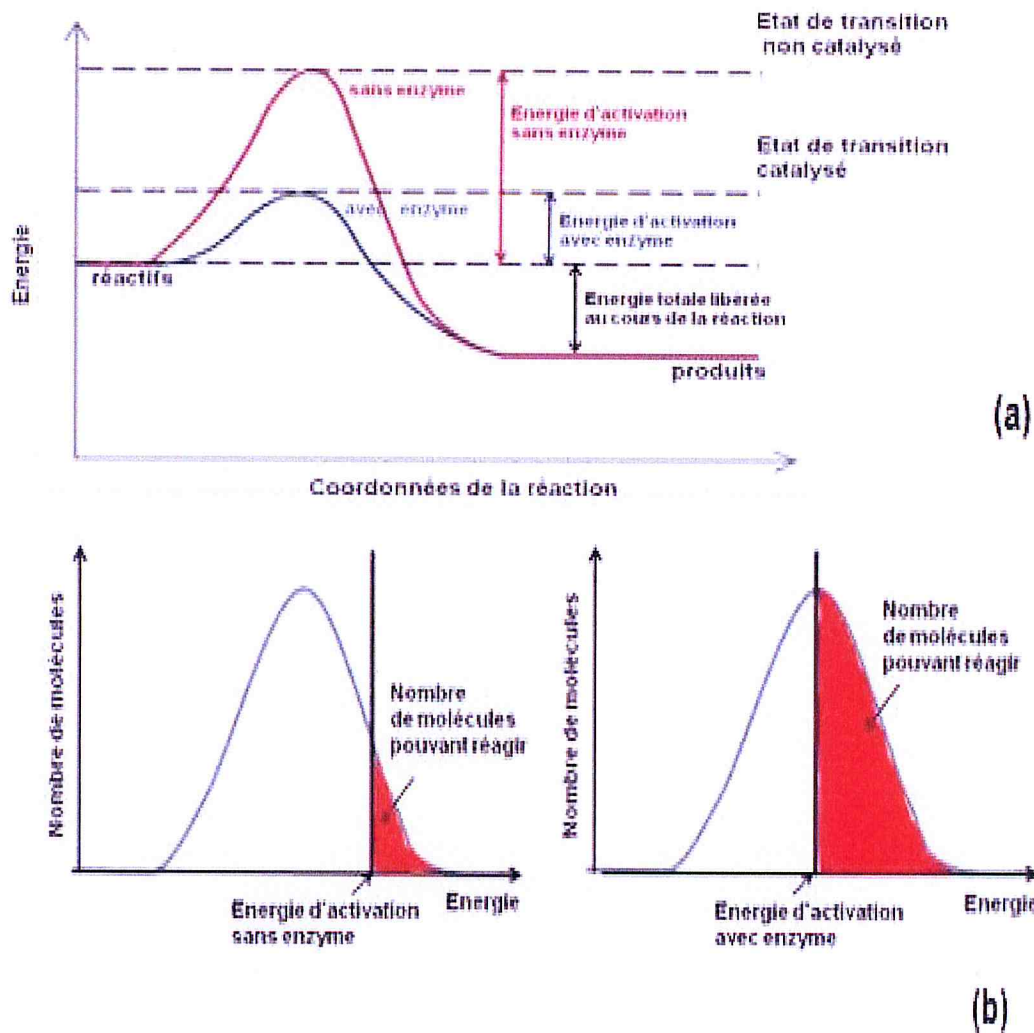


Figure 46:(a) Diagramme énergétique d'une réaction chimique catalysée par une enzyme. (b) Effet de la diminution de l'énergie d'activation sur le nombre de molécules susceptibles de réagir [7].

Dans les faits, le substrat va se lier à l'enzyme et plus particulièrement au site actif de celle-ci afin de former un complexe intermédiaire enzyme-substrat. Suite à la rupture de cette liaison, dont la durée de vie est limitée et bien définie, un produit va être formé (figure 47).

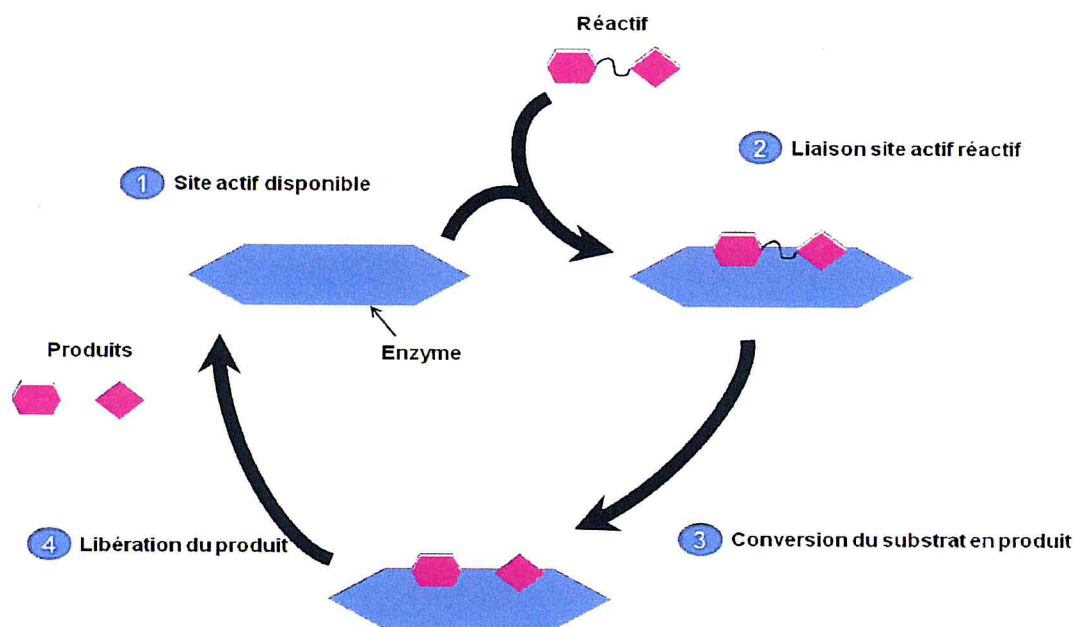


Figure 47: Schéma du mécanisme d'un cycle de catalyse enzymatique (type protéase) [7].

2.1.6. Le modèle de Michaelis & Menten L'équation de Michaelis & Menten

Les premiers à avoir proposé et développé une théorie en catalyse enzymatique en phase homogène, furent Leonor Michaelis et Maud Menten, en 1913. Ils proposèrent une équation, l'équation de Michaelis & Menten (équation 1), reposant sur l'hypothèse qu'un équilibre rapide entre les concentrations en enzyme, en substrat et en complexe enzyme-substrat s'établit au cours de la réaction catalysée. La concentration totale du substrat $[S]_0$ doit être très supérieure en comparaison à celle de l'enzyme $[E]_0$ et les mesures de cinétique seront toujours faites pour des concentrations de produit très faible [7].



Où k_1 , k_{-1} et k_2 sont les constantes de vitesse.

Étape : instantanée limitante

La vitesse V s'écrit sous la forme :

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \text{ Ou } K_M = \frac{k_1 + k_2}{k_{-1}}$$

2.1.7. Les constantes cinétiques

❖ La vitesse maximale

La vitesse maximale est l'asymptote de la branche hyperbolique représentant l'équation de Michaëlis-Menten dans le modèle de Michaëlis-Menten. Cette branche hyperbolique est aussi appelée courbe de saturation de l'enzyme par le substrat (figure 48) :

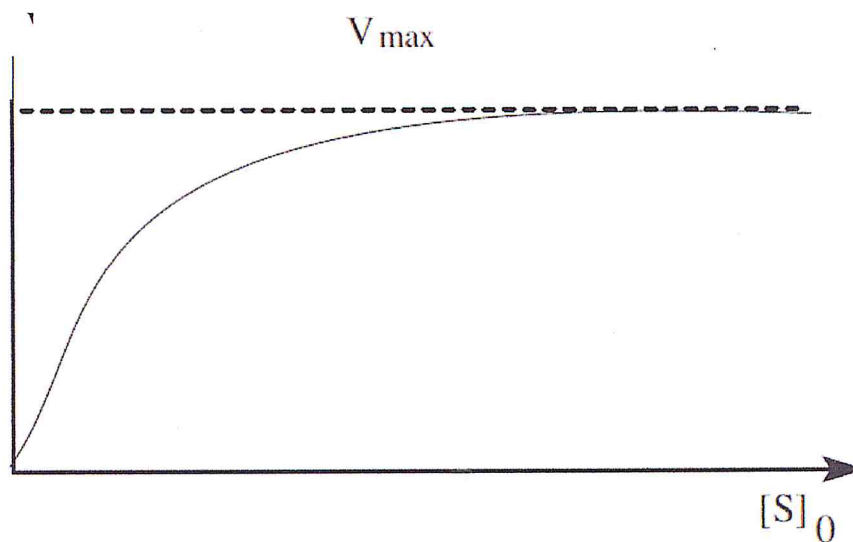


Figure 48: Relation hyperbolique entre la vitesse de la réaction enzymatique (V) et la concentration initiale du substrat ($[S]_0$) pour une concentration en enzyme ($[E_0]$) donnée [7].

❖ La constante catalytique

La constante catalytique d'une enzyme, appelée K_{cat} , est une mesure de l'activité catalytique maximale de cette enzyme. Elle représente le nombre de molécules de substrat par unité de temps.

❖ Constante de Michaelis

La constante de Michaelis, appelée K_M , est inversement proportionnelle à l'affinité de l'enzyme pour son substrat. L'affinité de l'enzyme pour son substrat diminue avec la constante de Michaelis.

Elle peut être définie également comme la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale. Son unité est donc exprimée en mol.L^{-1} .

❖ Constante de spécificité

La constante catalytique et la constante de Michaelis, prises séparément, ne sont pas suffisantes pour caractériser une enzyme. En effet, une enzyme peut avoir une grande affinité vis-à-vis de son substrat (faible valeur de K_{cat}) et inversement. Le rapport entre ces deux constantes, K_{cat}/K_M , représente mieux la spécificité globale d'une enzyme par rapport à son substrat. Ce rapport est appelé efficacité catalytique.

2.1.9 Facteurs influençant la vitesse des réactions enzymatiques

• La concentration en substrat

La concentration en substrat n'influe pas à proprement dit la vitesse de la réaction enzymatique ; seule la concentration en enzyme a une véritable influence. Cependant, c'est un facteur important afin de déterminer les constantes k_M et V_{max} de l'équation de Michaelis- Menten. Pour cela, on utilise la représentation de Line Weaver et Burk (figure 49) :

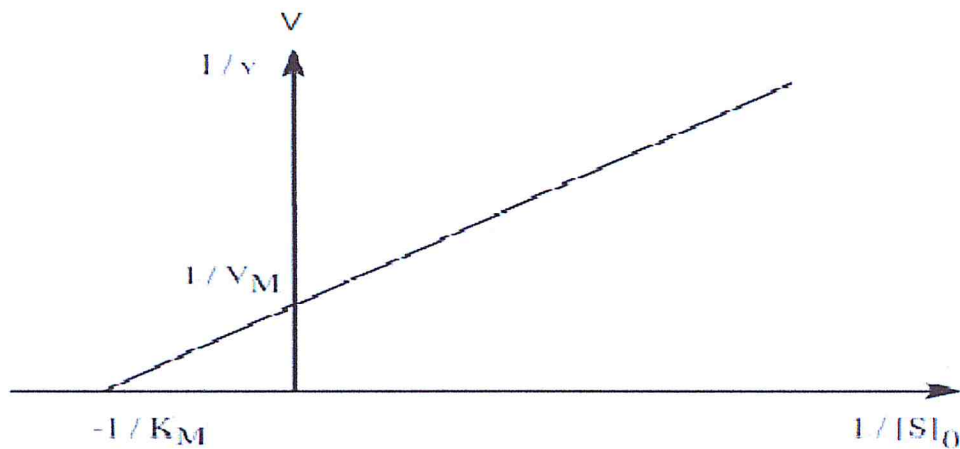


Figure 49 : Représentation de Lineweaver et Burk (avec K_M , la constante de Michaelis, $[S]_0$ la concentration initiale du substrat et V_{max} , la vitesse maximale de la réaction enzymatique) [7].

- **La température**

Contrairement aux réactions dites « classiques », une augmentation trop importante de la température peut avoir un effet négatif sur la cinétique des réactions enzymatiques. En effet, du fait de l'importance de la structure tertiaire des enzymes dans leur activité catalytique, une température trop élevée pourrait dénaturer de façon irréversible cette structure. L'effet de la température est illustré sur la figure 50.

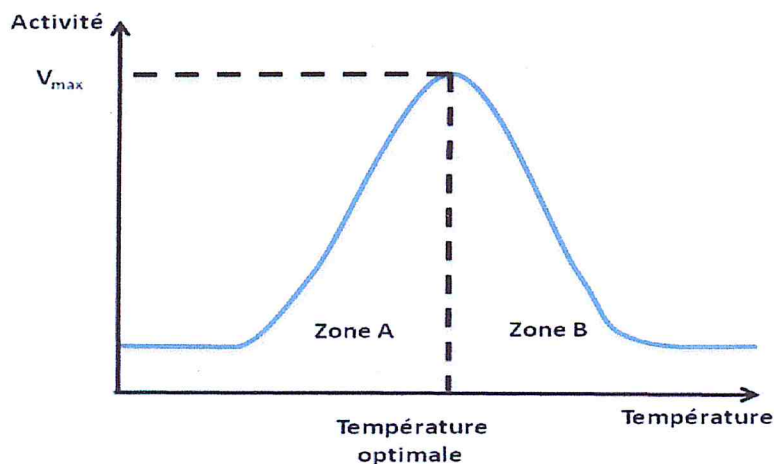


Figure 50 : Effet de la température sur l'activité enzymatique. Activation par la chaleur (zone A) et dénaturation thermique (zone B) [7].

La zone A correspond à l'activation de la réaction enzymatique par la chaleur comme pour toutes les réactions chimiques qui peut s'expliquer au moyen de la loi d'Arrhenius :

$$K = A. \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (3)$$

K : contante de vitesse.

A : facteur de fréquence.

E_a : énergie d'activation.

La zone B correspond à la dénaturation thermique des enzymes. Plusieurs paramètres peuvent influencer sur la résistance des protéines vis-à-vis de la température comme par exemple le pH, la fixation du substrat sur l'enzyme ou encore la force ionique [7].

- **Le pH**

La plupart des enzymes ne sont actives que dans un domaine de pH bien défini. L'évolution de l'activité enzymatique en fonction de pH se présente sous la forme d'une courbe de Gauss, ayant une évolution similaire à celle de la température (figure 51).

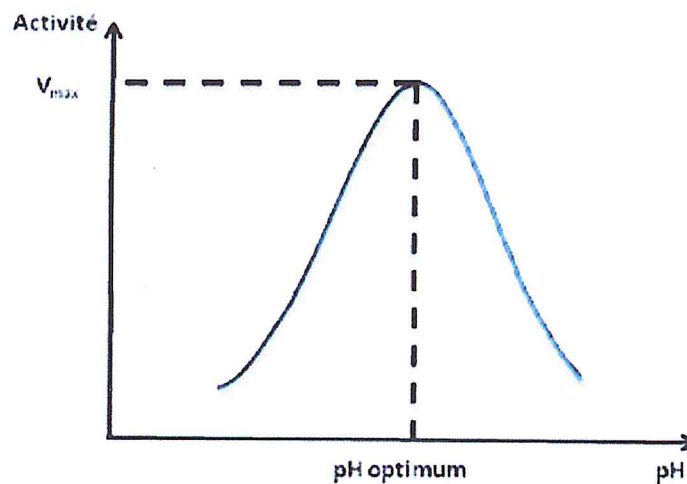


Figure 51 : Effet du pH sur l'activité enzymatique [7].

Un pH optimal est observé et dépend du site actif de l'enzyme et de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. En effet, le pH va influencer l'activité enzymatique *via* l'état d'ionisation du site actif de l'enzyme (influence sur la conformation de l'enzyme) ou du substrat (une seule forme est catalysée) [7].

- **L'effet de la force ionique**

La nature des sels de la solution tampon ainsi que la variation de la force ionique engendrée par ceux-ci va influencer sur la vitesse d'une réaction enzymatique. En effet, une enzyme peut présenter une activité plus ou moins grande selon le tampon de travail choisi et ce pour un même pH. Il est donc indispensable de tenir compte des forces ioniques afin d'obtenir des résultats reproductibles [7].

2.1.10 L'immobilisation de l'enzyme

Pour de nombreuses applications, il n'est pas souhaitable pour des raisons économiques par exemple, d'utiliser les enzymes en solution. L'immobilisation des enzymes peut alors induire une modification de leur activité et généralement une augmentation de leur stabilité. La stabilité de l'enzyme immobilisée dépend de la nature intrinsèque de l'enzyme, des conditions d'immobilisation, de la nature du matériau support utilisé et des conditions de réactions. Cependant le modèle de Michaelis-Menten reste valide à condition de lui appliquer quelques corrections afin de l'adapter aux milieux hétérogènes. Les constantes diffusionnelles du substrat et des produits doivent être prises en compte ce qui permettra de définir une nouvelle constante K_M , appelée K_{Mapp} pour constante apparente. La variation de l'activité va dépendre de plusieurs paramètres et notamment de la nouvelle conformation du système qui pourra être favorable ou pas à la catalyse enzymatique. Une enzyme peut donc présenter aussi bien une augmentation qu'une diminution de son activité après immobilisation [7].

La méthode d'immobilisation est également un paramètre important. En effet, la diffusion des différents substrats va être fortement modifiée par rapport aux systèmes homogènes mais également en fonction de la méthode d'immobilisation.

❖ Les différentes méthodes d'immobilisation des enzymes

Les enzymes présentent un fort intérêt dans le domaine de la biocatalyse. Cependant, comme nous l'avons évoqué, leur coût et leur stabilité limitée dans le temps sont des facteurs limitant leur utilisation industrielle. Afin de palier ces inconvénients, une stratégie fut proposée : l'immobilisation des enzymes qui permet de stabiliser celles-ci au cours de leur utilisation, de pouvoir les réutiliser et de séparer l'enzyme des produits de la réaction enzymatique. En 1916, Nelson et Griffin seront les premiers à démontrer qu'une enzyme, en l'occurrence l'invertase, conserve son activité catalytique et ce même après avoir été immobilisée par adsorption sur du charbon actif. Cette technique connaîtra un véritable essor à partir des années 1950 avec les premières applications dans divers domaines. Il existe différentes techniques d'immobilisation pouvant être aussi bien chimiques que physiques. On peut notamment citer cinq méthodes, couramment utilisées, présentant chacune leurs avantages et leurs inconvénients [7] :

- ✓ L'adsorption
- ✓ La réticulation
- ✓ Le greffage covalent
- ✓ L'encapsulation
- ✓ La reconnaissance par affinité et bioaffinité (reconnaissance antigène/anticorps ou encore récepteurs/protéines).

Les quatre premières techniques citées sont détaillées ci-dessous.

✓ **L'adsorption**

L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface (figure 52). L'immobilisation est alors due à des interactions faibles de type Van der Waals, liaisons hydrogène, transfert de charges (liaisons ioniques), échanges d'ions ou encore à des interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles).

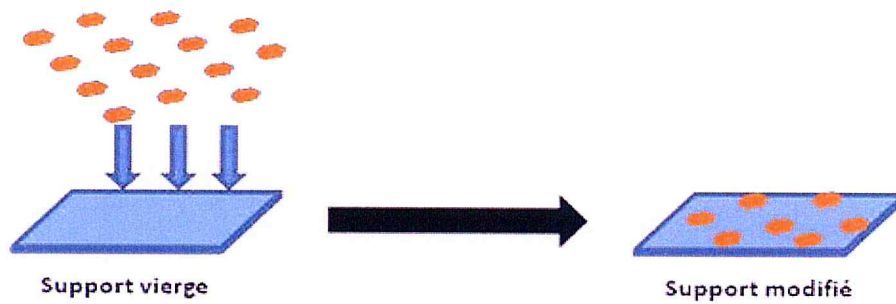


Figure 52: Adsorption des enzymes sur un support [7].

Cette technique d'immobilisation présente plusieurs avantages. C'est une méthode très simple à mettre en œuvre nécessitant seulement de mettre en contact l'enzyme et le support dans des conditions de pH, température et de force ionique données. De plus elle est facilement réversible, économique et ne requiert aucun réactif chimique pouvant dénaturer l'enzyme. Cependant, elle présente un inconvénient majeur puisque, du fait des interactions faibles liant l'enzyme au support, ces systèmes sont peu stables, l'enzyme se désorbant au cours du temps. De plus, il peut être nécessaire de procéder à des modifications de la surface du support afin de permettre l'adsorption du biorécepteur.

✓ La réticulation

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dit réticulants qui vont permettre de lier les enzymes entre elles par des liaisons chimiques. Il existe deux méthodes de réticulation, soit les enzymes sont reliées entre elles par des agents réticulant de façon directe, soit en plus de l'agent réticulant une protéine inerte peut être utilisée afin de faciliter ou améliorer la réticulation, on parle alors de co-réticulation (figure 53).

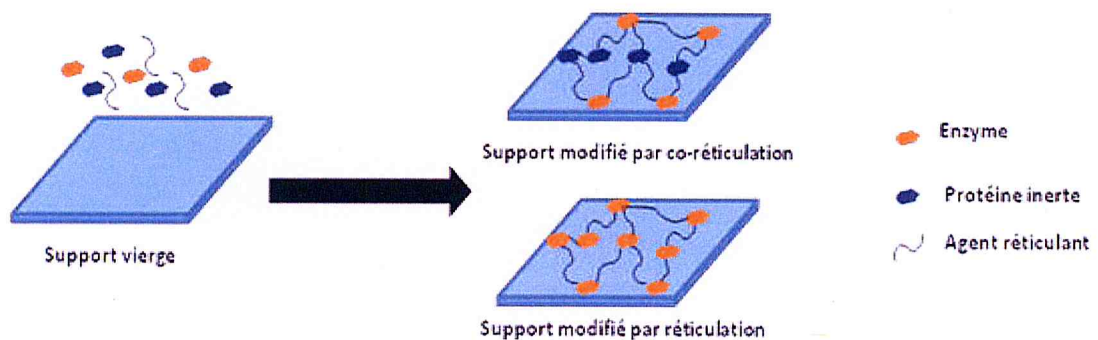


Figure 53: Réticulation et co-réticulation des enzymes [7].

Les enzymes, après avoir été adsorbées sur un support, sont mises en contact avec un agent réticulant afin de donner un réseau enzymatique tridimensionnel et qui contrairement à l'enzyme seule est insoluble. Cette méthode d'immobilisation présente l'avantage d'être assez simple à mettre en œuvre et de plus de part les liaisons chimiques, elle offre une bonne stabilité au système. Cependant, une perte d'activité enzymatique peut être observée. En effet outre l'utilisation de réactifs potentiellement non biocompatibles et pouvant altérer l'activité de l'enzyme, les propriétés physiques du système sont modifiées, leur donnant des propriétés mécaniques médiocres.

✓ Le greffage covalent

Le principe de cette méthode d'immobilisation est de faire réagir un groupement fonctionnel libre de l'enzyme avec un groupement fonctionnel du réactif (figure 54). En général, les groupements fonctionnels du réactif sont des fonctions carboxyliques, thiols, hydroxyles ou encore amines. Ces groupements sont très peu réactifs et doivent de ce fait être activés afin de pouvoir réagir avec les groupements de l'enzyme, n'intervenant pas dans la catalyse enzymatique, dans des conditions dites douces afin de ne pas dénaturer la biomolécule.

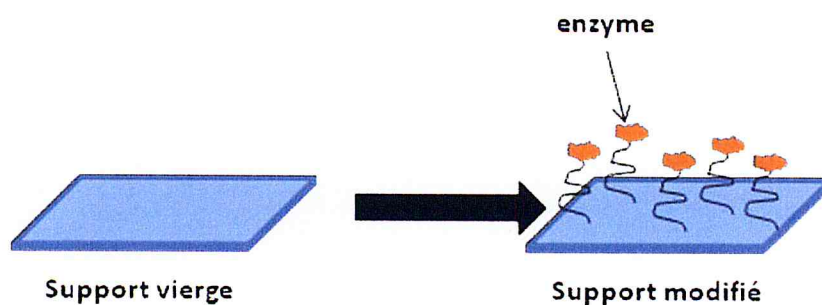


Figure 54: Greffage covalent des enzymes [7].

Cette méthode d'immobilisation présente principalement comme avantage de fixer l'enzyme de façon permanente et augmente la stabilité de celle-ci, lui conférant une durée de vie plus importante. Cependant, les réactifs indispensables au greffage risquent de dénaturer l'enzyme et donc de provoquer une perte d'activité.

✓ L'encapsulation

Le principe de l'encapsulation est de fixer les enzymes dans une matrice (figure 55). L'immobilisation se fait de manière physique et pas de manière chimique contrairement au greffage covalent. La matrice doit permettre la diffusion des petites molécules seulement afin que les enzymes ne puissent pas s'en échapper. Ces matrices peuvent être inorganiques (gels de silice), organiques (nafion), polymères (polyacrylamide, polyuréthanes..) ou composites (pâte de carbone).

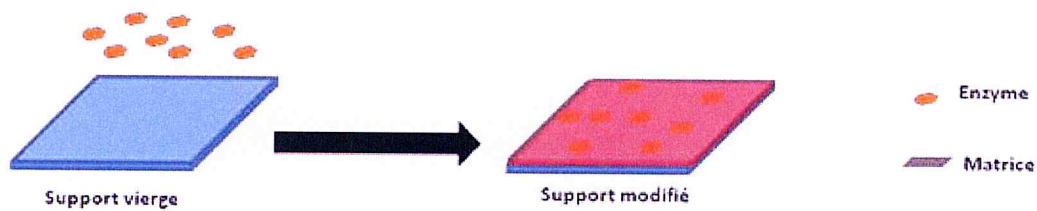


Figure 55: Encapsulation des enzymes [7].

Les principaux avantages de cette méthode d'immobilisation sont qu'elle est économique, facile à mettre en œuvre et peut s'appliquer à un nombre élevé d'enzymes. Cependant, l'enzyme peut diffuser à travers la matrice au cours de l'utilisation et de plus elle

n'est applicable que pour des substrats de petite taille. Par ailleurs, les groupements actifs de l'enzyme peuvent réagir avec la matrice et donc entraîner une diminution de l'activité catalytique de celle-ci.

2.1.11 Effets de l'immobilisation des enzymes :

❖ Sur la stabilité :

Un des buts majeurs de l'immobilisation enzymatique, particulièrement pour des applications analytiques, est un accroissement de la durée de vie de l'enzyme. Dans de nombreux cas, la vitesse d'inactivation ou de dénaturation d'une enzyme immobilisée est inférieure à celle d'une enzyme libre [11].

❖ Sur la cinétique :

Les propriétés cinétiques d'une enzyme immobilisée ne sont pas parfaitement corrélées à celles de l'enzyme libre. La diminution du transfert de masse du substrat dans le support résultant de l'immobilisation, augmente la valeur du K_M de l'enzyme. Il s'ensuit que le domaine correspondant à la cinétique de premier ordre de l'enzyme vis-à-vis du substrat est plus étendu.

De plus, l'orientation stérique de l'enzyme fait que le site actif ne peut être que partiellement accessible, voire inaccessible au substrat: en d'autres termes, l'enzyme est maintenue dans une conformation telle que la fonction catalytique est partiellement ou totalement bloquée [11].

Enfin, le microenvironnement de l'enzyme, tel qu'il est déterminé par le support lui-même, a une influence importante sur les paramètres cinétiques. Une explication de ce type de comportement serait une interaction du support lui-même avec le site actif.

Toutes les enzymes ont un pH optimum auquel elles présentent une vitesse de réaction maximale. Quand l'enzyme est immobilisée, le pH optimum peut se décaler suivant la nature et la charge positive ou négative du support. Par exemple, un support chargé négativement peut entraîner un pH de la couche enzymatique plus faible que celui du pH du milieu. En conséquence, on observe un décalage du pH optimum vers une zone plus alcaline pour compenser l'augmentation locale de la concentration en protons. On constate que l'effet est contraire pour un support chargé positivement [11].

2.1.12 La fabrication de puces de capteurs enzymatiques

L'applicabilité du polydiméthylsiloxane (PDMS) pour la fabrication simple et rapide de puces de capteurs enzymatiques, basée sur la détection électrochimique, est examinée. La puce de capteur est constituée d'un substrat PDMS avec un canal microfluidique fabriqué dans celui-ci et d'un substrat en verre avec des microélectrodes modifiées par une enzyme. Les deux substrats sont serrés ensemble entre des plaques en plastique. La puce du capteur n'a montré aucune fuite autour des microélectrodes dans un écoulement de solution continu (34 μl / min) [18].

2.1.13 Conclusion

L'utilisation des enzymes dans divers domaines industriels présente donc un fort intérêt et explique les efforts faits ces dernières années par la communauté scientifique dans ce sens. Cependant, elles restent des entités faisant partie du domaine du vivant et leur emploi nécessite de prendre certaines précautions notamment afin de conserver leur propriétés catalytiques.

De plus chaque enzyme présente des particularités, il n'existe pas de solution universelle applicable à l'ensemble de cette classe de protéines [7].

2.2 Les oxides de vanadium

2.2.1 Le composé VO₂

Le VO₂ est l'un des matériaux les plus étudiés en raison de sa transition de phases réversible et de sa commutation (« switching ») optique dans le domaine infrarouge. Toutefois ce matériau demeure délicat à élaborer en raison du contrôle rigoureux de la teneur en oxygène (VO_x avec $1,98 < x < 2,03$).

Le composé VO₂ peut également cristalliser dans diverses phases stables (VO₂ (M1)) pour monoclinique 1, (VO₂ (M2)) pour la phase monoclinique base centrée...) et métastables (VO₂ (T)) pour la phase triclinique...) en fonction de la méthode de croissance et des paramètres expérimentaux [12].

2.2.2 Les propriétés physiques de VO₂

La transition de phases de VO₂ à T_C entraîne un changement de structure et de ce fait une modification de la résistivité. La figure 56 présente la mesure de résistance d'un film mince de VO₂ en fonction de la température où la résistance du matériau chute de quatre ordres de grandeurs entre l'état semi-conducteur basse température de forte résistance et l'état métallique haute température de faible résistance [12].

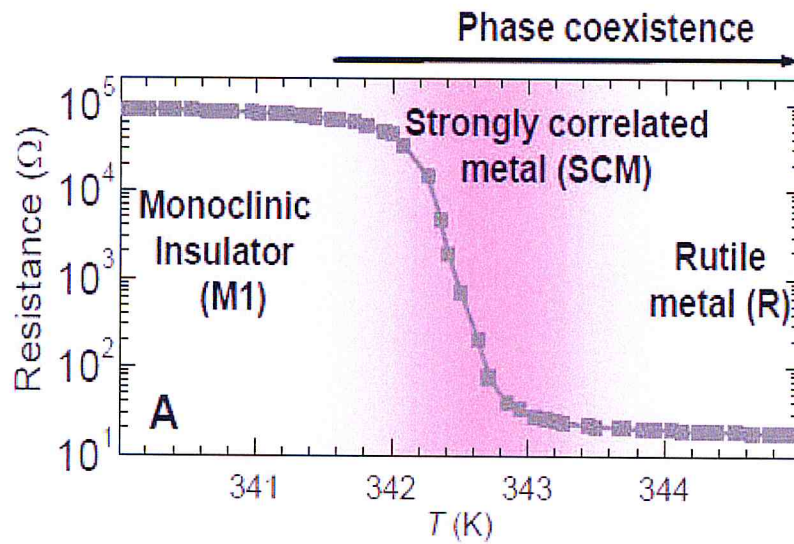


Figure 56: Mesures de résistance électrique en fonction de la température d'un film mince de VO₂ [12].

Les propriétés optiques de VO₂ comme la réflectance, l'émissivité ou la transmittance sont également modifiées lors de la transition de phases. Cette transition étant réversible et du premier ordre, le système se trouve dans un mélange de phases et présente une hystérésis. Dans le cas précis de VO₂, au chauffage le matériau transite et voit sa phase métallique VO₂ (R) germer dans la phase semi-conductrice VO₂ (M1). En refroidissant la phase semi-conductrice va à son tour germer dans la phase métallique mais à une température différente [12].

Chapitre 3

MODÉLISATION DU PROCESSUS DE MESURE À BASE D'UN BIOCAPTEUR

3.1 Introduction

La micro-fluidique recouvre l'étude des écoulements de liquides ou de gaz dans des micro-canaux. Ces canaux, fabriqués ou naturels (Figure 57), ont une section transverse dont la taille varie de la centaine de microns au millimètre [13].

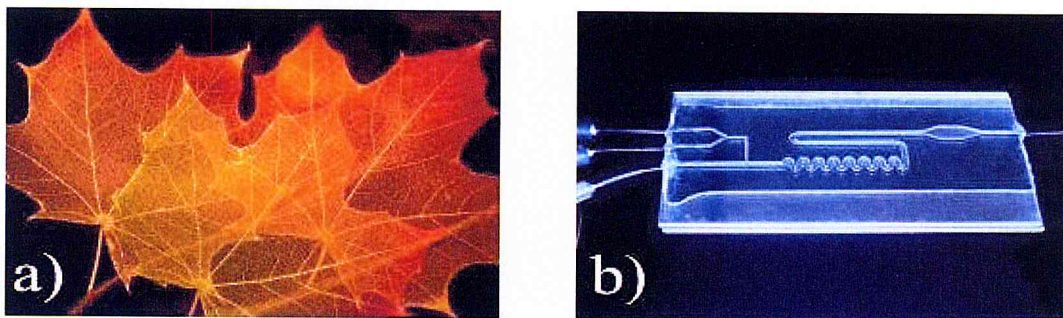


Figure 57: Différents exemples de micro-fluidique. a) veines dans une feuille d'érable, b) puce micro fluidique fabriquée au L.O.F [13].

3.2 lois de comportement

Aux dimensions micrométriques, les lois d'écoulement restent celles de la fluidique classique et peuvent être étudiées avec l'équation de Navier-Stokes dans le cas de liquide incompressible dont les termes inertiels peuvent être ici négligés. Le régime d'écoulement est majoritairement laminaire, caractérisé par un faible nombre de Reynolds ($Re < 1$). Les phénomènes de diffusion au sein de ces écoulements sont bien maîtrisés et permettent le développement d'applications associées telles que des micromélangeurs ou des générateurs de gradient de concentration (figure 58) [9].

Les microsystemes développés en microfluidique s'appuient sur les procédés des micro- technologies propres aux MEMS et doivent offrir aux applications microscopiques, les mêmes fonctionnalités que les applications macroscopiques. La technologie autour de la microfluidique, associée à la maîtrise comportementale des écoulements fluidiques, a permis très naturellement son application en direction des sciences du vivant. En étant à des échelles dimensionnelles physiologiques de la circulation sanguine (du micron à quelques dizaines de microns) il est possible de reproduire des environnements mimétiques dont les conditions expérimentales sont contrôlées et évolutives.

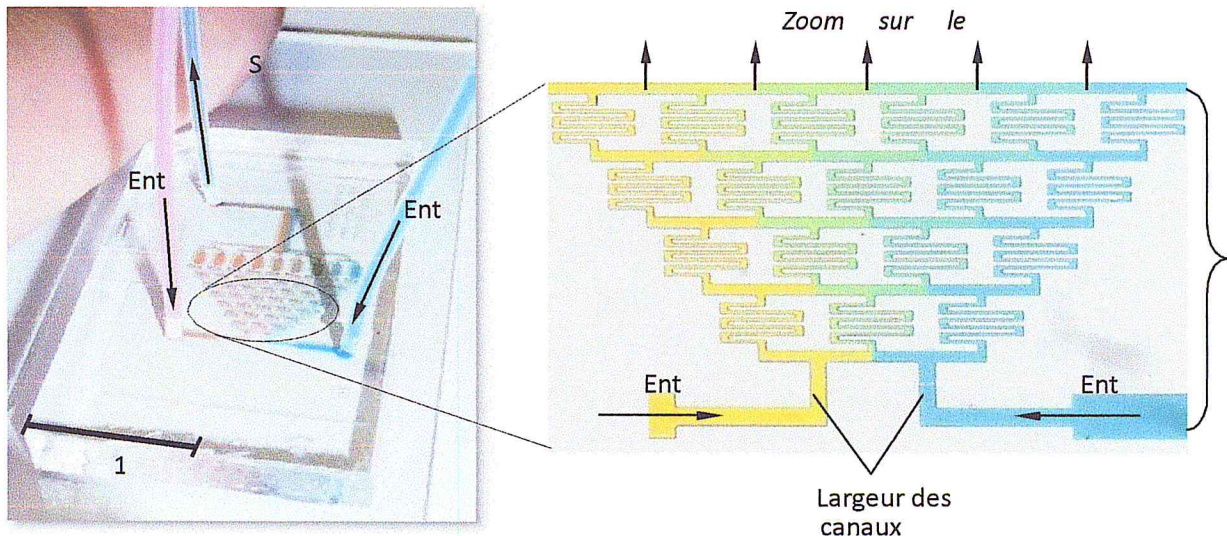


Figure 58 : Générateur de gradient développé au laboratoire SATIE de l'ENS Cachan [9].

3.3 Nombre de Reynolds

- **Osborne Reynolds**

Osborne Reynolds a mis en évidence un nombre sans dimension caractéristique de la nature de l'écoulement d'un fluide (1883) : le nombre de Reynolds.

- **Intérêt**

L'intérêt initial de ce nombre sans dimension était de pouvoir comparer l'écoulement de différents fluides dans différentes configurations géométriques.

Deux cas d'écoulement, a priori différents par leur géométrie et leurs caractéristiques physiques, mais, ayant même nombre de Reynolds sont dits semblables (théorie des similitudes) [14].

Définition : Formule de calcul :

$$R_e = \frac{V.D}{\nu} = \frac{\rho.V.D}{\mu} \quad (4)$$

Re: nombre de Reynolds s.u .

V : vitesse débitante en m/s .

D : diamètre en m.

U: viscosité cinématique en m²/s.

μ : viscosité dynamique en kg /(m.s).

ρ: masse volumique en kg/m.

3.4 Nature de l'écoulement

Sur le plan pratique des écoulements, le nombre de Reynolds est un indicateur de la nature de l'écoulement.

En effet, le nombre de Reynolds exprime le rapport des forces d'inertie aux forces de viscosité lors de l'écoulement.

• Écoulement laminaire

Donc lorsque le nombre de Reynolds est petit, les forces d'inertie sont faibles par rapport aux forces de viscosité. Il se peut même qu'elles deviennent négligeables pour des valeurs très faibles de ce nombre.

Alors l'écoulement est dit "LAMINAIRE", et si le nombre de Reynolds est inférieur à 2000, cet écoulement est même réversible ; les forces d'inertie ne pouvant pas modifier la structure du fluide due aux forces de viscosité.

Pour un nombre de Reynolds compris entre 2000 et 3000 l'écoulement reste laminaire mais n'est plus réversible - si l'on inverse le sens du courant, les particules de fluide ne retrouvent pas leur position initiale.

Les fluides très visqueux et à faible vitesse occasionnent des écoulements laminaires -fioul, huile, sang dans les artères.

• Écoulement turbulent

Pour des valeurs supérieures à 3000 l'écoulement du fluide est dit "TURBULENT". Les turbulences résultent des forces d'inerties qui deviennent plus importantes que les forces de viscosité et la structure du fluide tend à se transformer de manière irréversible et importante.

Les fluides peu visqueux et à vitesse élevée, occasionnent des écoulements turbulents - air dans les tunnels ventilés, eau dans les réseaux de chauffage ou d'eau froide, etc...

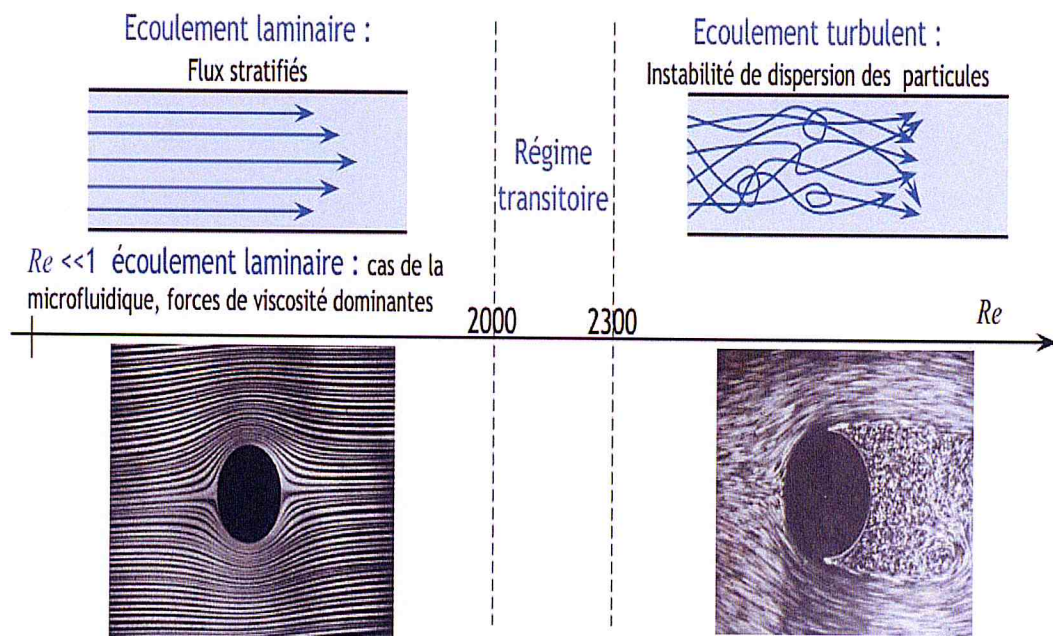


Figure 59: Caractérisation du type d'écoulement en fonction du nombre de Reynolds Re [9].

3.5 Équation de Navier-Stokes

L'hydrodynamique des écoulements liquides reste fluide jusqu'à quelques nanomètres. Ainsi à l'échelle du micron, on peut appliquer l'équation constitutive d'un fluide newtonien incompressible qui est décrite par l'équation de Navier-Stokes :

$$\rho \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} = -\rho \vec{u} \nabla \vec{u} - \nabla p + \eta \Delta \vec{u} \quad (5)$$

Terme convectif

Terme visqueux

En régime établi, dans le cadre de la microfluidique où l'on peut négliger les termes d'inertie, cette équation se réduit à la loi suivante:

$$\Delta p = \eta \Delta \vec{u} \quad (6)$$

C'est l'équation de Poiseuille qui peut se résoudre selon la géométrie du canal. Ici la résolution est donnée pour une canalisation circulaire de rayon R (figure 61), le profil de l'écoulement est alors de nature parabolique. La vitesse (v_{\max}) de ce profil dépend directement de la pression appliquée.

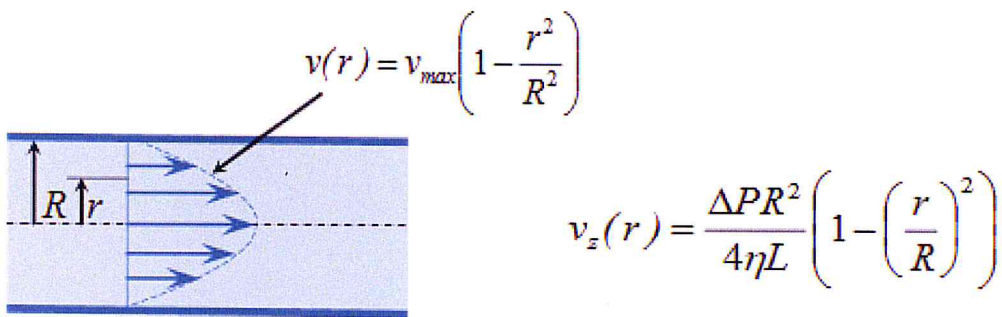


Figure 60 : Résolution de l'équation de Poiseuille dans le cas d'une canalisation circulaire [9].

En microfluidique en lien avec les procédés de microfabrication Capteurs en technologie MEMS les sections de canalisation sont plutôt de nature rectangulaire (figure 61).

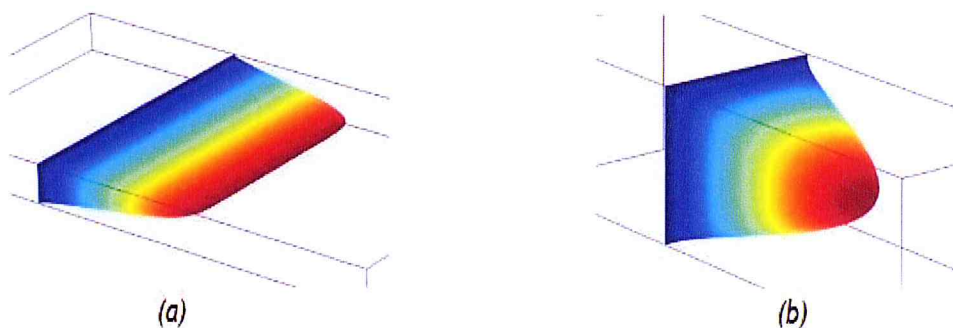


Figure 61: (a) Profil d'un écoulement plan, (b) Profil d'un écoulement section rectangulaire [9].

Il y a un comportement linéaire entre la différence de pression ΔP et le débit Q au sein du canal. Dans le cas d'un canal circulaire, on obtient classiquement:

$$Q = \int_0^R v_z 2\pi r dr = \frac{\pi \Delta P R^4}{8 \eta L} \quad (7)$$

Soit la relation entre le débit et la différence de pression appliquée:

$$\Delta P = \frac{8 \eta L}{\pi R^4} \quad (8)$$

3.6 Résistance hydraulique

En reprenant l'équation précédente, les écoulements dans un réseau microfluidique peuvent se modéliser en utilisant la notion de «résistance hydraulique», par analogie directe avec un réseau électrique de résistance. La pression est associée à la tension, le débit au courant électrique.

Ainsi, la résistance hydraulique est définie par le rapport entre la différence de pression appliquée et le débit.

D'un point de vue micro-technologique, il est compliqué de réaliser des canaux avec des sections circulaires, les sections sont plutôt de type rectangulaire de hauteur h et de largeur w .

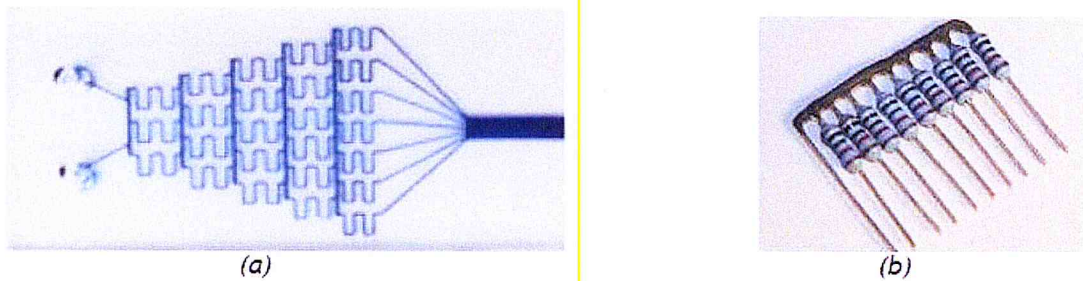


Figure 62: (a) Exemple d'un circuit microfluidique, (b) exemple d'un circuit électrique [9].

3.7 Diffusion et mélange

Les écoulements à l'échelle de la microfluidique étant laminaire, il en résulte que la mise en contact de deux milieux se traduit par un écoulement qui sera

«Bidimensionnel», l'absence de turbulence n'entraînant un mélange que par diffusion.

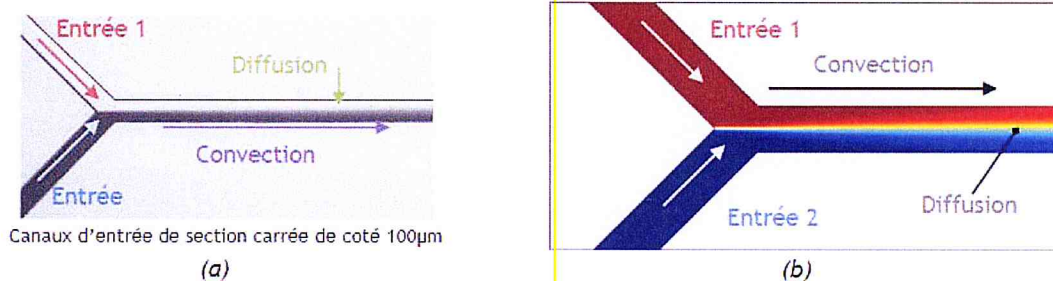


Figure 63: (a) Exemple d'un circuit en Y et (b) la simulation du transport de matière [9].

C'est à la fois une force et une faiblesse pour la microfluidique. Faiblesse car le mélange n'est que diffusif, force car on peut alors tirer avantage de ce profil de diffusion pour analyser des réactions en écoulement ou séparer les particules de tailles différentes entre elle.

Le nombre de Peclet permet de caractériser la nature du transport de matière. Il est défini par le rapport entre le temps de diffusion et le temps de convection:

Nombre de Peclet = temps de diffusion/temps de convection, $Pe = (T_D / T_C)$.

Avec le temps de diffusion: $T_D = L_D^2 / 2D$, D est le coefficient de diffusion, et le temps de convection : $T_C = L_C / v$.

- Si $Pe > 1$: l'écoulement est convectif la matière est principalement transporté par l'écoulement (figure 64 (a)).
- Si $Pe < 1$: c'est la diffusion qui domine (figure 64 (b)) permettant un «mélange» entre les deux liquides.

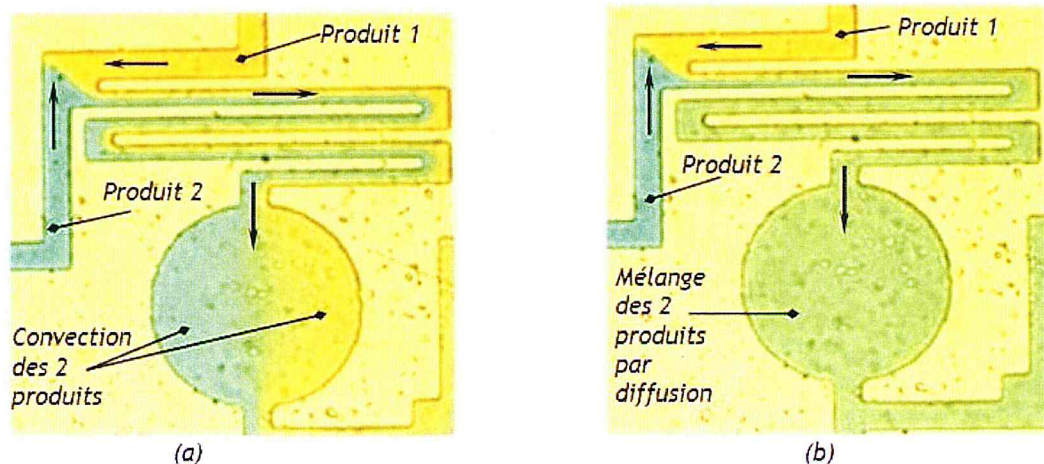


Figure 64: (a) $Pe > 1$, Convection des 2 produits, (b) $Pe < 1$, convection et diffusion des 2 produits [9].

Pour effectuer un mélange en microfluidique, on peut agir simplement sur la taille des canaux de manière à se mettre dans une configuration $Pe < 1$ (par exemple, on allonge le canal pour augmenter le temps de convection) [9].

3.8 Étude d'une cinétique de réaction

Si l'on suit l'écoulement, la position le long de la zone de contact entre les deux liquides (réactifs) devient le temps de réaction. En plaçant une série de capteurs (zones de détection) on peut suivre en « temps figé », la cinétique de réaction entre les deux liquides. On dit alors que la position est l'image du temps de réaction.

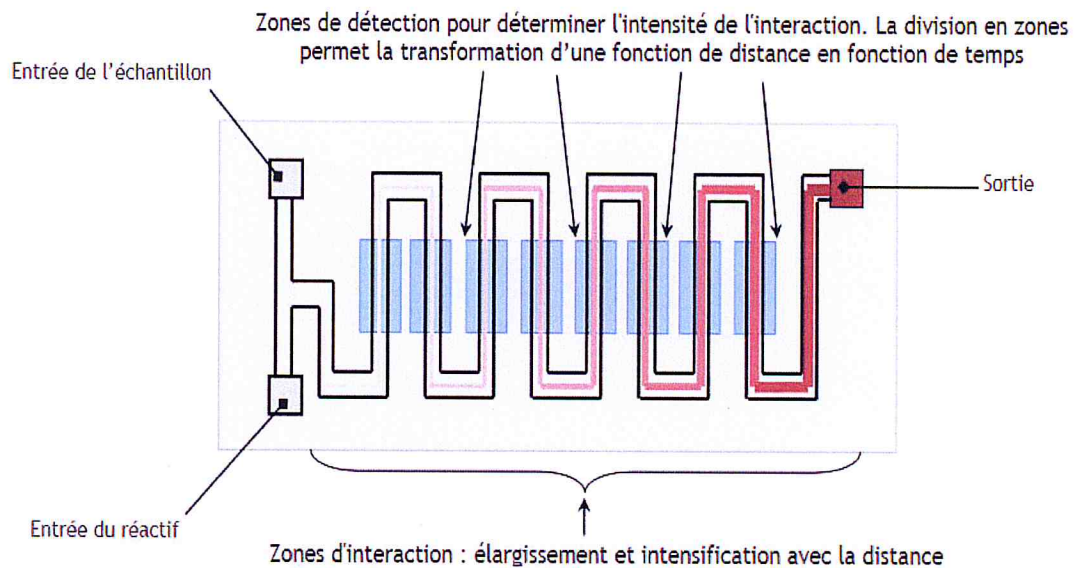


Figure 65: Schéma de principe d'un circuit en T [9].

3.9 Méthode séparative

Avec la géométrie dite « filtre en H », on opère un tri en fonction de la taille des particules via la dépendance du coefficient de diffusion avec le rayon des particules (Supposées sphériques). L'échantillon contient deux types de particules de tailles différentes qui vont avoir des nombres de « Peclet » différents. Les petites particules (figure 66 en bleu) ont un nombre de Peclet plus faible, elles diffusent alors plus rapidement dans le réactif : les particules peuvent être ainsi triées et séparées. Ce principe a un intérêt si les particules à trier présentent un rapport d'au moins 10 entre leurs rayons.

Comme nous l'avons vu le nombre de Peclet dépend du rapport temps de diffusion sur temps de convection ; le temps de diffusion est $T_D = L_D^2 / 2D$ avec D , le coefficient de diffusion dans le cas de particules sphériques $D = K_B T / 6\pi\eta a$ où a représente le rayon de la particule [9].

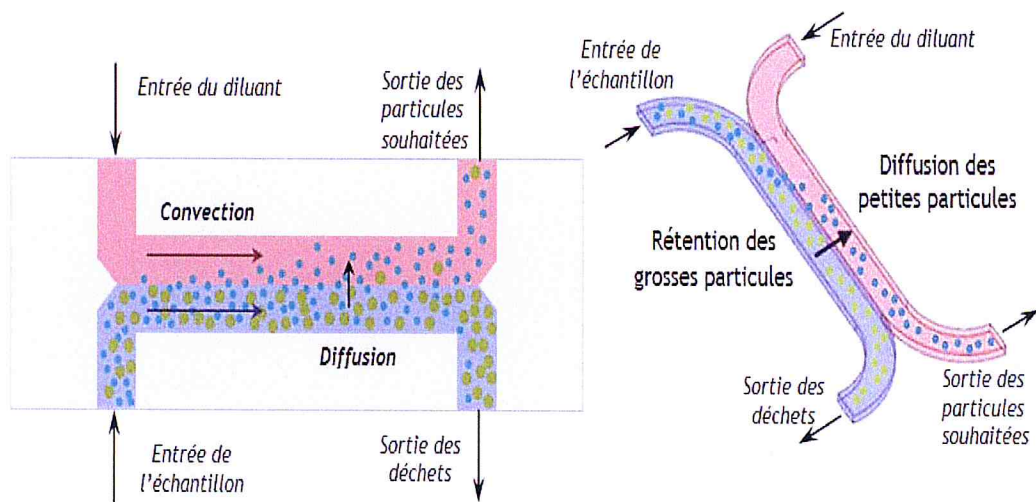


Figure 66: Exemple d'un filtre en H [9].

En réduisant les dimensions permet d'effectuer des analyses simples avec un volume d'échantillon très fortement réduit. La physique associée peut s'aborder de manière simple à l'aide de l'équation de Navier-Stokes, le nombre de Reynolds étant faible. En jouant avec les dimensions, on peut régler la nature du transport de matière et l'adapter au besoin. Il faut désormais voir la microfluidique comme un outil technologique à même de mettre en œuvre des laboratoires sur puces révolutionnaires. Dans les années à venir, il faut s'attendre à les voir envahir les systèmes d'analyses médicales.

3.10. Méthode des éléments finis

La MEF consiste à chercher une solution approchée de la solution exacte sur un espace discrétisé constitué par des éléments. Les éléments sont obtenus par une décomposition du domaine, appelé le maillage. La quantité ainsi que la qualité des éléments du maillage jouent un rôle essentiel dans la précision de la simulation. Plus le maillage est fin, plus la précision de la solution peut être élevée. Cependant, les coûts calcul qui en résultent augmentent rapidement avec la taille du maillage et les temps de simulations constituent des freins à la créativité des concepteurs, même sur des ordinateurs performants [15].

3.11.Comsol Multiphysiques

La simulation numérique est devenue un élément indispensable dans les domaines des sciences et de l'ingénierie. Elle permet de comprendre et de modéliser le fonctionnement des systèmes réels. Aujourd'hui une large gamme d'outils numériques est disponible. Elle repose sur la mise en œuvre des modèles théoriques utilisant différents outils mathématiques dont la technique des éléments finis. La simulation numérique permet d'étudier le fonctionnement et les propriétés d'un système modélisé ainsi qu'à en prédire son évolution.

Il est très intéressant d'avoir un environnement de simulation qui inclut la possibilité d'ajouter différents phénomènes physiques au modèle étudié. C'est dans cette philosophie la que Comsol Multiphysics a été développé. C'est un logiciel de calcul numérique par éléments finis modulaire permettant de modéliser une grande variété de phénomènes physiques caractérisant un problème réel. Il sera également un outil de conception grâce à son aptitude à gérer les géométries 3D complexes.

Différents modules physiques existent sous Comsol, parmi lesquels on trouve la mécanique des fluides, le transfert thermique, l'électricité, l'électromagnétisme, la chimie, la mécanique des structures... Il est possible de combiner plusieurs phénomènes physiques lors d'une même simulation numérique : c'est un des points forts de ce logiciel [17].

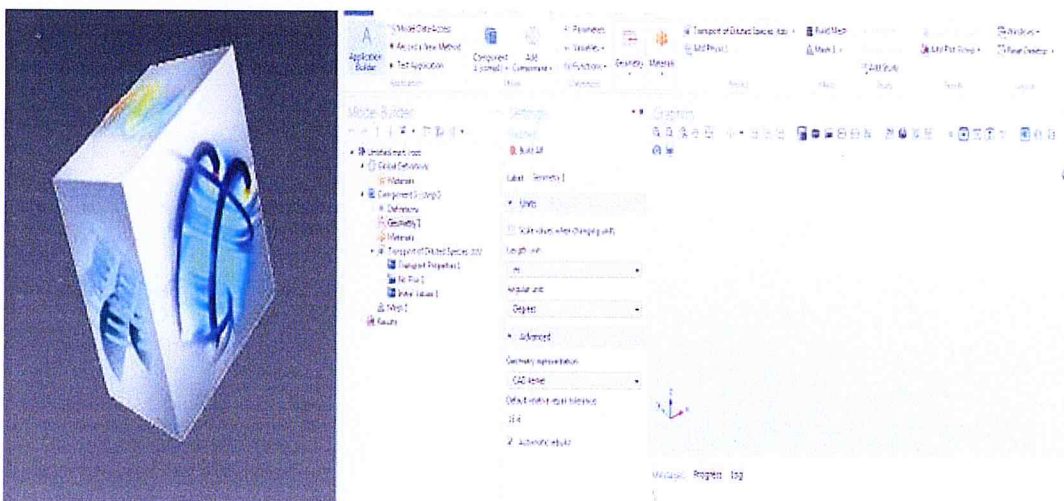


Figure 67: Comsol Multiphysiques.

Prise en main du logiciel :

Le processus de modélisation et de simulation numérique sous Comsol Multiphysics implique plusieurs étapes :

- ✓ La définition globale des paramètres et des variables liées au modèle.
- ✓ La définition de sa géométrie.
- ✓ La prise en compte des différents phénomènes physiques qui peuvent exister dans le problème considéré.
- ✓ La résolution du problème à l'aide d'un des différents solveurs.
- ✓ La visualisation des résultats.

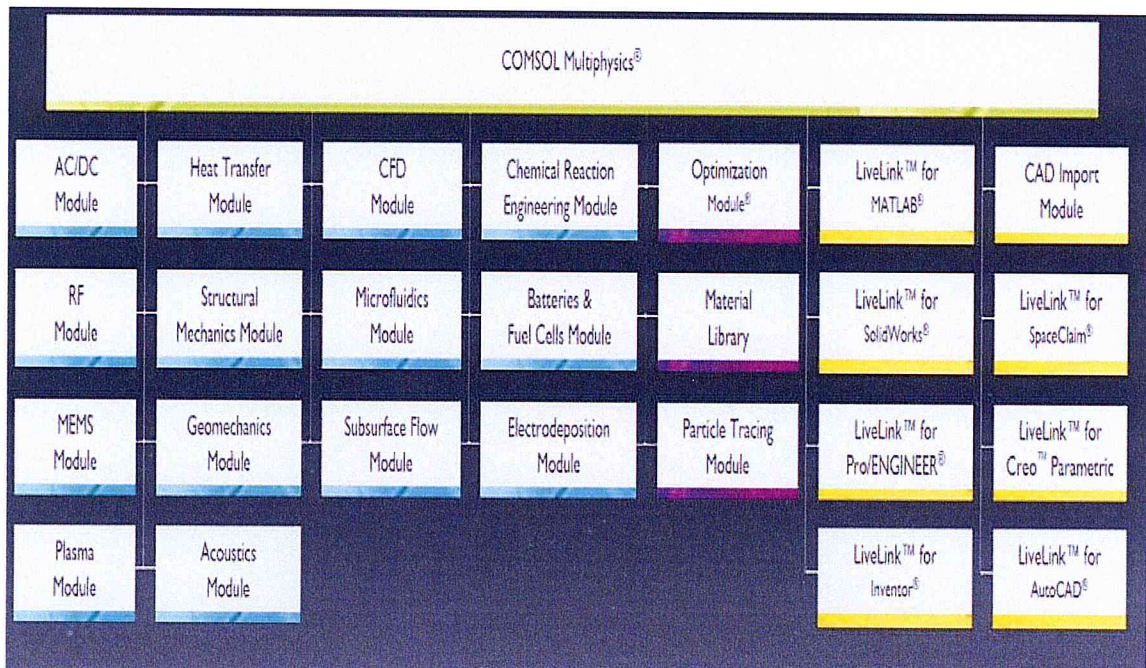


Figure 68: Modules de COMSOL [17].

Chapitre 4

MODÉLISATION ET SIMULATION D'UN BIOCAPTEUR À BASE DE RÉACTION ENZYMATIQUE EXOTHERMIQUE

4.1 Définition du model :

De nombreuses réactions catalysées par des enzymes sont exothermiques, générant de très petites quantités de chaleur. Les changements de température sont généralement déterminés au moyen de thermistances à l'entrée et à la sortie des microcanaux contenant des enzymes immobilisées dans un lit fixe dans un environnement à température constante.

Dans le cadre de ce travail, on s'intéresse à l'étude et la simulation du mécanisme de fonctionnement d'un biocapteur basé sur les réactions enzymatiques. En effet, les réactions enzymatiques sont en générale exothermiques. Nous voulons à travers nos simulations prédire la quantité de chaleur dégagée et donc les variations de température sur des couches thermosensibles genre : TiO_2 , VO_x , VO_2 , etc ...

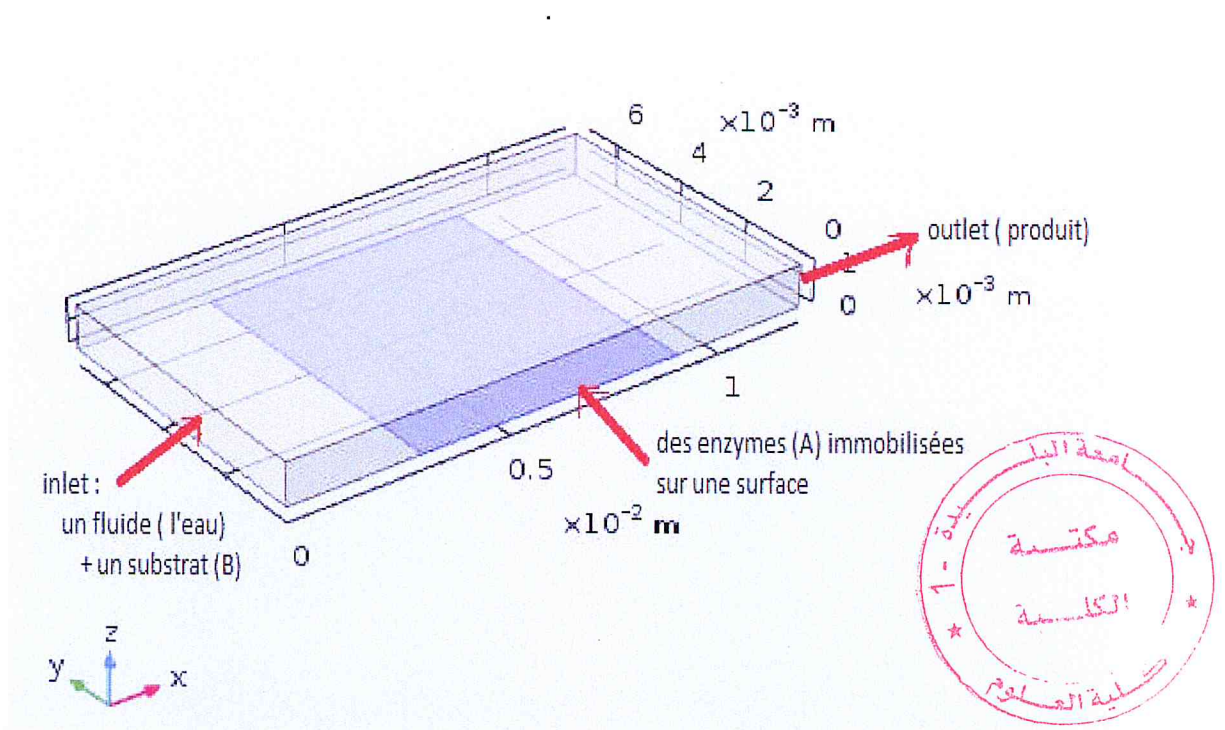


Figure 69: Simulation d'un biocapteur enzymatique avec Comsol.

4.1.1 Paramètres de modèle

Tableau 4: paramètre pour la simulation d'un biocapteur enzymatique

Name	Value	Description
k_ads	0.01 m/s	Constance de vitesse avant
k_des	0.5 mol/(m ² ·s)	Constance de taux en arrière
D	5.10 ⁻⁹ m ² /s	Diffusivité du gaz
kf	5.10 ⁻⁹ mol/(m ² ·s)	Constance de vitesse avant
kr	4.10 ⁻⁸ mol/(m ² ·s)	Inverse constante
u_in	2.10 ⁻⁴ m/s	Vitesse d'entrée
T0	300 K	Temperature initial
c_A0_ads	10 ⁻⁵ mol/m ²	Concentration du surface a l'entrée, As
cB1	2 mol/m ³	Concentration B, inlet 1
csolv	55500 mol/m ³	Concentration du solvant (l'eau)
Af1	10000 m ³ /(s·mol)	Factor de fréquence
Ef1	40000 J/mol	L' énergie d'activation
H1	-1,1.10 ⁵ J/mol	L'enthalpie de reaction
hx	1000 W/(m ² ·K)	coefficient de transfert de chaleur
Mn_A	0.032 kg/mol	mass Molar, A
Mn_B	0.032 kg/mol	mass Molar, B
Mn_D	0.064 kg/mol	mass Molar, D
Mn_solv	0.018 kg/mol	mass Molar, solvant (l'eau)

4.1.2 La physique du modèle

Dans ce modèle il y a un mélange de plusieurs physiques:

➤ La physique de l'écoulement laminaire (spf)

Est utilisé pour calculer le champ de vitesse \vec{U} (u , v , w) et de pression (P) pour le flux d'un fluide dans le régime d'écoulement laminaire.

Les équations résolues par l'interface d'écoulement laminaire sont les équations de Navier-Stokes :

$$\rho(\vec{U} \cdot \nabla)\vec{U} = \nabla \cdot [-pI + (\nabla \cdot U + (\nabla U)^T) - \frac{L}{3}\mu(\nabla \cdot U)I] + F \quad (9)$$

$$\nabla \cdot (\rho U) = 0$$

L'interface d'écoulement laminaire est utilisée pour l'analyse stationnaire avec:

$$U_0 = u_{in} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ m/s pour l'entrée (inlet1)}$$

et $P_0 = 0 \text{ Pa}$ pour la sortie (outlet)

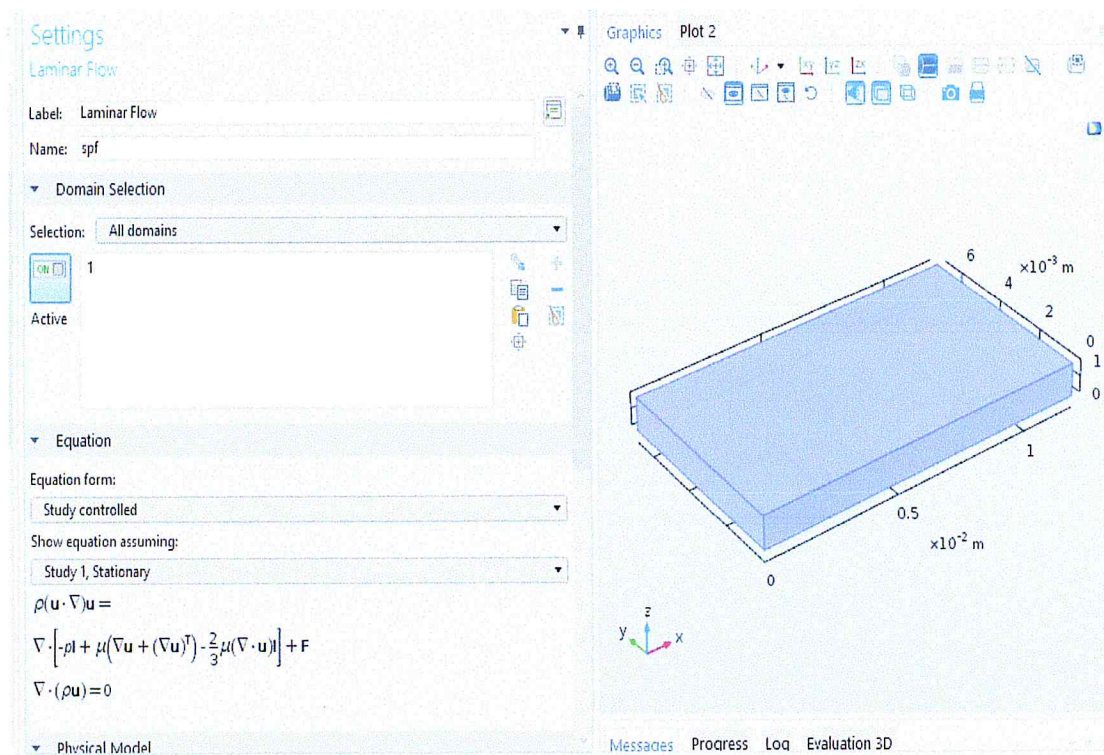


Figure 70 : La physique de l'écoulement laminaire.

➤ La réaction chimique (chem) :

cette interface physique peut être utilisée pour créer une cinétique de réaction et éventuellement calculer des propriétés de transport et thermodynamiques pour une utilisation directe

Entrées du modèle:

température (ht)

pression (1atm)

concentration (c_A0_ads ; cB1 ; cD ; csolv)

Formule de réaction:

La réaction :

B + A => D (réaction irréversible)

Taux de réaction

$$r_j K_t^j \prod_{i=1}^{Q_r} c_i^{-v_{ij}} \quad (10)$$

En utilisant les expressions d'Arrhenius

$$K^f = A^f (T|T_{ref})^{n^f} \exp(-E^f |R_j T) \quad (11)$$

$$T_{ref} = 1K$$

Avec :

$$A^f = A_{f1}$$

$$E^f = E_{f1}$$

$$n^f = 0$$

Enthalpie de réaction H=H1=-1,1.10⁵ j/mol

La chaleur de la réaction :

$$Q_j = -r_j H_j \quad (12)$$

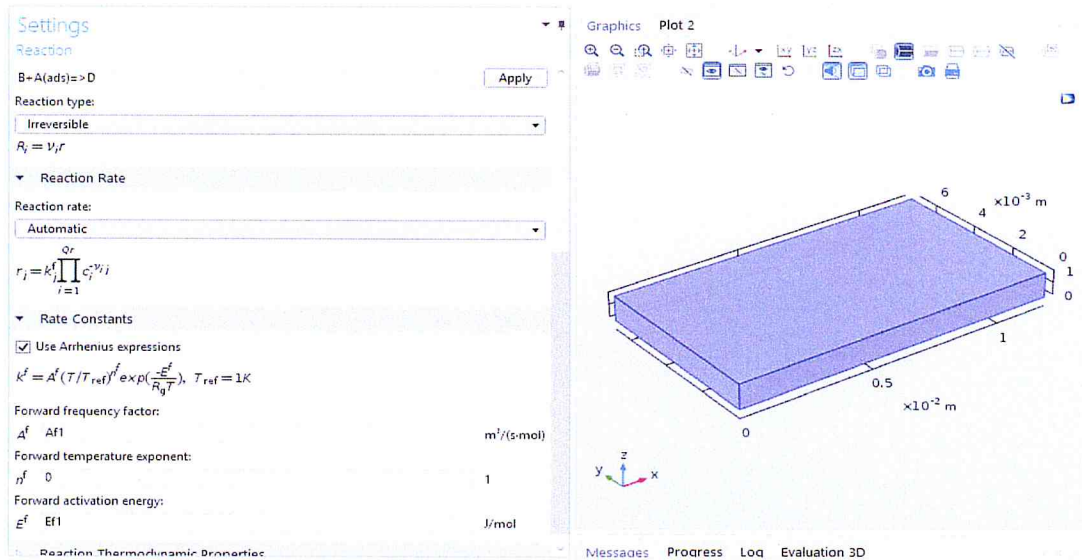


Figure 71: La réaction chimique.

➤ La physique de réaction de surface (chsr)

Les molécules d'analyse (B) peuvent adsorber et se désorber des sites de surface (A) sur les surface plane selon :

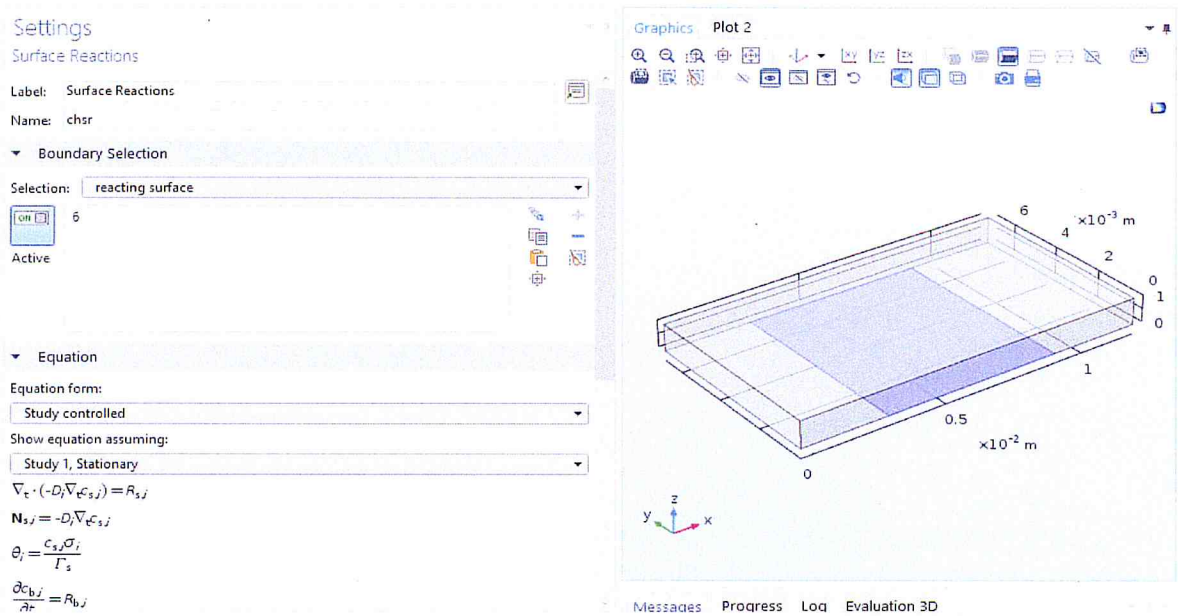
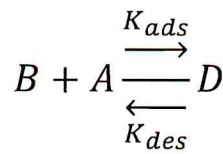


Figure72: La physique de réaction de surface.

> La physique de transfert de chaleur dans les fluides (h_t)

La physique de transfert de chaleur dans les fluides est utilisée pour modéliser le transfert de chaleur par conduction, convection et rayonnement.

Cette physique utilise la version suivante de l'équation de la chaleur pour modéliser le transfert de chaleur dans le fluide :

$$\rho C_P \frac{\partial T}{\partial t} + \rho C_P u \cdot \nabla T + \nabla \cdot q = Q \quad (13)$$

$$q = -K \nabla T$$

ρ : (Kg/m^3) densité de fluide.

C_P : ($\text{J}/(\text{Kg} \cdot \text{K})$) la capacité calorifique du fluide à pression constante.

K : ($\text{W}/(\text{m} \cdot \text{K})$) conductivité thermique des fluides.

u : (m/s) champ de vitesse de fluide.

Q : (W/m^3) source de chaleur.

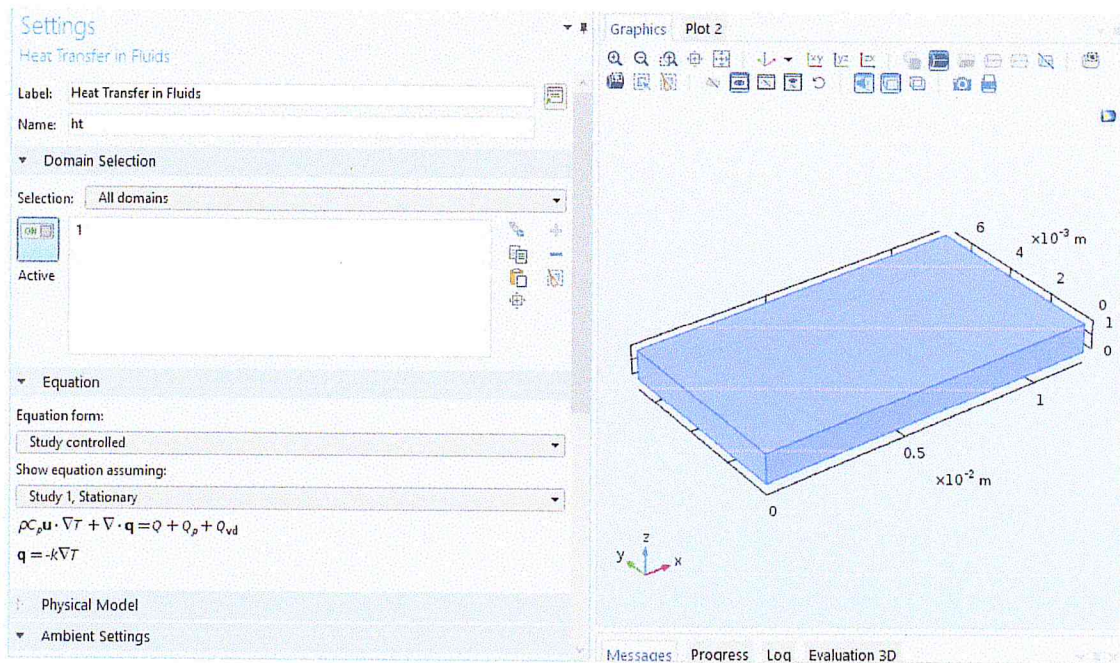


Figure 73 : La physique de transfert de chaleur dans les fluides.

➤ La physique de transport d'espèces diluées (tds)

La physique de transport d'espèces diluées est utilisé pour calculer le champ de concentration d'un soluté dilué (c_A, c_B, c_D) dans un solvant (H_2O)

Les forces motrices pour le transport peuvent être diffusé par la loi de Fick, la convection lorsqu'elle est couplée à un champ électrique :

$$\nabla \cdot (-D_i \nabla C_i) + u \cdot \nabla C_i = R_i N_i = -\nabla C_i + u C_i \quad (14)$$

D_i : ($m^2 \cdot s^{-1}$) coefficient de diffusion.

C_i : ($mol \cdot m^{-3}$) concentration molaire des espèces.

N_i : ($mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) flux molaire.

u : (m/s) champ de vitesse.

Entrées du modèle :

Température (tc2) : T

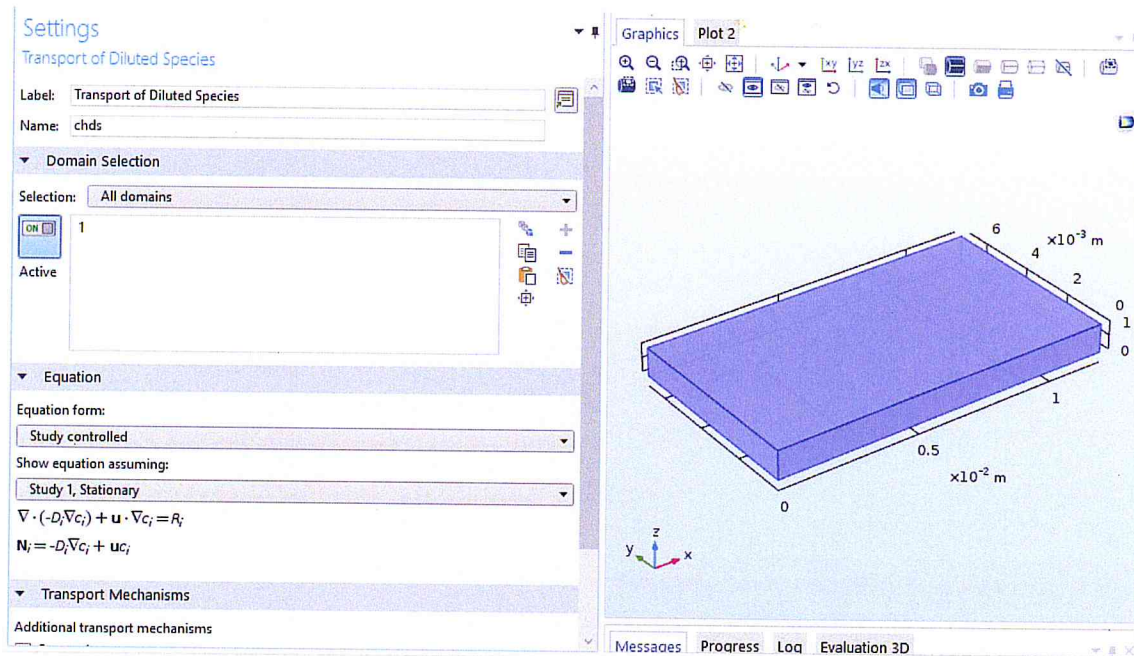


Figure 74 : La physique de transport d'espèces diluées.

4.2 Résultat et discussion :

Dans ce qui suit, on présente les résultats relatifs aux simulations en suivant le changement de température le long du microcanal, ainsi que l'évolution des concentrations des espèces au cours d'écoulement.

4.2.1 La température :

En remarque que la température augmente dans le microcanal de deux kelvin soit de 293.15 k à 294.96 k. cette augmentation est due au dégagement de chaleur causé par la réaction qui a eu lieu entre l'enzyme et le substrat au sein du microcanal.

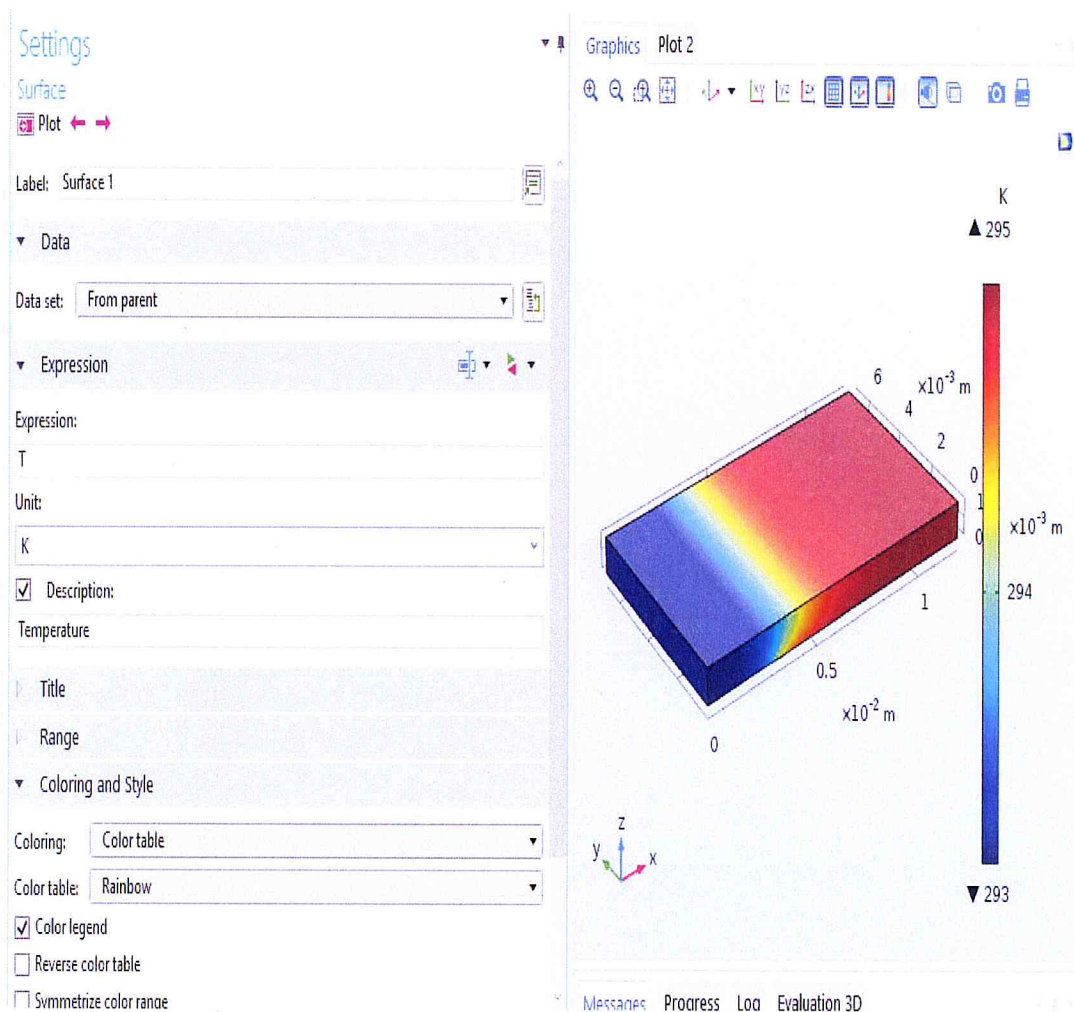


Figure 75 : La température due au dégagement de chaleur causé par la réaction enzyme-substrat.

4.2.2 Concentration des espèces

La figure 76, 77, 78, et 79 montrent les concentrations des espèces, A et B dans le flux. On remarque que la concentration de l'espèce B diminue dans le micro-canal. Cette diminution est justifiée par la réaction enzymatique entre les deux espèces A et B. par ailleurs, la concentration de l'espèce A reste presque stable au niveau de la surface fonctionnalisée.

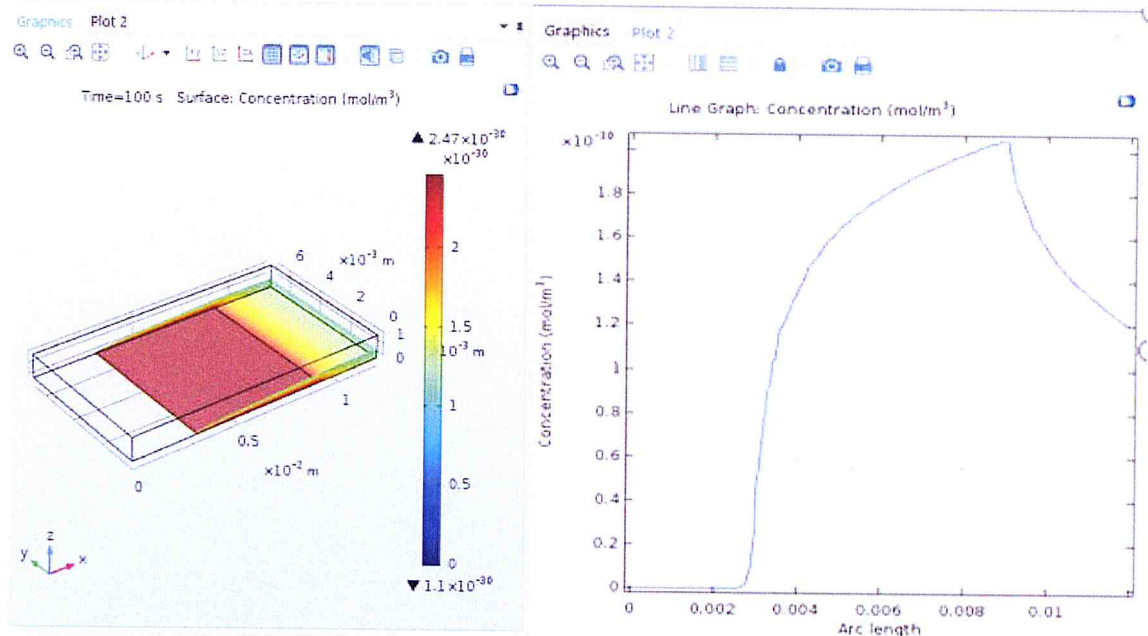


Figure 76 : concentration de l'espèce A à t=100s.

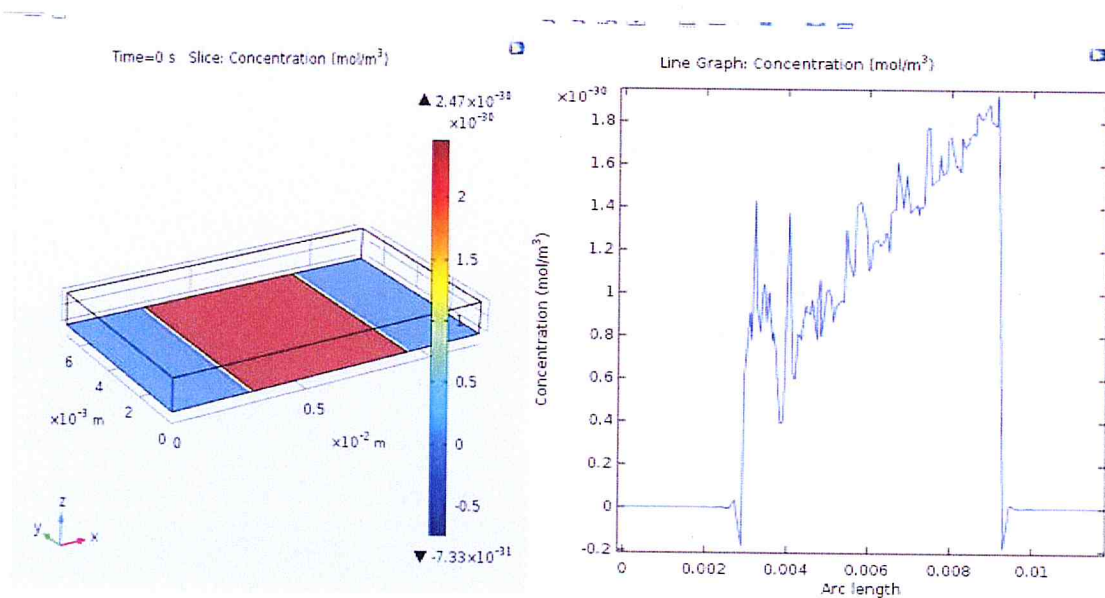


Figure 77: concentration de l'espèce A à t=0s.

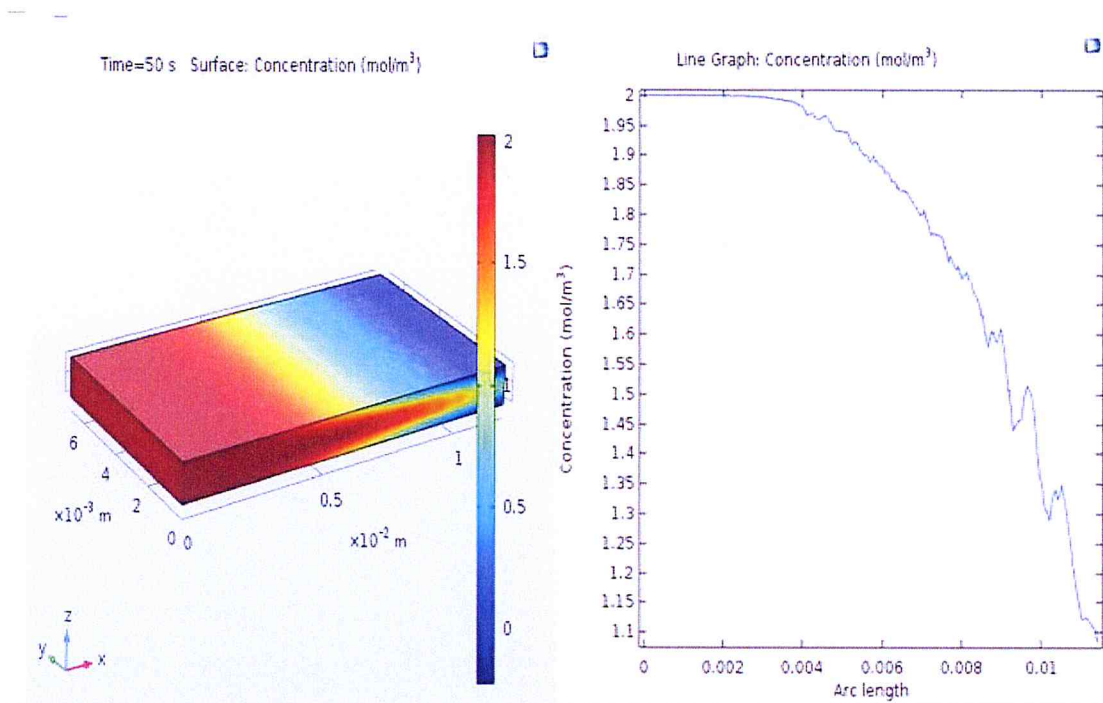


Figure 78 : concentration de l'espèce B à t=50s.

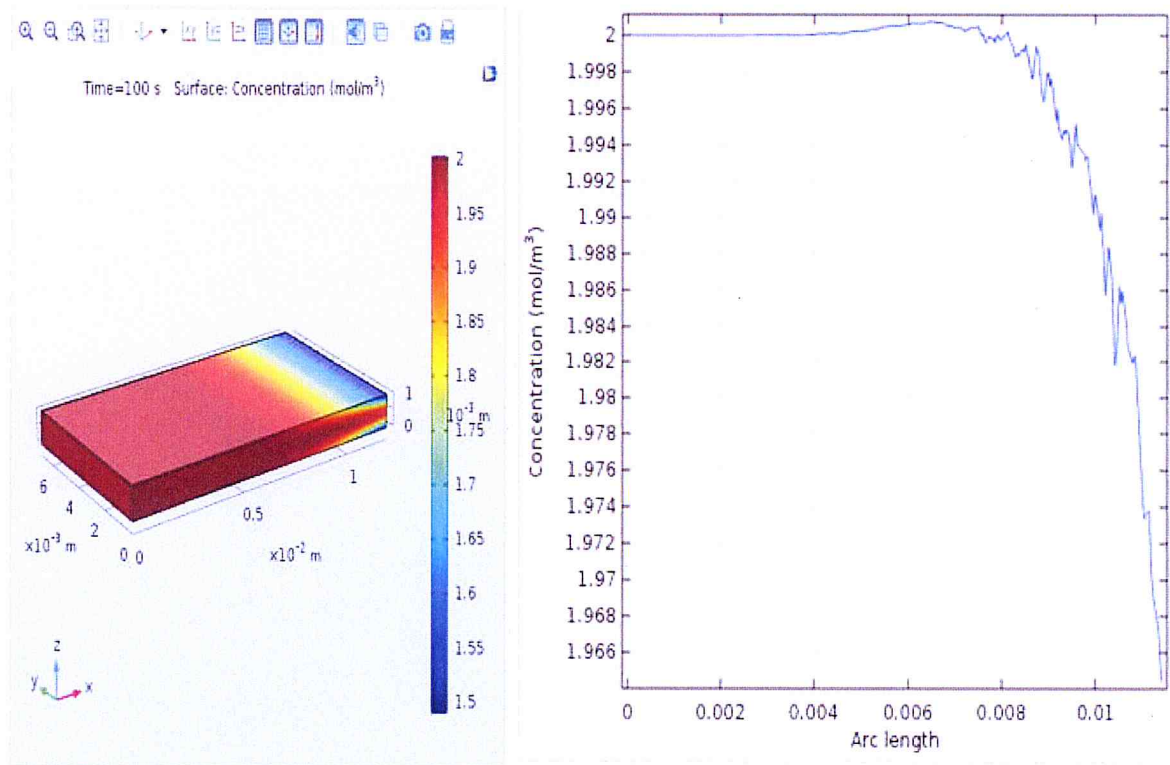


Figure 79 : concentration de l'espèce B à t=100s.

Conclusion Générale

Ce travail de master consiste à étudier le fonctionnement d'un biocapteur à base des enzymes fixées dans un microcanal dans le but de développer une application de biocapteur MEMS.

Tout d'abord, nous avons commencé par une étude bibliographique illustrant les progrès réalisés dans la *BIOMEMS* au cours des dernières décennies, touchant aussi bien la microfluidique que les biocapteurs, évoquant les différents types des biocapteurs.

Par la suite, nous avons procédé à une étude bibliographique sur le biocapteur à couche fonctionnalisées. Les définitions nécessaires à la compréhension de ce domaine et les mécanismes d'immobilisation.

Nous avons modélisé un biocapteur enzymatique et implanter ce modèle sur le logiciel de simulation numérique COMSOL *Multiphysics* basé sur la méthode des éléments finis. Plusieurs résultats de simulation ont été montrés et discutés.

Une analyse détaillée sur le dégagement thermique ainsi que l'élévation de la température causée par la réaction enzymatique ont été faites. Ceci en fonction de la concentration des différentes espèces chimiques dans le microcanal.

Ce travail devra être continué afin d'apporter plus de précision quant à la nature des réactions enzyme-substrat. Des études de cas précis devront être faites ainsi que l'identification des procédés d'immobilisation dans les polymères (PDMS) devront être identifiée précisément.

Références

- [1] Prime Faraday Partnership ;An Introduction to MEMS (Microelectromechanical Systems) ; Janvier 2002.
- [2] (Dong Qin·YounanXia·John A.Rogers· Rebecca J.Jackman Xiao-MeiZhao· George M. Whitesides); Microfabrication, Microstructures and Microsystem.
- [3] Hélène HORSIN MOLINARO ; MEMS : contexte et applications ; Olivier FRANÇAIS
- [4] Mohamed BELBEY et Youcef HAMOUDI modélisation, simulation a éléments finis et conception d'un microcapteur de pression dans les circuits microfluidique a base de PDMS composite C-PDMS ; juin 2017.
- [5] <https://www.tomshardware.fr/articles/MEMS,2-811-17.html>
- [6] Abdenmour Abbas ; Fabrication et Fonctionnalisation de *BIOMEMS* par Plasma Froid pour l'Analyse de la Biocatalyse en Spectroscopie TeraHertz .
- [7] Haytem JARRAR ; Bioélectrodes enzymatiques pour des applications en biocapteurs et en biopiles
- [8] Rendu d'étude Opticsvalley - Capteurs dans la surveillance des maladies chroniques
- [9] Hélène HORSIN, La microfluidique : principes physique et mise en œuvre d'écoulements continus- Olivier FRANÇAIS
- [10] Emeline Feltrin ; Surfaces PDMS structurées et/ ou décorées par des nanoparticules : vers des propriétés optique et de mouillage modulables
- [11] Satish Kumaran ; Immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs : Analyse par injection en flux continu (FIA) : Applications au dosage des composés polluants .
- [12] Alan CORVISIER ; Élaboration par pulvérisation magnétron réactive d'une couche thermochrome à base de dioxyde de vanadium- Application à la régulation passive de la température de panneaux solaires.
- [13] Colin Thierry Et Colin mathieu ; Modélisation et étude numérique de quelques écoulements de fluides complexes en micro-fluidique .
- [14] <http://public.iutenligne.net/mecanique/mecanique-des-fluides/courtin/pertes-de-charge-lineique/co/Pertes%20de%20charges%20lineiques.html>

- [15] Van Quang Dinh ; Vers une simulation par éléments finis en temps réel pour le génie électrique .
- [16] Vincent Manet ; Méthode des éléments finis -Vulgarisation des aspects mathématiques et illustration de la méthode .
- [17] Nasser *FEKIRI* ; Transferts de chaleur dans des éléments micro et nano structurés : Simulation et expérimentation par thermographie infrarouge et microscopie SThM - *MASTER MEPP*
- [18] Akira Yamaguchi , Peng Jin , Hiroshi Tsuchiyama,Takao Masuda,Kai Sun, Shigeki Matsuo , Hiro Rapid ;Fabrication of electrochemical enzyme sensor chip using polydimethylsiloxane microfluidicchannel .