



جامعة أبو بكر بلقايد - تلمسان

**Université Abou Bakr Belkaïd de Tlemcen**

**Faculté de Technologie**

**Département de Génie Biomédical**

**MEMOIRE DE PROJET DE FIN D'ETUDES**

Pour l'obtention du Diplôme de

**MASTER en GENIE BIOMEDICAL**

**Spécialité : Instrumentation Biomédical**

Présenté par: **ABBOUD Hind et BERRIAH Bochra**

---

## Conception d'un détecteur de bactéries

---

Présenté le 4 juillet 2019 devant les Jurys

Mr	R. BENALI	MCA	Université de Tlemcen	Président
Mme	N.H. BAAKEK	MCA	Université de Tlemcen	Examineur
Mme	A. BENSMAIN	MCA	Université de Tlemcen	ENCADREUR
Mr	S. SOULAIMANE	MCA	Université de Tlemcen	CO-ENCADREUR

Année universitaire 2018-2019

*A nos chers parents, A nos sœurs et frères*

# Remerciements

Nous exprimons en premier lieu nos sincères remerciements à Dieu le tout puissant, de nous avoir donné le courage, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Nos vifs remerciements et reconnaissances vont à Madame **Professeure SEKKAL SAMIRA** directrice du laboratoire Toxicomed pour nous avoir accueillies et avoir mis à notre disposition tous les moyens et matériels du laboratoire pour mener à bien notre travail.

Nous désirons exprimer notre très grande reconnaissance à nos Encadrants **Madame BENSMAIN-BENKHALED AMAL Maitre de conférence à la faculté des Sciences, Université de Tlemcen et Monsieur SOULIMANE SOFIAN Maitre de Conférences à la faculté de technologie, Université de Tlemcen** pour avoir bien voulu diriger ce travail, de nous avoir fait bénéficier de leurs expériences, et de nous avoir guidées avec patience, encouragées et aussi pour leurs grande qualité humaine.

Nous adressons nos sincères remerciements à Madame **N.H.BAAKEK** pour l'honneur qu'elle nous a fait d'avoir accepté de présider ce jury et Monsieur **R.BENALI** pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nos plus sincères remerciements à **Melle ZERAOULIA MANEL doctorante en microbiologie** pour sa précieuse aide dans la partie manipulation de la bactérie, sans elle cette partie aurait été un grand mystère et aussi pour sa qualité humaine.

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements à Madame **Professeur CHOUKCHOU BRAHAM ESMA Chef d'équipe de chimie au laboratoire Toxicomed** pour son soutien à la formation de ce master et d'avoir facilité la procuration des solvants et réactifs nécessaire pour la réalisation de ce travail.

Nous adressons un remerciement particulier à **Mlle GUENDOUZE SOUHILA Maitre Assistante au département de pharmacie, université de Tlemcen** d'avoir pu nous procurer le précieux « anticorps » sans elle le travail aurait été encore plus difficile.

Nous remercions l'ensemble des membres du laboratoire toxicomed pour leur accueil, en particulier l'ingénieur de laboratoire Mr **TALEB ZOHEIR** pour son aide et sa disponibilité dans une ambiance amicale et toujours encourageante.

Un grand remerciement pour le doctorant **SLAMIAHMED** pour son aide dans le désigne et l'impression du support par l'imprimant 3D.

Un grand merci pour **MR.METAHRI MOHAMMED EL HABIB** et le doctorant **CROMBA IBRAHIM** pour leurs aide et conseils dans la circuiterie.

Nous remercions **KAZZI HALIM** personnel du laboratoire d'histologie, pour son aide en microscopie optique.

Un grand merci pour les doctorants **BELKHODJA ABDELMADJID** et **GHERRAZ ZHOR** pour leurs aides et leurs présences.

Nous remercions **HOUSSEM, ABD ELRAHMAN** et **IBTISSEM** pour leurs aides et leurs présences.

Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

# **Dédicace**

*Au nom de dieu le tout puissant qui m'a donné la volonté et la patience et qui m'a mis sur le bon chemin pour arriver à ce jour-là.*

*A la mémoire de mes grands-parents BOUZID que dieu le protège, IMIROU LLAH, DJAMILA et HAFIZA que dieu les accueille dans son vaste paradis.*

*A mes chers parents MOHAMED et INDIRA : aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation, puisse Dieu, le très haut, vous accordez santé, bonheur et longue vie. Merci Papa, Merci Maman.*

*A mes chers frères AYOUB et CHAKIB.*

*A mes sœurs HAFIZA et LINA.*

*A toute les membres de mes familles ABBOUD, COUQUI et ma belle famille YESREF.*

*A mes amies : IMENE, RIHAB, ZINEB et RANIA ainsi à toutes mes amies.*

*A ma binôme : BOCHRA.*

*A tous les étudiants de la promotion Master 2 INB.*

*Un salut chaleureux, un énorme et grand merci à tous.*

*Hind*

# **Dédicace**

*Au nom de dieu le tout puissant qui m'a donné la volonté et la patience et qui m'a mis sur le bon chemin pour arriver à ce jour-là.*

*A la mémoire de mes grands-parents LAKHDER et FATIMA que dieu les protège, RABEH et FATNA que dieu les accueille dans son vaste paradis.*

*A mes chers parents MOHAMMED et HOURIA NACERA: aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation, puisse Dieu, le très haut, vous accordez santé, bonheur et longue vie. Merci Papa, Merci Maman.*

*A mon cher frère RACHID.*

*A mes sœurs KHADIDJA et FATIMA.*

*A toute les membres de mes familles BERRIAH et BOUAMMEUR.*

*A mes amies : YASMINE et FATIMA ainsi à toutes mes amies.*

*A ma binôme : HIND.*

*A tous les étudiants de la promotion Master 2 INB.*

*Un salut chaleureux, un énorme et grand merci à tous.*

**Bohra**

**Résumé :** L'objectif de ce projet est d'établir un détecteur électronique de bactéries, à partir d'un système optique, dans le cadre de la sécurité sanitaire et de l'environnement. Le diagnostic des bactéries dans le domaine médical et agroalimentaire se base sur la culture microbienne. Cette dernière nécessite plusieurs jours pour identifier l'agent pathogène avec un coût conséquent. Ces inconvénients majeurs ne sont pas en adéquation avec l'urgence de détecter rapidement la présence de bactéries pathogènes. Donc, nous pouvons noter un intérêt notable de développer de nouveaux outils pour identifier les bactéries pathogènes en un temps plus court à moindre coût. Dans ce travail, nous avons exploré une technique pour détecter une population de bactéries sur une durée de temps réduite. Ce biocapteur est basé sur la fonctionnalisation de surface en greffant un film monocouche par une réaction chimique qui adhère les couches, ensuite un élément biologique, dans le but d'avoir une réaction d'agglutination instantané, détectable en temps réel. Notre prototype se base sur une détection optique pour que cette information soit transformée en signal électrique.

**Mot clé :** détecteur de bactérie, biocapteur, fonctionnalisation de surface, film monocouche, élément biologique.

**Abstract :** The objective of this project is to establish an electronic bacterium detector through an optical system within the framework of health safety and the environment. The diagnosis of bacterium in the medical and agri-food field is based on microbial culture. The latter takes several days to identify the pathogen with a consequent cost, these major inconveniences are not in adequation with the urgency of detecting quickly the presence of pathogen bacterias, so we can note a notable interest in developing new tools to identify pathogen bacterias in a longer time runs at a lower cost. In this work we have explored a technique to detect a population of bacterium over a short period of time. This biosensor is based on surface functionalization by greffing a single-layer film by a chemical reaction that adheres the layers, then biological element in order to have an instant agglutination reaction, detectable in real time. Our prototype is based on an optical detection so that this information is transformed into an electrical signal.

**Key words:** bacterium detector, biosensor, surface functionalization, single-layer film, biological element

**ملخص:** الهدف من مذكرتنا هو إنشاء ملقط إلكتروني للبكتيريا من خلال نظام بصري في إطار الصحة والبيئة. تشخيص بالإضافة إلى تكاليف البكتيريا في الصناعة الطبية والزراعة الغذائية قائم على زراعة البكتيريا. يستغرق هذا الأخير عدة أيام مرتفعة لتحديد العامل الممرض، هذه السبلبات تعرق الحاجة الماسة لاكتشاف وجود البكتيريا في زمن قياسي مما يؤدي إلى متضاعفات غير مرغوب فيها.

من أجل هذه السبلبات استوحينا فكرة تقنية جديدة سريعة لاكتشاف تعداد البكتيريا. يعتمد هذا المستشعر الحيوي على تغيير خواص الطبقة السطحية من خلال توفير طبقة أحادية بواسطة تفاعل كيميائي يربط بين عدة طبقات، ثم تلحق هذه الطبقة بعوامل بيولوجية للحصول على رد فعل فعال للتراص، يمكن اكتشافه في الوقت الفعلي. ويستند النموذج الأولي على الكشف البصري بحيث يتم تحويل هذه المعلومات إلى إشارة كهربائية.

**الكلمات المفتاحية :** ملقط إلكتروني للبكتيريا، المستشعر الحيوي، تغيير خواص الطبقة السطحية، طبقة أحادية، عوامل بيولوجية

## Table des matières

Introduction générale .....	1
Chapitre 1. Etat de l'art. ....	3
I.1. Introduction .....	4
I.2. Détection des bactéries.....	4
I.2.1. Mode opératoire de préparation d'échantillon .....	5
I.2.2. Méthodes de détection .....	6
I.2.2.1. Spectroscopie de masse.....	6
I.2.2.2. La microbalance.....	6
I.2.2.3. Détection des bactéries par Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	6
I.2.2.4. Détection des bactéries par Imagerie par Résonance Plasmonique de Surface (SPRi).....	7
I.2.2.5. Coloration de gram et microscopie.....	7
I.3. Etat de surface .....	8
I.4. Conclusion.....	10
Chapitre 2. Fonctionnalisation de surfaces pour l'adhésion de la bactérie .....	4
II.1. Introduction.....	12
II.2. Analyse de surface .....	12
II.2.1. Le microscope à force atomique(AFM) .....	12
II.2.2. Mesure d'angle de contact .....	13
II.2.3. L'appareil de mesure d'angle de contact (goniometre ).....	14
II.2.4. Les modèles de mesure de l'énergie de surface .....	15
II.2.4.1. modèle de Zisman .....	15
II.2.4.2. Modèle de Wu .....	15
II.2.2.3. Modèle de Fowkes .....	16
II.2.2.4. Théorie de Van Oss .....	16
II.2.2.5. Modèle d'Owens Wendt.....	16
II.3. Mesure de l'énergie surface .....	17
II.3.1. Préparation de surface .....	17
II.3.1.1. Mode opératoire de choix de surface.....	17
II.3.1.2. Résultat du choix de surface.....	19
II.3.2. Greffage chimique de lames de verre .....	20

II.3.2.1. Matériels et produits .....	20
II.3.2.2 Mise en évidence du greffage chimique .....	22
II.3.3. Greffage de l'anticorps .....	23
II.4. Conclusion .....	26
Chapitre 3. Prototypage du détecteur de bactérie .....	27
III.1. Introduction .....	28
III.2. Protocole de manipulation.....	28
III.2.1. Caractérisation de la bactérie.....	29
III.2.1.1. Etat frais (in vivo).....	29
III.2.1.2. Coloration de Gram.....	30
III.2.2. Objectif du travail .....	32
III.2.3. Mise en oeuvre .....	32
III. 3. Montage électrique pour la détection de la bactérie .....	33
III.3.1. Tests du détecteur de bactérie .....	37
III.3.1. Tests du capteur .....	38
II.4. Conclusion .....	39
Conclusion générale .....	40
Bibliographie .....	42
Annexe1.....	
Annexe2.....	





## Liste des figures

**Fig.I.1.** Le milieu sélectif (Gélose de Chapman).

**Fig.I.2.** Le milieu non sélectif.

**Fig.I.3.** Stratégie de détection des bactéries sur un support miniaturisé (puce), avec des ligands immobilisés, spécifique ou non pour une population bactérienne donnée.

**Fig.I.4.** Composition schématique de la membrane bactérienne expliquant le résultat de la coloration de Gram. **A** : Les bactéries Gram+, ont une paroi épaisse, riche en peptidoglycane. **B** : Les bactéries Gram- ont une fine couche de peptidoglycane comprise entre la membrane externe et la membrane plasmique. **C** : Principales morphologies des bactéries. Images issues du livre de Sadava *eta*

**Fig.I.5.** Schéma d'un modèle de substrat greffé sur une surface.

**Fig.I.6.** Réaction de silanisation d'un alcoxysilane avec les silanols de surface.

**Fig.I.7.** schéma explicatif de greffage chimique et biologique.

**Fig.II.1.** Microscope à force atomique AFM.

**Fig.II.2.** Principe de la mesure de l'angle de contact.

**Fig.II.3.** L'angle de contact et la mouillabilité des solvants. (a) Surface hydrophobe, (b) Surface hydrophile.

**Fig.II.4.** Un goniomètre/ BENCHTOP TVA100.

**Fig.II.5.** Montage de l'appareillage de mesure de l'angle de contact conçu au laboratoire.

**Fig.II.6.** Image de la goutte déposée sur la surface pour la prise mesure de l'angle de contact.

**Fig.II.7.** Comparaison entre les énergies de surface des différentes surfaces.

**Fig.II.8.** la formule développée de l'APTS.

**Fig.II.9.** Le matériel de greffage

**Fig.II.10.** La réaction d'adhésion du film moléculaire à la surface verre.

**Fig.II.11.** Microscope optique (ZEISS).

**Fig.II.12.** Pied à coulisse.

**Fig.II.13.** Visualisation des lames greffées sous microscope optique.

(a) lame de référence, (b) APTS de  $C=0.1M$ , 1h de greffage,

(c) APTS  $C=0.043M$ , 2h de greffage, (d) APTS de  $C=0.043M$ , 4h de greffage

**Fig.II.14.** La réaction d'adhésion entre l'APTS et l'anticorps (formation de liaison peptidiques).

**Fig.III.1.** Photo d'une boîte de pétrie de la souche de référence de la bactérie *S.aureus*.

**Fig.III.2.** croissance sur milieu liquide.

**Fig.III.3.** croissance sur milieu solide.

**Fig.III.4.** Photo in-vivo sous microscope optique du *S.aureus*.

**Fig.III.5.** La visualisation sous microscope de les bactéries après coloration, tel que (a) bactérie à Gram positif, et (b) bactérie à Gram négatif.

**Fig.III.6.** La coloration de Gram du *Staphylococcus aureus* ( $0.5\text{à}1.5\mu\text{m} \times 100$ ).

**Fig.III.7.** Schéma explicatif des réactions qui permettent la détection de *S.aureus*.

**Fig. III.8.** Circuit électronique pour le fonctionnement de capteur.

**Fig.III.9.** Schéma du capteur de bactérie.

**Fig.III.10.** Le programme Arduino du capteur.

**Fig.III.11.** Le montage du détecteur de bactérie.

## Liste des tableaux

- Tableau.II.1.** Les solvants utilisés dans la mesure des énergies de surface.
- Tableau.II.2.** Les données de l'équation (4) du modèle Owens-Wendt.
- Tableau.II.3.** Les énergies de surface calculées pour la différente surface.
- Tableau.II.4.** La présentation de produit de greffage APTS.
- Tableau.II.5.** Energies de surface des différentes lames (lame 19 jusqu'à lame 34) du protocole5.
- Tableau.II.6.** Les données du modèle d'Owens-Wendt.
- Tableau.II.7.** Les énergies des trois blocs selon l'état de la lame.
- Tableau.III.1.** La présentation des composants du capteur de bactérie.
- Tableau.III.2.** Le test de capteur TCS230.
- Tableau III.3.** Le rapport de variation de signal entre les différentes surfaces.
- Tableau. III.4.** Le test de capteur TCS230 pour la détection de la bactérie.
- Tableau. III.5.** Le test de capteur TCS230 pour la détection de la bactérie.

## Liste des abréviations

QCM : Quartz Crystal Microbalance

EQCM : Electrochemical Quartz Crystal Microbalance

PCR : Polymerase Chain Reaction

ADN Acide Désoxyribo Nucléique

SPRi : Imagerie par Résonance Plasmonique de Surface

APTS : 3- Aminopropyltriéthoxysilane

AFM Microscope à Force Atomique

PDMS : polydiméthylsiloxane

US : ultrason

*S.aureus* : *Staphylococcus aureus*

ATCC : American Type Culture Collection

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

# **Introduction générale**

## Introduction générale

La sécurité sanitaire et l'hygiène sont des soucis primordiaux pour le domaine sanitaire. Les organisations de la santé soulignent l'importance de les identifier le plutôt possible pour commencer un traitement convenable. La détection des bactéries a ouvert un nouveau domaine de compétence entre les entreprises, les laboratoires de recherches et les scientifiques pour la conception de système de détection fiable, rapide et précis. Plusieurs méthodes d'identification et de détection de ces micro-organismes existent et évoluent avec un développement technologique continu. Ces détections sont passées par plusieurs stades, en commençant par des simples réactions chimiques mais lentes tel que la coloration de gram qui nécessite une culture bactérienne jeune. Les chercheurs ont pu créer des machines lourdes pour capter des bactéries qui ont facilité la détection, mais en même temps, il faut déplacer l'échantillon jusqu'à l'appareil sans oublier les quantités importantes de réactifs à consommer.

Le progrès de la technologie nous amène à la miniaturisation de tout système ; d'où l'apparition des biocapteurs. Ces derniers sont des détecteurs basés sur des éléments, sensibles, actifs biologiquement, et d'une partie électronique. Leur principe de fonctionnement est simple, c'est le fait que l'espèce biologique interagit avec le substrat à analyser, cette réaction sera traduit en un phénomène électrique par l'un des différents types de transduction. A partir de ce type d'innovation, nous avons extrait l'idée de notre projet. Nous avons développé un détecteur électronique de bactérie, où la détection est basée sur le phénomène optique. Notre système de détection englobe plusieurs territoires passant par la chimie, la microbiologie et finalement l'instrumentation.

Notre travail est divisés en trois chapitres détaillés comme suit ;

Dans le premier chapitre, nous citerons des généralités sur les bactéries, leurs tailles et leurs formes, ainsi qu'un état de l'art sur les différentes méthodes de détection de ces dernières. Par la suite, nous allons décrire l'état de la surface et les modifications qui peuvent être effectués pour réaliser une adhésion de la bactérie.

Le deuxième chapitre décrit le choix de la surface, la description du principe de sa fonctionnalisation, la méthodologie utilisée pour l'analyse de cette dernière à l'aide de la mesure de l'angle de contact. Puis, les résultats de greffage du film moléculaire et l'anticorps seront discutés.

Le dernier chapitre est divisé en deux parties, où la première consiste à présenter et la mise en place de la bactérie choisie pour la détection. Dans la deuxième partie seront présentés le montage du circuit électrique de notre système avec les différents composants suivi par les tests effectués par le capteur optique pour la détection de la bactérie.

Le rapport est accompagné d'une Annexe comportant tous les protocoles détaillés de modifications de surfaces ainsi que la partie bactériologique.

Une conclusion générale résumant l'ensemble du travail ainsi que les perspectives envisageables dans ce domaine sont présentés à la fin de ce manuscrit.

# **Chapitre I : Etat de l'art**

## I.1. Introduction

Nous vivons en contact permanent avec des micro-organismes ou microbe qui sont des organismes vivants microscopiques, invisibles à l'œil nu. Parmi ces micro-organismes, nous pouvons distinguer deux classes, une pathogène et non pathogènes. Les pathogènes affectent le corps humains et causent des maladies infectieuses (virus, bactérie, protozoaire, etc.). Dans ce travail, nous nous focalisons sur un type de bactérie pathogène. Les bactéries sont des organismes vivants microscopiques et procaryotes. Elles se trouvent partout et s'adaptent avec les conditions de l'environnement. Ces microorganismes ne vivent pas individuellement, mais en communauté complexe [1]. La taille des bactéries varie entre 0,2  $\mu\text{m}$  et 2  $\mu\text{m}$  mais au début du 21<sup>ème</sup> siècle, ils ont découvert la présence des ultramicrobactéries, y compris en eau douce [2-3]. Les bactéries présentent une grande diversité de tailles et de formes. Les cellules bactériennes typiques ont une taille comprise entre 0,5 et 5  $\mu\text{m}$  de longueur, cependant, quelques espèces comme *Thiomargarita namibiensis* et *Epulopiscium fishelsoni* peuvent mesurer jusqu'à 500  $\mu\text{m}$  (0,5 mm) de long et être visibles à l'œil nu [4-5]. Parmi les plus petites bactéries, les mycoplasmes mesurent 0,3  $\mu\text{m}$ , soit une taille comparable à certains gros virus [6]. Elles se présentent sous différentes formes : sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées. Il existe d'environ 10 000 espèces connus à ce jour. [7-8]. La détection de ces bactéries dépend de ces paramètres géométriques et de leurs affinité avec le milieu environnant. Plusieurs méthodes existent permettant de détecter soit visuellement, chimiquement, électriquement ces organismes. Ainsi, dans la partie qui suit, nous allons citer les plus fréquemment utilisées dans la détection de bactéries.

## I.2. Détection des bactéries

Dans de nombreux domaines (médicale, sécurité, alimentation, environnementale...), la détection des bactéries est très importante et elle est utilisée depuis centaines d'années, par des méthodes qui nécessitent des heures pour l'identification. Alors que, ce délai de quelques heures doit être réduit en quelques minutes avec un coup réduit des dispositifs. Tout d'abord, nous allons faire un rappel sur les méthodes pour la détection des bactéries, puis nous introduirons les technologies de laquelle nous s'est inspiré. Il existe des méthodes utilisées pour la détection et l'identification des bactéries qui reposent sur l'identification microbiologique et biochimique. Elles nécessitent un pré-enrichissement préalable des échantillons avant de passer à l'étape de l'analyse (étape essentielle pour détecter les agents pathogènes en faible nombre et permet de ces agents de ce multiplier en abondance pour qu'ils deviennent facilement détectables par la suite); nous parlons alors de l'hémoculture. La contrainte majeure dans la détection des bactéries est leur faible nombre dans le sang. Chez un adulte, cette charge bactérienne du sang ramènent quelque bactérie par millilitre [9-10] et c'est la raison pour laquelle aucune méthode n'est suffisamment sensible et capable de bien détecter l'existence des microorganismes. En cas de suspicion de bactériémie (bactérie dans le sang), un prélèvement sanguin de 20 à 30 millilitre sera effectué par suite un volume de 8 à 10 millilitre doivent être introduits dans chaque bouteille, mais ce remplissage est fréquent (quatre prélèvement de 20 millilitre repartie chacun dans deux bouteilles) pour détecter de plus de 99% des pathogènes décelable par hémoculture. Une fois les bouteilles sont remplies, elles seront incubées à 35°C dans des automates de culture, l'activité respiratoire des microorganismes est la base de détection de leur présence. L'incubation est rarement prolongée au-delà de cinq jours, sauf en cas de suspicion de bactérie à croissance lente.

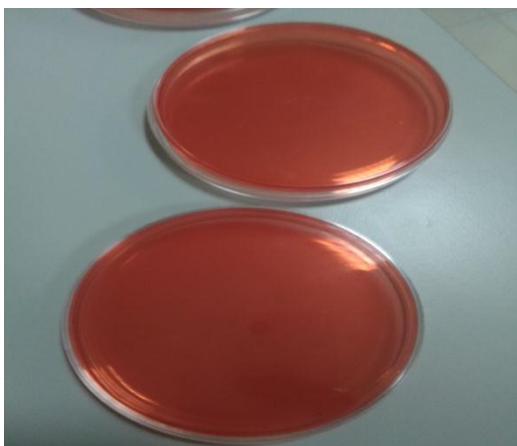
L'identification repose toujours sur les techniques microscopiques classiques, malgré l'émergence des techniques moléculaires ; une simple modification a été introduite afin de les automatiser [11-12].



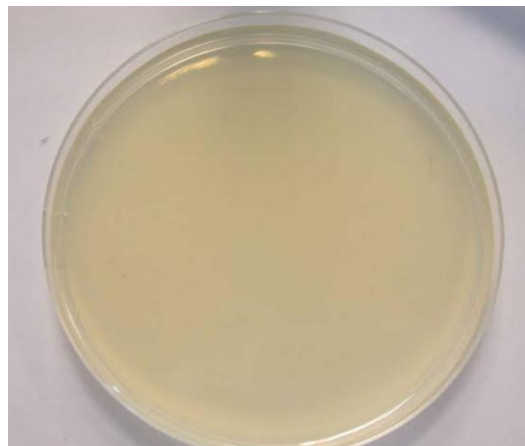
Avant de proposer une classification de ces méthodes de détections, nous détaillerons les modes opératoires de préparation de la surface à analyser.

### I.2.1. Mode opératoire de préparation d'échantillon

Une partie de l'échantillon contenant la bactérie est étalée sur différents milieux solides sélectifs (voir Fig.I.1) ou non (voir Fig.I.2), dans le but d'obtenir des colonies isolées qui seront utilisées par la suite pour terminer l'identification, cette phase prend de 12 à 24 heures pendant lesquelles les géloses sont incubées à 35°C [13]. Cette phase permet d'obtenir une indication supplémentaire sur la nature de germe isolé. Pour réduire le temps de l'identification et l'antibiogramme, il est recommandé d'étaler une partie de l'échantillon sur des géloses sélectives dont le choix repose sur l'orientation de la coloration à gram.



**Fig.I.1.** Le milieu sélectif (Gélose de Chapman).



**Fig.I.2.** Le milieu non sélectif.

L'identification repose sur les caractéristiques biochimiques des bactéries. Son principe est celui des galeries API, dont le fonctionnement, la lecture et l'interprétation des résultats ont été au nombre de trois : Vitek® 2 (bioMérieux), BD Phoenix (Becton Dickinson) et Micro-Scan WalkAway® (Beckman Coulter, Brea, États-Unis). Ces automates permettent l'identification spécifique au niveau du genre et de l'espèce de la plupart des isolats cliniques et disposent de plusieurs cartes d'identifications utilisées selon le résultat de coloration. Ces cartes sont composées de 40 puits réactionnels, et aussi des substrats fluorescents séchés résolubilisés par l'inoculum. Ainsi, la lecture optique de la carte permet d'interpréter les éventuels changements dans les puits. Cette analyse conduit à l'identification des microorganismes en quelques heures [13]. Ces différentes méthodes utilisées pour la détection des bactéries ont beaucoup d'inconvénients y compris le temps d'exploration et du traitement ainsi que les réactifs. Elles peuvent aboutir à certaines erreurs par les manipulateurs. À cause de ces inconvénients, des nouvelles méthodes sont exploitées et plus utilisées pour cette détection des bactéries, ce qui va être étalé dans la partie suivante. Dans ce qui suit, nous mettons en relief une étude bibliographique recensant les principales technologies pour la détection de bactéries, et plus particulièrement les enjeux des biopuces et biocapteurs.

## **I.2.2.Méthodes de détection**

Il existe plusieurs types de méthodes de détection de culture bactériens. Certaines méthodes sont associées à des techniques spectroscopiques, de la pesée de la croissance bactérienne, réactif, par imagerie soit par résonance ou par visualisation colorimétrique.

### **I.2.2.1.Spectroscopie de masse**

Au début, elle a été introduite comme une technique complémentaire. Après, elle a été utilisée pour l'identification. C'est une technique physique d'analyse extrêmement sensible, permet de détecter et d'identifier des molécules de taille différentes. Elle se compose de quatre parties : Un système d'introduction, chambre d'ionisation, l'analyseur qui permet de séparer les ions en fonction du rapport (masse / charge), et la dernière partie ; le détecteur. L'analyse requiert une colonie isolée, à partir de laquelle le spectre de masse obtenu est comparé avec la bibliothèque de spectres de l'appareil. Une identification est alors proposée avec une indication du niveau de confiance allant de 0 à 3 [13].

Ce test consiste à détecter et d'identifier les échantillons moléculaires, molécule par molécule, ce qui prend du temps selon la composition de ce dernier. C'est une technique coûteuse et lourde, pour cela, elle est utilisable qu'au niveau des laboratoires.

### **I.2.2.2.La microbalance**

C'est une technique qui permet de détecter des masses de l'ordre du nano gramme par centimètre carré grâce à sa sensibilité, elle permet aussi de la mesure de variations de masse en milieu liquide pour suivre des réactions biochimiques. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un résonateur à quartz : QCM (Quartz Crystal Microbalance), elle est utilisée depuis longtemps pour suivre le dépôt sous vide de couches fines en microélectronique ou en optique en insérant un résonateur à quartz dans la chambre d'évaporation.

Dans ces conditions où le facteur de qualité reste très élevé et les masses déposées sur les électrodes relativement faibles (typiquement dépôts de couches de métaux de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur), la proportionnalité entre masse et variation de fréquence reste valable.

Alors que, l'analyse d'une réaction biologique ou biochimique au moyen d'une microbalance à quartz est une réaction souvent longue et relativement complexe. Une application beaucoup plus simple à mettre en œuvre est la mesure de masse déposée sur une électrode au cours d'une réaction d'électrochimie en utilisant un montage d'EQCM (Electrochemical Quartz Crystal Microbalance) qui permet de comparer les estimations de masse déposée d'après la mesure du courant circulant entre l'électrode de travail. Ce dernier, est aussi une des électrodes permettant l'oscillation du résonateur à quartz et la contre électrode [14].

### **I.2.2.3.Détection des bactéries par Polymerase Chain Reaction(PCR)**

C'est une technique qualitative et quantitative de réplification ciblée in-vitro, permettant d'obtenir à partir d'un échantillon peu abondant une quantité d'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique) spécifique de longueur d'onde définie. De manière pratique, les réactifs nécessaires pour réaliser la PCR sont : l'ADN à amplifier, les deux amorces oligonucléotidiques encadrant la région à amplifier, les quatre désoxynucléotides triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en large excès molaire et son principe consiste à réaliser une succession de réplification d'une matrice double brin d'ADN, lors de la réplification. L'ADN POLYMERASE ne peut pas démarrer sans amorce. La séquence cible représente le segment d'ADN qui sera amplifié c'est-à-

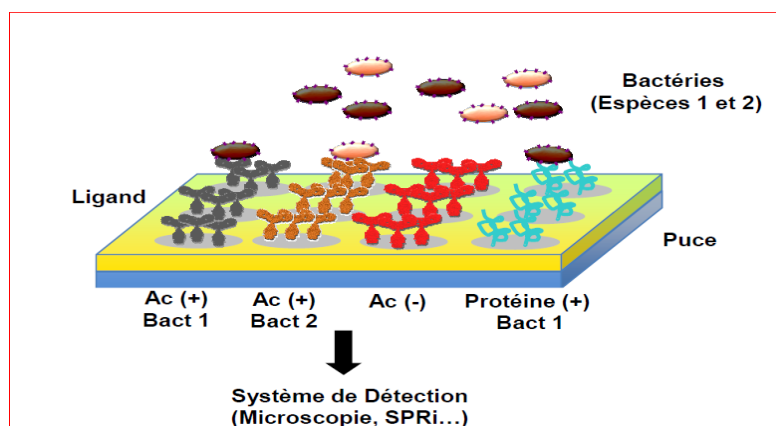
dire répliquer un grand nombre de fois et détermine lors du choix du couple d'amorces. Donc, la technique amplifie sélectivement le segment choisi. la PCR multiplexe en temps réel. L'ADN bactérien est alors amplifié en présence de sondes spécifiques.

Le suivi des courbes de fusion lors des cycles successifs permet d'identifier la séquence amplifiée. Ces tests peuvent être dédiés à l'identification d'un seul pathogène possédant une spécificité et une sensibilité équivalente aux méthodes phénotypiques. Ces tests réduisent le temps nécessaire à l'identification après l'hémoculture [15]. D'autres permettent la détection de la majorité des pathogènes retrouvés dans les hémocultures. Cette technique consiste à amplifier les acides nucléaires pour un diagnostic rapide, avec une culture difficile presque impossible. A noter également, qu'elle a des limites pour les analyses en consommant trop de produits et réactifs donc elle est coûteuse.

#### I.2.2.4. Détection des bactéries par Imagerie par Résonance Plasmonique de Surface (SPRi)

La SPRi (Imagerie par Résonance Plasmonique de Surface) est une technique qui repose sur la reconnaissance des bactéries par des ligands (molécules sondes) immobilisés sur un support miniaturisé, ces ligands lient des récepteurs (cibles), avec une certaine affinité et de manière spécifique, des molécules interagissant de façon spécifique avec la surface bactérienne, mais encore, des anticorps dirigés contre des motifs externes de la bactérie, pouvant ainsi se lier aux bactéries si elles sont présentes dans le milieu.

Le suivi de l'interaction entre le ligand et la bactérie, requiert un support et fait appel à une chimie de surface adéquate pour immobiliser les sondes, dont le choix dépend de la méthode de détection.



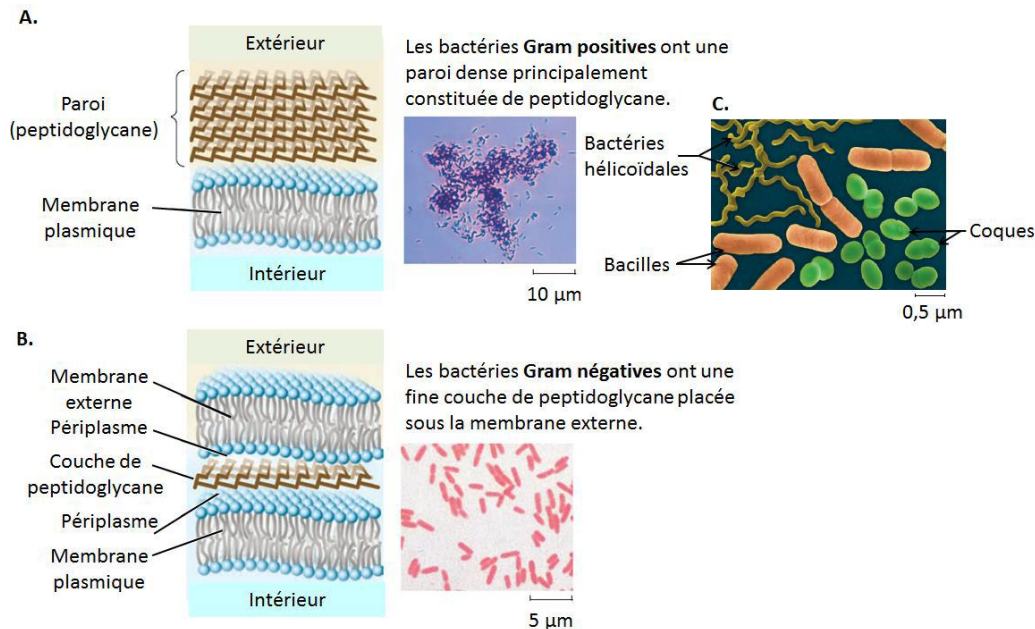
**Fig.I.3.** Stratégie de détection des bactéries sur un support miniaturisé (puce), avec des ligands immobilisés, spécifique ou non pour une population bactérienne donnée.

Un schéma simplifié de la stratégie adoptée pour la détection spécifique des bactéries sur un système miniaturisé (puce) [16]. Cette technique a comme principale avantage, le temps de détection qui est court ainsi son prix qu'on va jouer à le réduire (voir Fig.I.3).

#### I.2.2.5. Coloration de gram et microscopie

La détection de la présence de bactérie dans une bouteille d'hémoculture, implique qu'on soumet une partie de cet échantillon à une coloration de gram avec une observation microscopique [17]. Cet examen repose sur l'épaisseur de la paroi et ces différents composition, de sorte que ; certains parois maintiennent une couleur alors que d'autres non. On utilise un colorant (violet de gentiane) [13] sur une période, lors du rinçage avec l'alcool ; les bactéries gram<sup>+</sup> ont une paroi épaisse qui conservent la couleur (violet), alors que les bactéries

gram- avec paroi pauvre en peptidoglycane sont perméable à l'alcool et décolorées. Ces dernières se colorent par suite par une nouvelle coloration à la fuscine ou à la safranine (rose) [13]. Ce test permet de confirmer la présence de bactéries.



**Fig.I.4.** Composition schématique de la membrane bactérienne expliquant le résultat de la coloration de Gram. **A** : Les bactéries Gram+, ont une paroi épaisse, riche en peptidoglycane. **B** : Les bactéries Gram- ont une fine couche de peptidoglycane comprise entre la membrane externe et la membrane plasmique. **C** : Principales morphologies des bactéries. Images issues du livre de Sadava *etal*[18].

La figure montre la composition de la membrane bactérienne (voir Fig.I.4) montrant une coloration sous microscope optique la coloration de Gram [14]. On s'est inspiré de cette méthode pour réaliser notre capteur de bactérie, on visant à automatiser le système par l'usage de la transduction optique qui consiste à transformer l'évènement de reconnaissance biologique sous forme d'une grandeur optique (variation d'indice de réfraction, d'absorbance, de fluorescence, de luminescence...).

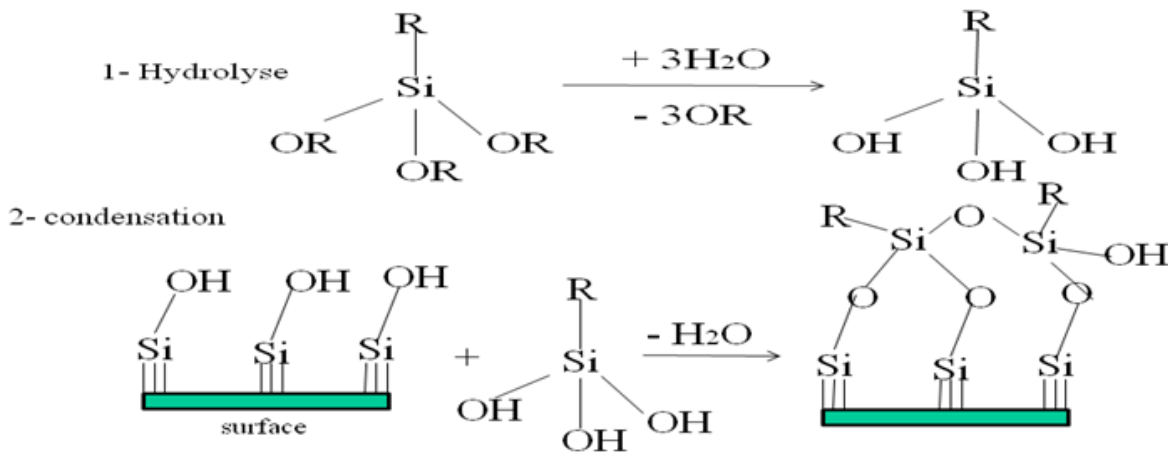
Cette transduction autorise des mesures in-situ et en temps réel, leur insensibilité aux interférences électromagnétiques et leur bonne sensibilité de détection. En effet, elle nous donne une excellente technique de détection bien qu'elle soit difficile dans son intégration complète sur une puce miniaturisée [17]. Ainsi, qu'on a besoin des surfaces pour les fonctionnaliser dans le but de réaliser un greffage covalent entre ces dernières et l'anticorps.

### I.3. Etat de surface

La fonctionnalisation de surfaces par des films minces organiques est absolument essentielle dans de nombreuses applications. Les technologies de fonctionnalisation de surface se répartissent en trois grandes familles :

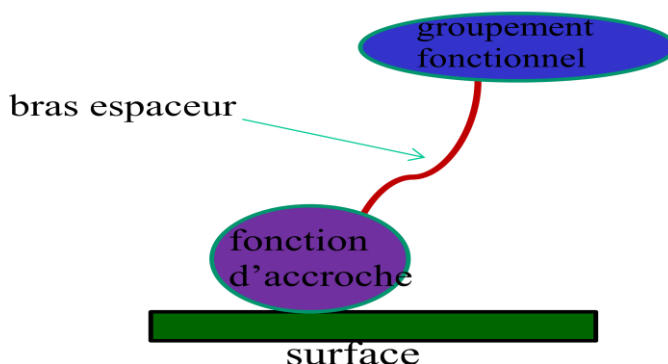
- Fonctionnalisation par voie liquide qui peut se faire par traitement chimique, procédés électrolytiques en milieux aqueux ou en liquides ioniques, électrophorèse, dépôts électrochimiques composites, sol-gel.
- Fonctionnalisation par voie sèche comme par Plasma, par évaporation, ou l'utilisation de rayonnements ionisants.
- Micro-nano structuration de surface par voie physique qui consiste en la texturation et structuration à différentes échelles par laser, grenailage, Skin-Pass, etc.

Ces deux dernières voies s'avèrent coûteuses, en exigeant du matériel spécifique. En revanche, la fonctionnalisation par voie chimique (liquide) reste réalisable au niveau laboratoire en se basant sur des connaissances fondamentales sur le type de surface à modifier qu'elle soit métallique comme l'or ou sur de la silice comme le verre. Plusieurs méthodes de greffages covalents de molécules organiques sur des surfaces subsistent. Le mode de greffage et les molécules choisies dépendent à la fois des contraintes du substrat et des propriétés souhaitées. Les molécules permettant de former une couche organique sont classiquement composées de trois parties : une fonction d'accroche, un espaceur et un groupement fonctionnel (Fig.I.5).



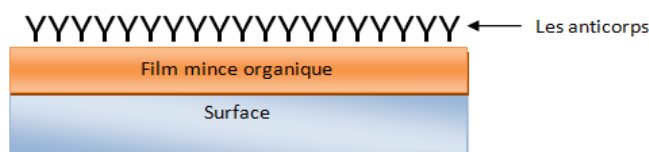
**Fig.I.5.** Schéma d'un modèle de substrat greffé sur une surface.

Dans le dispositif de fonctionnalisation de surface par un substrat le choix du groupement fonctionnel doit être judicieusement choisi afin d'obtenir des interactions entre les bactéries cibles et le matériau représentant la sonde. Et la fonction d'accroche doit également répondre à des propriétés permettant l'adhésion à la surface. Parmi les méthodes les plus utilisées, nous pouvons citer la silanisation (voir Fig.I.6) qui est une réaction de fonctionnalisation par des molécules organiques très exploitée et utilisée pour de nombreuses applications [19-20]. C'est une technique importante pour la fabrication de dispositifs dans le domaine des capteurs [21], et aussi pour la modification de la surface du verre [22-23].



**Fig.I.6.** Réaction de silanisation d'un alkoxy silane avec les silanols de surface.

Les silanes sont principalement greffés sur l'oxyde de silicium ou sur du verre, mais peuvent être utilisés pour la fonctionnalisation de toute surface hydroxylée présentant des groupements  $-OH$ , telle que le mica [23], l'alcool polyvinylique [24], l'oxyde d'aluminium [24], quartz [25]. Lors d'une silanisation, la première étape consiste en l'hydrolyse du silane en silanol, en silanediol ou en silanetriol. Puis lors d'une étape de condensation, les silanols, -diols ou -triols réagissent avec les fonctions silanols de surface pour former des ponts siloxanes  $Si-O-Si$  comme le montre la figure ci-dessous (voir Fig.I.6) [26-27].



**Fig.I.7.** schéma explicatif de greffage chimique et biologique.

Après cette étape, nous passons au greffage des anticorps (voir Fig.I.7) qui vont réagir par suite avec la bactérie (réaction immunologique) ; c'est la base de notre détection bactérienne en utilisant un système optique électronique de reconnaissance.

## I.4. Conclusion

Ce chapitre est un état de l'art sur les microorganismes plus précisément les bactéries. Dans lequel, nous avons présenté les conditions nécessaires pour leur culture avant d'énumérer les différentes méthodes de la détection des bactéries. Pour un control optimisé de la culture bactérienne, nous avons énumérer les différentes méthodes de la fonctionnalisation de surface. Sachant que dans notre travail, la fonctionnalisation en milieu liquide est celle a été retenue pour des raisons de moyens matériels et de cout. Nous avons décrit par la suite les méthodes de greffages covalents de molécules organiques sur des surfaces à base de fonction silane. Ce type de surface est compatible avec les anticorps en générale qui sont des fonctions réceptrice des bactéries. Dans le chapitre suivant, nous allons détailler le protocole utilisé de fonctionnalisation de la surface et leur caractérisation en fonction du protocole et l'étape de fonctionnalisation de surface.

## **Chapitre II. Fonctionnalisation de surfaces pour l'adhésion de la bactérie**

## II.1. Introduction

Dans ce chapitre, nous allons décrire la première partie de la réalisation du détecteur de bactéries.

La conception de ce capteur se base sur la fonctionnalisation chimique d'une surface, qui sera par la suite la base d'accrochage de l'anticorps pour effectuer le contact avec la bactérie cible.

La fonctionnalisation de surface désigne l'optimisation ou l'ajout de propriétés à la surface d'un matériau dans le but d'améliorer ses performances ou lui conférer de nouvelles fonctionnalités (adhérence, accroche mécanique...).

La fonctionnalisation de surface peut être applicable à travers différents moyens :

- Par l'utilisation d'un revêtement (films)
- Par réactivité chimique (greffage de molécules aux propriétés spécifiques)
- Par nano structuration

L'objectif de cette technique est de rendre le matériau le plus compatible possible avec son futur environnement et son application. Aussi, la complexité de l'étude réside dans la mise en évidence du greffage. La fonctionnalisation de surfaces a été utilisée sur plusieurs types de matériaux : polymères, métaux et verres.

Les performances et la durabilité des produits sont conditionnés par la maîtrise des procédés de fonctionnalisation de surface. Celle-ci requiert des connaissances, un savoir-faire et des outils analytiques précis qu'un laboratoire externe pourra nous apporter.

Une lecture préalable de la nature hydrophile/hydrophobe de la surface choisie est primordiale à fin de mettre en évidence la modification apportée à cette dernière. La technique choisie pour comparer les surfaces avant et après greffage chimique est la mesure de l'angle de contact.

## II.2. Analyse de surface

Nous allons utiliser plusieurs supports ; en verre, en  $\text{SiO}_2$ , en OR et en PDMS, après nous avons fonctionnalisé cette surface par le produit 3- Aminopropyltriéthoxysilane (APTS) pour avoir une fonction Amino compatible avec les anticorps. Ces états de surfaces ont des énergies différentes, elles peuvent être caractérisées par le microscope à force atomique (AFM), ou par des mesures d'hydrophobicité (goniomètre).

### II.2.1. Le Microscope à Force Atomique (AFM)

Le microscope à force atomique AFM (fig.II.1) permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon par un système de balayage, cet appareil peut être utilisé selon les trois modes suivants :

- **Mode contact** : Dans ce mode, le levier muni de la pointe détectrice appuie sur l'échantillon en analyse.
- **Mode contact intermittent ou tapping** : Dans ce mode, le levier est mis en oscillation à une fréquence donnée d'une centaine de kilohertz (kHz) et à une amplitude fixe.
- **Mode non-contact** : Ce mode est analogue au mode contact, mais en fixant la distance pointe-échantillon de 50 à 150 Å. Dans ce cas, on utilise aussi les forces attractives exercées par l'échantillon sur l'ensemble levier-pointe [28].





Fig.II.1. Microscope à force atomique AFM.

Comme le laboratoire ne dispose pas de cet équipement, nous nous sommes dirigés vers une méthode plus classique qui permet de mesurer l'angle de contact et l'énergie de surface.

### II.2.2. Mesure d'angle de contact

La nature des surfaces dépend de leurs propriétés chimiques et physiques, l'une des méthodes de la caractérisation de l'état de surface est la méthode de mesure d'angle de contact. Cette méthode est basée sur la mesure de l'angle de mouillabilité du liquide souvent plusieurs solvants sont déposés sur la surface. Lorsque nous appliquons une goutte d'un liquide de l'ordre de microlitre, donc les forces de gravité sont négligeables, cette dernière prend la forme d'une calotte sphérique. L'angle qui se forme au bord de la goutte  $\theta$  est appelé un angle de contact ou de raccordement. La variation de cet angle représente la caractéristique de mouillabilité (voir Fig.II.2) [29].

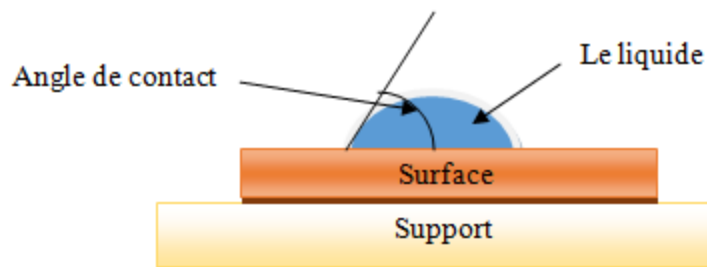


Fig.II.2. Principe de la mesure de l'angle de contact.

Cet angle nous donne le degré de mouillabilité de façon, si :

$\theta > 90^\circ$  donc la surface est hydrophobe, le liquide ne mouille pas le solide (voir Fig.II.3.a).

$\theta < 90^\circ$  La surface est moyennement hydrophobe et hydrophile, le solvant mouille imparfaitement la surface (voir Fig.II.3.b).

$\theta < 10^\circ$  ce liquide mouille parfaitement, donc la surface est hydrophile [30].



**Fig.II.3.**L'angle de contact et la mouillabilité des solvants. (a).Surface hydrophobe.  
(b). Surface hydrophile.

Il existe un instrument spécialisé qui sert à mesurer l'angle de contact ainsi que l'énergie de surface, où nous allons le montrer dans la partie suivante.

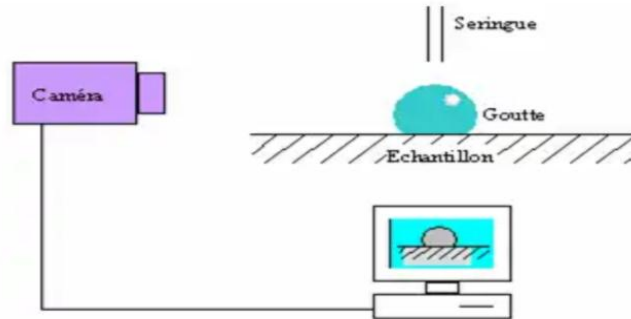
### II.2.3. l'appareil de mesure d'angle de contact (goniomètre)

L'appareil de mesure d'angle de contact est un goniomètre (Fig.II.4). Cet instrument travail sur le niveau microscopique et pour mieux de précision ; il est piloté par un logiciel, qui permet de tout contrôler : le positionnement de l'échantillon, la section et le positionnement de l'aiguille, les seringues électroniques, l'inclinaison du plateau et du support d'échantillon ainsi que les différentes chambres de température. Il permet, aussi, de générer et exécuter des procédures des mesures automatiques, afin d'avoir, des résultats fiables, rapides et reproductibles sur des échantillons [31].



**Fig.II.4.**Un goniomètre/ BENCHTOP TVA100.

Cependant, dans notre cas et par faute de disponibilité de cet appareil, ce dernier a été remplacé par un montage réalisé par nous même au laboratoire Toxicomed, faculté de médecine, université Abou Baker Belkaid-Tlemcen. En utilisant une caméra Canon de résolution de 16 Méga pixels plus un objectif de zoom. Le dépôt de la goutte de solvant a été réalisé toujours par la même personne à l'aide d'une micropipette de 10  $\mu\text{L}$  (voir Fig.II.4).



**Fig.II.5.** Montage de l'appareillage de mesure de l'angle de contact conçu au laboratoire.

La mesure d'angle de contact permet de calculer l'énergie de surface à travers divers modèles cités par la suite.

### II.2.4. les modèles de mesure de l'énergie de surface

L'étude d'une surface par la technique des angles de contact consiste alors à trouver l'énergie de surface (tension de surface) du solide  $S \gamma$  ou de ses composantes à partir de mesures de l'angle de contact de différents liquides dont l'énergie de surface  $L \gamma$  ou ses composantes sont connues [29].

Cette énergie peut être donnée en  $\text{N/m}$  ou en  $\text{J/m}^2$ , est généralement inconnu, donc plusieurs modèles peuvent être utilisés afin d'estimer cette valeur.

#### II.2.4.1. Modèle de Zisman

Ce modèle est basé sur la mesure d'angle de contact de plusieurs solvants d'énergie de surfaces différentes sur la même surface. Ces liquides sont souvent polaires [29]. Ce modèle a une composante pour l'énergie de surface solide)

L'énergie de surface critique de la phase solide  $\gamma^c$  est un critère empirique calculé par extrapolation à l'aide d'une régression linéaire, c'est celle correspondant à un étalement complet, soit  $\theta = 0^\circ$  [32].

Une valeur élevée de  $\gamma^c$  correspond à une haute énergie de surface, mais elle n'est pas équivalente à  $\gamma^s$ .

#### II.2.4.2. Modèle de Wu

Ce modèle a deux composantes est similaire à celui d'Owens-Wendt mais prends en compte une moyenne harmonique [33]. Cette technique est préconisée pour la détermination des polymères [34]. Les mesures se font avec deux liquides seulement, en général de l'eau et de l'iodure de méthylène.

$$\gamma_l (1 + \cos(\theta)) = 4 \frac{\gamma_l^d \times \gamma_s^d}{\gamma_l^d + \gamma_s^d} + 4 \frac{\gamma_l^p \times \gamma_s^p}{\gamma_l^p + \gamma_s^p} \quad (1)$$

Le calcul de  $\gamma_s^d$  et de  $\gamma_s^p$  s'effectue en résolvant un système de deux équations de Wu [29], une pour chacun des deux liquides.

**II.2.4.3. Modèle de Fowkes**

Ce modèle de deux composantes est dérivé de la théorie d'Owens-Wendt, de façon que les équations soient mathématiquement équivalentes.

Si nous divisons les deux coté de l'équation sur  $\sqrt{\gamma_L^d}$  nous récupérerons l'équation d'Owens-Wendt. Cette méthode permet de faire des tests simple avec des solvants sans composante polaire( nulle) puis avec des liquides qui possèdent les deux composantes polaires et dispersives, et de linéariser les équations [35]. La théorie de Fowkes dans un sens plus large a des applications légèrement différentes.

$$\frac{\gamma_l(\cos(\theta)+1)}{2} = \sqrt{\gamma_l^p} \sqrt{\gamma_s^p} + \sqrt{\gamma_s^d} \sqrt{\gamma_l^d} \quad (2)$$

**II.2.4.4. Théorie de Van Oss**

La théorie de Van Oss [36] sépare l'énergie de surface des solides et des liquides en trois composants (la composante dispersive, acide et basique).

$$\gamma_l(\cos(\theta) + 1) = 2[\sqrt{(\gamma_l^d \times \gamma_s^d)} + \sqrt{(\gamma_L^- \times \gamma_L^+)} + \sqrt{\gamma_l^+ \times \gamma_l^-}] \quad (3)$$

**II.2.4.5. Modèle d'Owens-Wendt**

Ce modèle à deux composantes pour l'énergie de surface solide est un modèle avec lequel les énergies de surfaces des liquides et des solides sont séparées en deux composantes, l'une dispersive et l'autre polaire. La somme des deux composantes donnera l'énergie de surface totale.

Nous avons utilisé le modèle d'Owens-Wendt [37-38] avec lequel les énergies de surfaces des liquides et des solides sont séparées en deux composantes, l'une dispersive et l'autre polaire. La somme des deux composantes donnera l'énergie de surface totale.

Nous avons procédé à une régression linéaire de type ;

$$y = a x + b \quad (4)$$

Où :

$$x = \sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}} \quad \text{et} \quad y = \frac{\gamma_l (1 + \cos(\theta))}{2\sqrt{\gamma_l^d}} \quad (5)$$

Avec :  $\theta$  : l'angle mesuré,  $\gamma_l^p$  : Composante polaire du liquide,  $\gamma_l^d$  : Composante dispersive du liquide, et  $\gamma_l$  l'énergie de surface du liquide où  $\gamma_l = \gamma_l^d + \gamma_l^p$ .

Nous avons :

$$x = \sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}}, \quad \text{et} \quad y = \frac{\gamma_l(1 + \cos(\theta))}{2\sqrt{\gamma_l^d}}$$

De (4) et (5) on obtient :

$$a = \frac{\sqrt{\gamma_l^d(1 + \cos(\theta))}}{2} \quad b = \frac{\gamma_l^p(1 + \cos(\theta))}{2\sqrt{\gamma_l^d}}$$

Donc

$$y = \frac{\sqrt{\gamma_l^d(1 + \cos(\theta))}}{2} x + \frac{\gamma_l^p(1 + \cos(\theta))}{2\sqrt{\gamma_l^d}} \quad (6)$$

La régression conduit aux composantes de la surface caractérisée :  $\gamma_s^p = a^2$ ,  $\gamma_s^d = b^2$

Avec :  $\gamma_s^p$  : Composante polaire du solide,  $\gamma_s^d$  : Composante dispersive du solide, et  $\gamma_s$  l'énergie de surface du solide où  $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$ .

Ainsi, la mesure de l'énergie de surface dans le cas de ce travail sera calculée en utilisant l'équation (6) du modèle d'Owens-Wendt car c'est la méthode la plus fiable selon la littérature.

## II.3. Mesure de l'énergie de surface

### II.3.1. Préparation de surface

Vu la variation de la composition des surfaces que nous disposons, le choix de la surface convenable à notre méthode de détection est essentielle. Ce choix est basé sur la mesure des énergies de surfaces par le modèle Owens-Wendt.

#### II.3.1.1. Mode opératoire du choix de surface

Pour connaître la mouillabilité des solvants (Tableau II.1) sur divers surfaces comme le verre, le SiO<sub>2</sub>, l'Or et le PDMS ; différents solvants ont été utilisés tels que eau distillée, toluène, n-Hexane, éthanol. Et par la méthode d'Owens-Wendt :

$$y = \frac{\gamma_l (1 + \cos(\theta))}{2\sqrt{\gamma_l^d}} \quad x = \sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}}$$

Les énergies des différentes surfaces ont été calculées, telle que  $E = a^2 + b^2$ .

**Tableau.II.1.** Les solvants utilisés dans la mesure des énergies de surface.

Les produits	La masse molaire M(g/mol)	La formule chimique	Etat physique à T. ambiante
eau distillée	18.015	H <sub>2</sub> O	Liquide
Toluène	92.14	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	Liquide
Ethanol 96%	46.07	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Liquide
n-Hexane	86.18	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	Liquide

Les surfaces sont rincées à l'eau distillée, acétone et enfin passage aux ultrasons avant d'accueillir les gouttes des solvants. Les photos des gouttes déposées sur ces différentes surfaces (Fig.II.6) ont été prises par notre montage.



**Fig.II.6.** Image de la goutte déposée sur la surface pour la prise mesure de l'angle de contact.

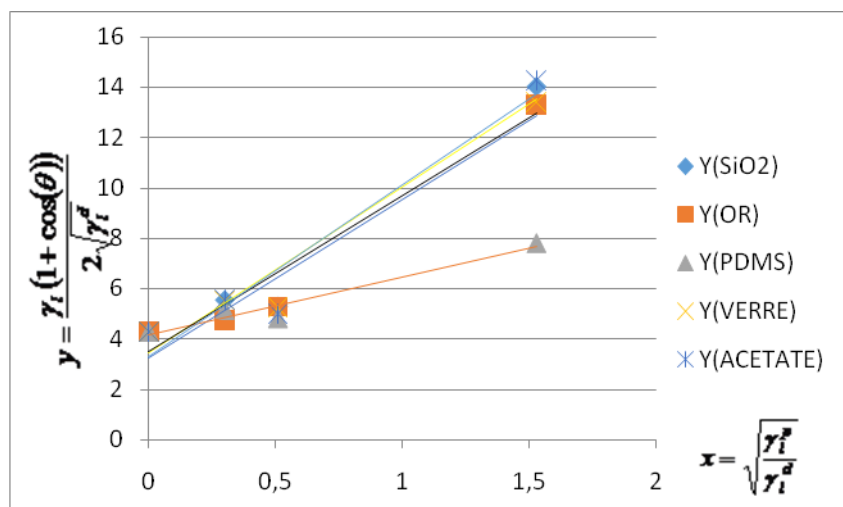
De ces photos, les angles de contacts ont été extrait.

## II.3.1.2. Résultats du choix de surface

Les mesures des angles de contact des différents solvants permettent de calculer les énergies de surfaces pour les différents types de surface. Dans le tableau.II.2 sont représentées les régressions linéaires pour le calcul des énergies des différentes surfaces. Ces dernières sont déterminées en traçant l'équation d'Owens-Wendt (eq. 6). (Voir Fig.II.7).

**Tableau.II.2.** Les données de l'équation (4) du modèle Owens-Wendt.

	X	Y <sub>SiO2</sub>	Y <sub>OR</sub>	Y <sub>PDMS</sub>	Y <sub>VERRE</sub>	Y <sub>ACETATE</sub>
<b>eau distillé</b>	1,53	14,02	13,31	7,8	13,31	14,26
<b>Toluène</b>	0,3	5,56	4,75	5,16	5,48	5,56
<b>n-Hexane</b>	0	4,29	4,29	4,29	4,29	4,29
<b>Ethanol</b>	0,51	5,3	5,3	4,83	5,28	5



Equation (4) d'Owens-Wendt

$$Y_{\text{acetate}} = 6,812x + 3,292$$

$$Y_{\text{OR}} = 6,290x + 3,232$$

$$Y_{\text{PDMS}} = 2,290x + 4,18$$

$$Y_{\text{SiO2}} = 6,623x + 3,417$$

$$Y_{\text{verre}} = 7,139x + 3,290$$

**Fig.II.7.** Comparaison entre les énergies de surface des différentes surfaces.

Dans le Tableau.II.3, sont regroupées les énergies de différentes surfaces. Leurs valeurs restent comparables avoisinant les 60 mJ/m<sup>2</sup> sauf pour le PDMS qui plus faible et donc plus hydrophobe.

**Tableau.II.3.** Les énergies de surface calculées pour la différente surface.

surface	ACETATE	OR	SiO2	VERRE	PDMS
<b>E (mJ /m<sup>2</sup>)</b>	57,240608	50,009924	55,540018	61,789421	22,7165

Finalement, le choix du matériau de surface est porté sur le verre, d'une part, pour son caractère de mouillabilité et d'autre part, pour la possibilité de faire un greffage covalent grâce à la possibilité de réaction des fonctions oxyde de silicium avec l'APTS. Ainsi, le paramètre de transparence de la lame qui est essentiel pour le montage du détecteur optique choisi.

## II.3.2. Greffage chimique des lames de verre

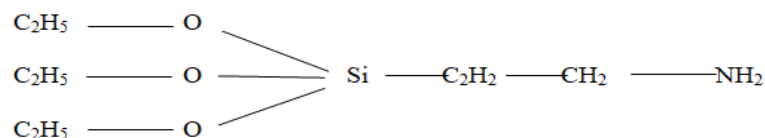
Elle consiste à greffer un film mono moléculaire en utilisant le produit 3- Aminopropyltriéthoxysilane avec une pureté de 99%, (APTS).

### II.3.2.1. Matériels et produits

La préparation des lames de verre et la solution du film moléculaire pour le greffage a été réalisée suivant plusieurs types de protocoles décrits en Annexe1. Le produit 3- Aminopropyltriéthoxysilane (APTS) cité dans l'annexe, est présenté dans le Tableau II.4 et sa formule développée est donnée sur la (Fig .II.8).

**Tableau.II.4.**La présentation de produit de greffage APTS.

Produit	Abréviation	masse molaire	Forme	formule chimique	densité
3- Aminopropyltriéthoxysilane	APTS	221,37 g/mol	Liquide	$C_9H_{23}NO_3Si$	d= 0 .946g/ml à T=25°C



**Fig.II.8.** la formule développée de l'APTS.

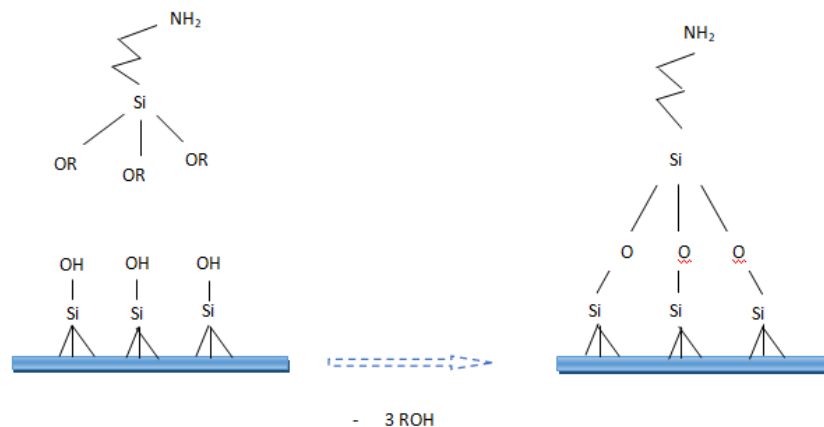
Le matériel utilisé dans ce travail est illustré sur la figure suivante (voir Fig .II.9). Plusieurs protocoles ont été utilisés pour réaliser le greffage chimique.



**Fig.II.9.** Le matériel de greffage



Ces protocoles sont détaillés dans l'annexe 1 de ce mémoire, ils sont inspirés du protocole décrit par [39]. Un schéma simplifiant la réaction d'adhésion du film moléculaire à la surface verre (voir fig.II.10)



**Fig.II.10.** La réaction d'adhésion du film moléculaire à la surface verre.

Nous avons utilisé le microscope optique (voir fig.II.11) au laboratoire d'histologie au sein de la faculté de médecine université Abou Baker Belkaid pour visualiser l'état de surface. C'est un microscope de marque ZEISS, avec un agrandissement de X40.



**Fig.II.11.** Microscope optique (ZEISS).

Un pied à coulisse (voir Fig.II.12) pour mesurer le diamètre du champ de vision de microscope optique a été également utilisé à fin d'obtenir l'échelle de la mesure.

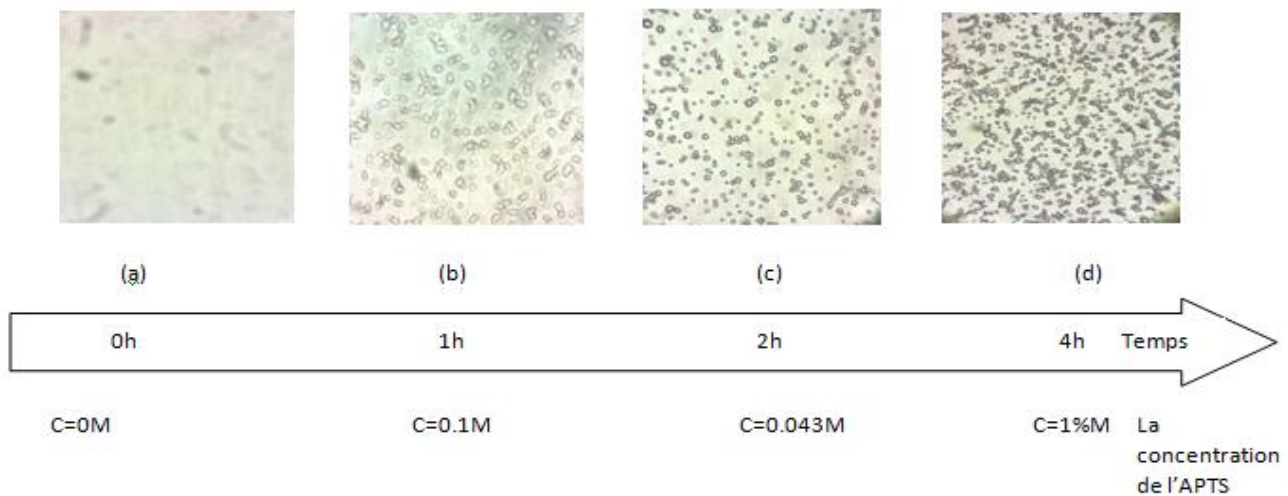


**Fig.II.12.**Pied à coulisse.

Cet instrument est composé de deux parties et permet de mesurer la longueur et la profondeur. Le diamètre du champ de vision est 1.6 mm, alors une surface de 2.01 mm<sup>2</sup>.

**II. 3.2.2. Mise en évidence du greffage chimique**

Les 5 protocoles de greffage utilisées varient en fonction des paramètres ; concentration de APTS, pourcentage d'acide utilisé, le temps de contact entre la solution APTS et la surface, le mode de rinçage de l'excès d'APTS non réagit (avec ou sans ultrason) (voir Annexe 1). D'après les observations à l'œil nu, une couche blanche apparaisse sur la surface des lames de verre de densité ascendante avec le temps. Un exemple de photos de Lames greffées visualisées par le microscope optique est donné sur la figure si dessous (voir fig .II.13).



**Fig.II.13.**Visualisation des lames greffées sous microscope optique.

(a) lame de référence, (b) APTS de C=0.1M, 1h de greffage,  
 (c) APTS C=0.043M, 2h de greffage, (d) APTS de C=0.043M, 4h de greffage

Cependant, ces observations ne sont pas suffisantes pour la prise de décision du choix du protocole. Pour cela, nous avons procédé à la mesure des angles de contact par la méthode d'Owens Wendt. L'utilisation de

l'équation(6) permet de calculer les énergies de surfaces. L'essentiel des résultats obtenus montre que le protocole 5 représenté sur le Tableau II.5 est le plus adapté.

**Tableau.II.5.** Energies de surface des différentes lames (lame 19 jusqu'à lame 34) du protocole 5

		1h	2h	4h	24h	
Energies de surface (mJ /m <sup>2</sup> )	Solution APTS1% acide	Avec US	43.91	33.21	49.89	24.61
		Sans US	37.09	26.72	49.89	36.25
	Solution APTS 1% non acide	Avec US	55.61	47.76	44.89	49.89
		Sans US	36.96	49.86	37.09	24.72

En effet, les tests effectués montrent que la diminution de l'énergie de surface est significative après 24 h de contact de la solution APTS 1% +acide avec la surface. L'énergie de surface du verre avant traitement passe de 50,54 à 24,6 mJ /m<sup>2</sup> avec un rinçage aux US et à 36,25 mJ /m<sup>2</sup> sans rinçage aux US. Ces tests montrent également que le rinçage aux US est essentiel pour éliminer les multi-couches déposées sur la surface.

### II.3.3. Greffage de l'anticorps

Dans cette partie, nous allons greffer l'anticorps (voir fig.II.14), en mettant les lames de verre greffées par l'APTS dans une solution d'anticorps de concentration 50 µg/mL dans le PBS [40] (voir Annex1).



**Fig.II.14.** La réaction d'adhésion entre l'APTS et l'anticorps (formation de liaison peptidiques).

Des mesures d'angle de contacts ont été prises, les résultats des énergies de surfaces (E) sont présentés sous formes de Tableaux (6, 7). Les Y représentent les régressions linéaires de chaque courbe pour déduire les bornes de l'équation linéaire de la courbe (a, b), ces derniers permettent de calculer l'énergie de surface en (mJ/m<sup>2</sup>). Les tensions de surface de plusieurs lames, chacune avant greffage d'APTS, après greffage, après rinçage par ultrason US et finalement après le dépôt des anticorps sont déterminées (Tableau 7).

**Tableau.II.6.** Les données du modèle d'Owens Wendt.

	Graphes des progressions linéaires $y=f(x)$	Les équations des graphes
<b>Bloc1</b>		$Y_{(\text{sans APTS})} = 7,139x + 3,290$ $Y_{(\text{APTS})} = 6,117x + 3,531$ $Y_{(\text{APTS+US})} = 4,709x + 3,862$ $Y_{(\text{APTS+US+ANTICORPS})} = 6,471x + 3,441$
<b>Bloc2</b>		$Y_{(\text{sans APTS})} = 6,802x + 3,360$ $Y_{(\text{APTS})} = 6,117x + 3,531$ $Y_{(\text{APTS+US})} = 5,295x + 3,724$ $Y_{(\text{APTS+US+ANTICORPS})} = 4,643x + 3,858$

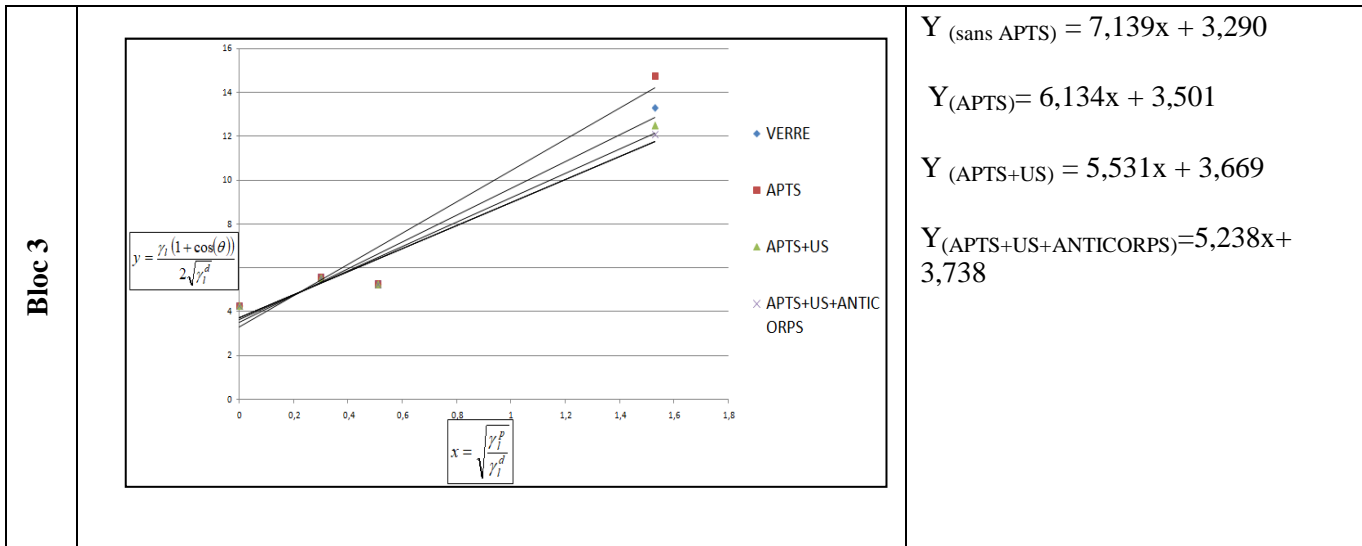


Tableau.II.7. Les énergies des trois blocs selon l'état de la lame.

E (mJ/m <sup>2</sup> )	E (sans APTS)	E (APTS)	E (APTS+US)	E (APTS+US+ANTICORPS)
<b>Bloc1</b>	61,789421	49,88565	37,089725	53,714322
<b>Bloc2</b>	57,556804	49,88565	41,905201	36,441613
<b>Bloc3</b>	61,789421	49,882957	44,053522	41,409288

L'énergie de surface de la première lame varie de façon descendante de l'état non greffé jusqu'au greffage du produit APTS+ultrason. En revanche, une augmentation de l'énergie de 37,089725 mJ/m<sup>2</sup> vers 53,714322 mJ/m<sup>2</sup> est observée après greffage de l'anticorps.

L'énergie de surface de la deuxième lame diminue après chaque étape de greffage, elle est comprise entre 57,556804 mJ/m<sup>2</sup> et 36,441613 mJ/m<sup>2</sup>. Ceci est cohérent avec l'augmentation de la rugosité de la surface suite au greffage du film moléculaire puis l'anticorps ce qui induit à une augmentation de l'hydrophobicité

La troisième lame suit la même tendance que de la deuxième lame. en effet, l'énergie de surface diminue de 61,789421 mJ/m<sup>2</sup> à 41,409288 mJ/m<sup>2</sup> suite au greffage d'anticorps.

### II.4. Conclusion

L'étude de plusieurs surfaces de type acétate, Or, PDMS, SiO<sub>2</sub> et verre a été réalisée grâce à la mesure de l'angle de contact. Ces mesures ont permis de déterminer que l'état de surface du verre est le plus adapté au greffage moléculaire. Ainsi plusieurs protocoles ont été testés afin d'aboutir au choix de la solution APTS 1% +acide avec rinçage aux ultrasons.

La réalisation du premier édifice du capteur a été réalisée par greffage de l'anticorps sur la surface est prédisposée à l'accueillir. La mesure de l'énergie de surface de ce dernier montre un abaissement suite à la rugosité et hydrophobicité apportées à la surface par l'anticorps.

# **Chapitre III : Prototypage du détecteur de bactérie**

### III.1. Introduction

Dans ce travail, nous avons utilisé une souche de référence non pathogène (voir Fig.III.1) de la bactérie *Staphylococcus aureus* issue de la banque de bactéries ATCC (American Type Culture Collection) à travers l'institut de Pasteur d'Alger sous le code ATCC 25923. Le *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) est l'espèce la plus pathogène de genre *Staphylococcus*. Cette bactérie se présente comme une coque en amas (grappes de raisin) à Gram positive [41], et appartient à la famille des *Staphylococcaceae* [42]. Son diamètre est d'environ 0.5µm et peut aller jusqu'à 1.5µm [43]. C'est une espèce commensale de l'homme (présente chez 15 à 30 % des individus dits porteurs sains) [44].



**Fig.III.1.** Photo d'une boîte de pétrie de la souche de référence de la bactérie *S.aureus*.

Le choix de la bactérie a été conditionné par la disponibilité du couple anticorps-bactérie. Du point de vue applicatif, le *S. aureus* est une bactérie pathogène qui colonise la bouche et les mains. Elle est considérée comme l'une des principales causes d'infections chroniques (sinusites, plaies suppuratives...) mais également d'infections nosocomiales [45]. Le pouvoir pathogène d'une souche est lié aux facteurs de virulence. On distingue les protéines de surface (adhésines) qui permettent la colonisation de l'hôte. *S. aureus* possédant un grand nombre de protéines exposées à la surface de la bactérie. Plus d'une dizaine d'adhésines ont été identifiées, celle qui nous intéresse est la protéine A [46]. La protéine A est une protéine située dans la paroi de *Staphylococcus aureus*, en position externe. Elle a la propriété de fixer le fragment Fc des immunoglobulines, du fait d'une complémentarité de structure. La mise en évidence de la protéine A permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, seule l'espèce *Staphylococcus aureus* possède ce constituant [47].

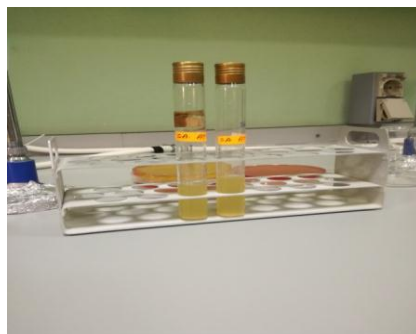
### III. 2. Protocole de manipulation

Pour manipuler des bactéries ; il faut stériliser le milieu où on travaille afin d'éviter toute contamination possible avec d'autres bactéries. La stérilisation englobe l'ensemble paillasse, matériels et l'air. La culture des bactéries se fait à l'aide d'un milieu qui peut être soit un milieu liquide ou un milieu solide :



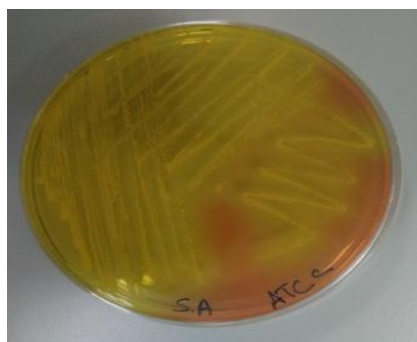
- **Milieu liquide** : il s'agit d'un bouillon (ex : BHIB : BrainHeart Infusion Broth).
- **Milieu solide** : Une gélose qui contient des éléments nécessaires à la croissance bactérienne. Cette gélose peut être sélective ou pas selon la présence ou l'absence des inhibiteurs (agents sélectifs).

Dans le premier cas, nous avons cultivé notre souche de référence *S.aureus* dans un milieu liquide (BHIB) pendant 24H à 37°C. La croissance bactérienne se traduit par un liquide trouble (le bouillon devient trouble) (voir Fig.III.2).



**Fig.III.2.**croissance sur milieu liquide.

Dans le deuxième cas, notre souche a été cultivée une autre fois sur milieu solide où nous avons choisis la gélose CHAPMAN (Gélose sélective).



**Fig.III.3.**croissance sur milieu solide.

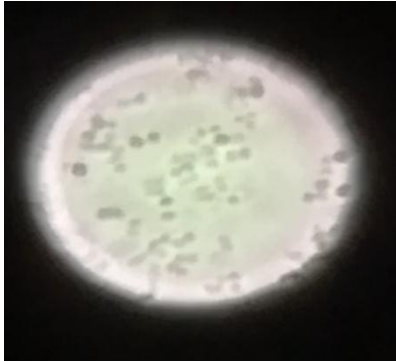
Nous avons réalisé un ensemencement de la bactérie par pipette pasteur sur la gélose à partir du bouillon, suivie d'une incubation de la boîte dans l'étuve pendant 24H à 37°C (voir Fig.III.3).

### III.2.1.Caractérisation de la bactérie

#### III.2.1.1.Etat frais (in vivo)

L'étude des bactéries vivantes permet de connaître la mobilité, le mode de groupement ainsi que la morphologie des bactéries. A partir d'une culture bactérienne en milieu liquide, on fait un

prélèvement d'une goutte, nous la déposons sur une lame propre, la couvrir avec la lamelle de façon que le liquide ne doit pas de se déborder. La figure.III.4 montre des coques regroupés en deux, en quatre, par amas, immobiles (voir fig.III.4).



**Fig.III.4.**Photo in-vivo sous microscope optique du *S.aureus*.

Cette observation a été obtenue sous les conditions d'observation suivantes :

- L'objectif x40.
- Le diaphragme doit être quasiment fermé dans le but d'augmenter le contraste.
- Une forte intensité lumineuse.

### III.2.1.2. Coloration de Gram

Cette méthode a pris son nom du bactériologiste Hans Christian Gram, qui a mis au point ce protocole en 1884. Elle met en évidence la paroi bactérienne. Cette coloration a permis d'identifier les deux types de bactérie (bactérie à Gram+ et bactérie à Gram-), le mode de regroupement ainsi que la forme. Cela nécessite un matériel et des réactifs spécifiques. Le matériel nécessaire est :

- Lames en verre.
- Pipettes pasteur.
- Papier James.
- Microscope optique.

Les Réactifs nécessaires sont :

- Solution de Violet de Gentiane
- Solution de Lugol (fixateur)
- Solution de Fuschine
- Alcool à 90°
- Huile à immersion

Le mode opératoire de la coloration bactérienne se scinde en quatre parties :

#### 1. Réalisation du frottis bactérien

Cette réalisation peut être faite soit par l'utilisation d'une goutte de bouillon ou par la mise d'une portion solide de la bactérie dans une goutte d'eau distillée stérile. Elle sert à tuer les bactéries pour permettre la pénétration des solutions.

- Étaler la goutte du centre vers l'extérieur.

- Sécher à l'air libre dans la zone stérile.
- Fixer la préparation au- dessus de la flamme du bac bunsen. (Apparition d'une tache blanche).
- Refroidissement a l'air libre dans la zone stérile.

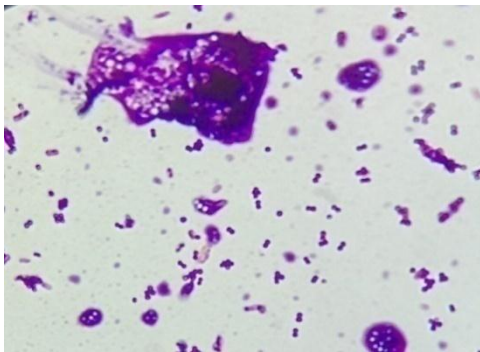
### 2. Réalisation de la coloration de Gram

La coloration de Gram se réalise en suivant les étapes ci- dessous :

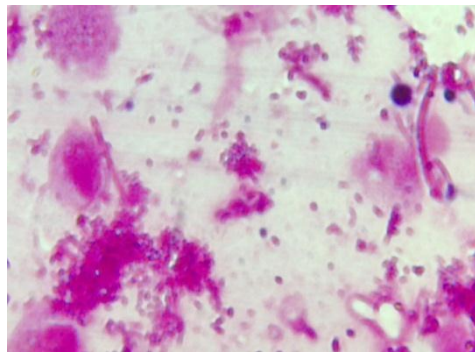
- Recouvrir le frottis bactérien avec la solution de Violet de Gentiane ; laisser agir pour 1min.
- Rincer doucement la lame inclinée avec l'eau distillée pendant quelque secondes.
- Recouvrir la lame avec la solution de Lugol (Mordantage) ; laisser agir pendant 1min.
- Rincer doucement la lame inclinée avec l'eau distillée pendant quelque secondes.
- Faire couler doucement et en continue l'éthanol sur la lame inclinée pendant 30s à 1min (décoloration).
- Recouvrir la lame avec la Fuschine pendants 30s (Recoloration /décoloration).
- Rincer doucement la lame avec de l'eau.
- Sécher la lame en épongeant délicatement la lame entre deux morceaux de papier James.
- Observer au microscope optique à l'objectif à immersion (GX100)( déposer une goutte de l'huile à immersion sur le frottis coloré), avec un éclairage important (diaphragme ouvert).

### 3. Lecture

Les bactéries qui apparaissent en violet sont des bactéries à Gram positifs(voir Fig.III.5(a)), Celles qui sont en rose, sont des bactéries à Gram négatif(voir Fig.III.5(b)).



(a)

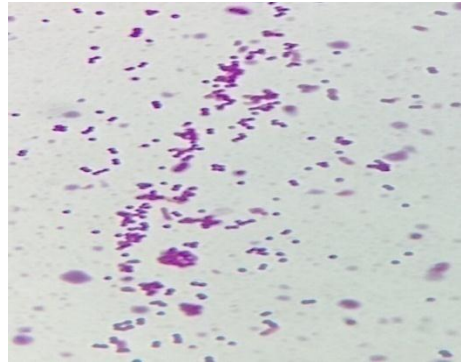


(b)

**Fig.III.5.**La visualisation sous microscope de les bactéries après coloration, tel que (a) bactérie à Gram positif, et (b) bactérie à Gram négatif.

#### 4. Observation

Selon Figure III.6, le *Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram positif, formée de cocci, apparaissent le plus souvent en amas dit grappes de raisin. Ils peuvent aussi se trouver isolés, par paires ou en courte chaîne.



**Fig.III.6.**La coloration de Gram du *Staphylococcus aureus* (0.5 à 1.5  $\mu\text{m}$  x 100).

### III.2.2. Objectif du travail

L'objectif de notre projet de fin d'étude est de réaliser un outil convenable pour ce besoin. Cet instrument est basé sur la transmission optique qui a pour but de capter les bactéries en donnant un signal électronique de leur existence. Donc, nous nous sommes basés sur le greffage d'une fine couche d'anticorps qui vont par suite réagir avec les bactéries, à l'aide de la lumière et cette transmission pouvant induire un changement due à une réaction immunologique. Dans ce chapitre, nous allons détailler les différentes étapes pour la conception de ce montage, y compris la circuiterie par l'usage : capteur TCS230, la carte arduino méga...etc. Ainsi que la réalisation d'un support convenable à travers l'imprimante 3D.

### III.2.3. Mise en œuvre

Le système de détection passe par plusieurs étapes pour qu'il soit actionnel, tout d'abord

- (1) : la réaction chimique entre le verre et l'APTS qui permet d'établir une liaison covalente entre le film moléculaire et la surface en verre,
- (2) : la réaction entre les fonctions ( $\text{NH}_2$ ) de l'extrémité du bras d'APTS et les fonctions acides de la paroi extérieure de l'anticorps, afin de donner une liaison peptidique,
- (3) : la réaction immunologique entre la bactérie et l'anticorps,

La figure III.7, schématise la mise en œuvre de toutes ces interactions pour aboutir au système à détecter.

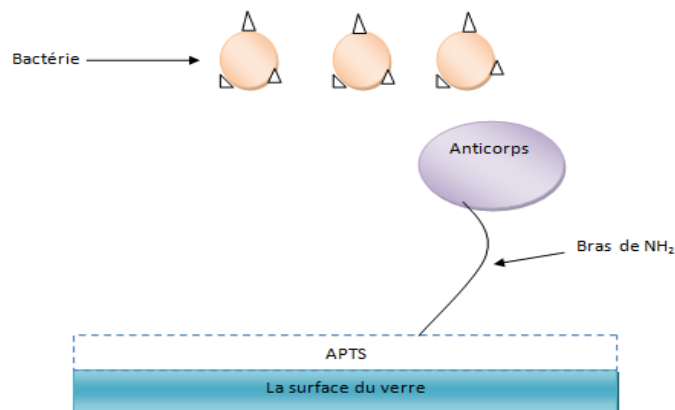


Fig.III.7.Schéma explicatif des réactions qui permettent la détection de *S.aureus*.

### III.3.Montage électrique pour la détection de la bactérie

Les préparations chimiques et biologiques (bactériologie) de la surface ont permis de réaliser un environnement favorable pour l'adhésion de la bactérie. Pour représenter cette adhésion, nous nous sommes basés sur un montage électronique en utilisant un capteur optique de couleur. Cette conception est utilisée sur une carte Arduino méga programmable, ainsi qu'un capteur optique TCS230 (voir Fig.III.8) afin de déclarer la présence ou non des bactéries. Nous avons utilisé un objectif de zoom spécifique pour agrandir la taille des bactéries, dans le but que ces espèces puissent être détectées par le capteur. Dans ce qui suit, nous allons détailler la composition de notre détecteur de bactéries.

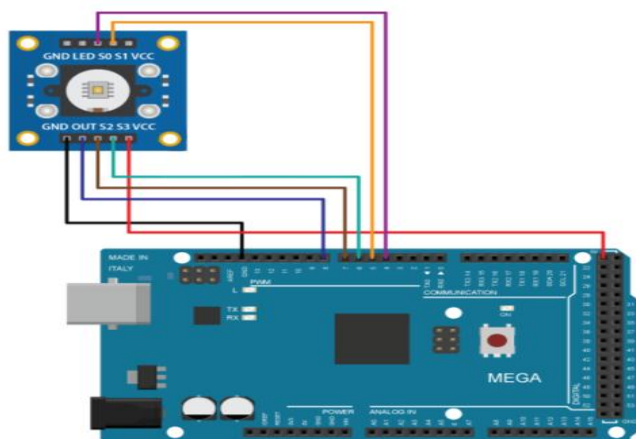
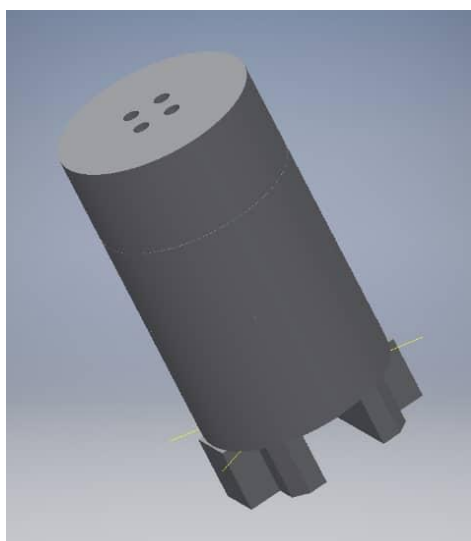


Fig. III.8.Circuit électronique pour le fonctionnement de capteur.

La forme finale du capteur (voir fig.III.9) est schématisée à l'aide du logiciel autodeskInventor pour qu'elle soit imprimée par suite par l'imprimante 3D de la marque Printronix, cette architecture aide à garder les mêmes conditions, dans le but de fiabiliser la détection.



**Fig.III.9.**Schéma du capteur de bactérie.

La réalisation du prototype de notre détecteur de bactérie est divisée en 2 parties ; un boîtier fabriqué par l'imprimante 3D et le circuit électronique qui est piloté par Arduino à travers un programme (voir Fig.III.10) injecté dans la carte.

```

prog_couleur | Arduino 1.8.5
Fichier Édition Croquis Outils Aide

prog_couleur
|
#define S0 4
#define S1 5
#define S2 6
#define S3 7
#define sensorOut 8
int frequency = 0;
void setup() {
  pinMode(S0, OUTPUT);
  pinMode(S1, OUTPUT);
  pinMode(S2, OUTPUT);
  pinMode(S3, OUTPUT);
  pinMode(sensorOut, INPUT);

  // Setting frequency-scaling to 20%
  digitalWrite(S0,HIGH);
  digitalWrite(S1,LOW);

  Serial.begin(9600);
}
void loop() {
  // Setting red filtered photodiodes to be read
  digitalWrite(S2,LOW);
  digitalWrite(S3,LOW);
  // Reading the output frequency
  frequency = pulseIn(sensorOut, LOW);
  // Printing the value on the serial monitor
  Serial.print("R= "); //printing name
  Serial.print(frequency); //printing RED color frequency

```

```

prog_couleur | Arduino 1.8.5
Fichier Édition Croquis Outils Aide

prog_couleur
|
digitalWrite(S3,LOW);
// Reading the output frequency
frequency = pulseIn(sensorOut, LOW);
// Printing the value on the serial monitor
Serial.print("R= "); //printing name
Serial.print(frequency); //printing RED color frequency
Serial.print(" ");
delay(100);
// Setting Green filtered photodiodes to be read
digitalWrite(S2,HIGH);
digitalWrite(S3,HIGH);
// Reading the output frequency
frequency = pulseIn(sensorOut, LOW);
// Printing the value on the serial monitor
Serial.print("G= "); //printing name
Serial.print(frequency); //printing RED color frequency
Serial.print(" ");
delay(100);
// Setting Blue filtered photodiodes to be read
digitalWrite(S2,LOW);
digitalWrite(S3,HIGH);
// Reading the output frequency
frequency = pulseIn(sensorOut, LOW);
// Printing the value on the serial monitor
Serial.print("B= "); //printing name
Serial.print(frequency); //printing RED color frequency
Serial.println(" ");
delay(10000);
}

```

**Fig.III.10.**Le programme Arduino du capteur.




Après l'introduction du programme dans la carte Arduino, nous pouvons tester le prototype final pour la détection de bactéries. Un test illustré en photo dans la figure suivante(voir **Fig.III.11**).



**Fig.III.11.**Le montage du détecteur de bactérie.

Notre détecteur est composé de 3 éléments essentiels ; la carte arduino méga, le capteur optique TCS230 et un objectif de zoom sert à agrandir l'objectif. Ces derniers sont caractérisés dans le tableau ci-dessous (Tableau III.1).

**Tableau.III.1.**La présentation des composants du capteur de bactérie.

Le composant	La figure	Les caractéristiques
Carte arduino Méga		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elle dispose de 54 broches d'entrées / sorties.</li> <li>- une connexion USB.</li> <li>- une prise de courant.</li> <li>- Tension de fonctionnement 5V.</li> </ul>
Capteur de couleurs TCS230		<ul style="list-style-type: none"> <li>-un convertisseur couleur/fréquence.</li> <li>- des photodiodes configurables au silicium.</li> <li>- 4 LED blanches pour l'éclairage.</li> </ul>
Objectif de zoom		<ul style="list-style-type: none"> <li>-objectif de l'appareil photo canon.</li> </ul>



### III.3.1. Tests du détecteur de bactérie

Dans un premier temps, nous avons testé la variation de la détection du capteur pour deux colorants en milieu aqueux du bleu de Têlon et le rouge de Têlon pour une concentration de 1g/L pour chaque colorant. Ainsi, nous avons utilisé des 2 papiers de couleurs bleu et le rouge afin de calibrer le capteur et de comparer entre les divers milieux testés. Ces résultats de test sont présentés dans le tableau ci-dessus (Tableau.III.2).

**Tableau.III.2.**Le test de capteur TCS230.

Supports	R	G	B
Lame vide	454,72	449,72	159,04
Lame+bleu de Têlon	356	351,72	114,6
Lame+ rouge de Têlon	357,16	371,2	118,56
Papier bleu	131,36	106,2	28,8
Papier rouge	50,44	171,12	38,16

#### Principe du fonctionnement de l'Arduino

Le capteur doit déterminer l'existence d'un objet devant le capteur, il a la possibilité de déterminer de quelle couleur s'agit-il. En sélectionnant de manière sélective les lectures du filtre de photodiode, nous pouvons détecter l'intensité de différentes couleurs. Ce capteur contient un convertisseur courant-fréquence, permet de convertir les lectures des photodiodes en une onde carrée avec une fréquence carrée proportionnelle à l'intensité lumineuse de la couleur choisie. Le moniteur série affiche des valeurs telles que la variation fréquentielle de la photodiode bleue (B) doit être la plus basse à comparer avec celles de photodiodes rouge (R) et verte (G). La présence d'une couleur est exprimée par une grande diminution de l'indicateur représentant la couleur détectée.

De ce fait, des rapports entre la variation du signal de la photodiode rouge (R), verte (G) et bleu (B) de chaque lame ou papier et la lame vide par rapport au signal de la photodiode de la lame vide sont calculés comme l'indique le tableau III. 3.

Ces rapports montrent une augmentation élevée lorsqu'il s'agit de la bonne couleur à détecter. Ces tests effectués permettent de s'assurer du bon fonctionnement de notre dispositif.

**Tableau III.3.**Le rapport de variation de signal entre les différentes surfaces.

Rapport de variation (%)	R(%)	G(%)	B(%)
Solution <b>bleu</b>	21.7	21.79	<b>27.94</b>
Solution rouge	<b>21.45</b>	17.47	25.45
Papier <b>bleu</b>	71.11	76.38	<b>81.89</b>
Papier <b>rouge</b>	<b>88.9</b>	61.95	76.01

### III.3.1.les tests du capteur

Dans cette partie, nous avons testé le fonctionnement du capteur pour la détection du *Staphylococcus aureus*. Tout d'abord, le test de la lame vide, ensuite la lame greffée par l'APTS, puis la lame avec l'anticorps lié à l'APTS et finalement en présence de la bactérie a été produit.

**Tableau. III.4.**Le test de capteur TCS230 pour la détection de la bactérie.

Supports	R	G	B
lame vide	454,72	449,72	159,04
lame+APTS	310,9	335,16	105,6
lame+APTS+ANTICORPS	308,12	318,32	105
lame+APTS+ANTICORPS+bactérie	322,56	355,48	113,68

Nous avons effectué une vingtaine de mesures et calculé leur moyenne. Les valeurs des signaux de chaque photodiode obtenues pour les différentes lames sont reportées dans le tableau III.4. Ensuite, nous avons procédé aux calculs du rapport entre la variation du signal de la photodiode rouge, vert et bleu entre chaque lame vide et la lame greffée sur le signal correspondant de la lame vide comme l'indique le tableau III.5. Le rapport de variation dans le cas de la surface modifiée APTS a tendance à indiquer une couleur bleu comme celui de la surface modifiée APTS+anticorps. Tandis que, la surface modifiée APTS+anticorps+bactérie indique un signal différent des deux premiers cas et s'approchant de la couleur rouge.

**Tableau. III.5.**Le test de capteur TCS230 pour la détection de la bactérie.

Rapport de variation(%)	R(%)	G(%)	B(%)
<b>Support</b>			
<b>APTS</b>	31.63	25.47	<b>33.6</b>
<b>APTS+ANTICORPS</b>	32.24	29.21	<b>33.98</b>
<b>APTS+ANTICORPS+BACTERIES</b>	<b>29.06</b>	20.95	28.5

Sachant que les résultats exprimés sur les tableaux représentent une réponse fréquentielle pour chaque couleur Rouge R Vert G et Bleu B (voir la fiche technique du capteur TCS230 en annexe) appelée en anglais Relative Responsibility. Nous pouvons utiliser l'équation suivante pour remonter à la longueur d'onde :

$$R = \eta \frac{q}{hf} \approx \eta \frac{\lambda(\mu\text{m})}{1,23985(\mu\text{m} \times \frac{W}{A})} (1)$$

Où

$\eta$ : est le quantum de conversion des photons en électrons

$q$  : la charge électronique

$h$  : constant de Planck

$f$  : fréquence

Nous pouvons calculer le quantum de conversion  $\eta$  à partir d'une mesure sur une lame vide. Cela peut servir de calibration de notre signal. Les valeurs de longueurs d'onde obtenues sont en décalages de 100 à 120 nm par rapport aux longueurs d'onde initiales des photodiodes du capteur (voir la fiche technique du capteur TCS230 en annexe). Sachant que la plus grande valeur est calculée est logiquement celle du rouge, viendra après celle du vert et du bleu respectivement. Pour l'instant, nous pouvons retenir que ce dispositif sert à différencier qualitativement entre un état initial sans colorant ou sans bactérie et un état contaminé. Ce résultat probant permettra aussi de suivre la culture in-vivo de la bactérie et donner le temps minimal de détection. Donc, ce prototype peut être optimisé avec une meilleure calibration du capteur. En perspective, nous pouvons utiliser des colorants fluorescents pour le calibrage des longueurs d'onde ainsi que la focalisation de l'objectif pour optimiser la distance entre le capteur et l'échantillon

### III.4. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons utilisés les surfaces fonctionnalisées par les procédés décrits dans chapitre 2 pour l'adhésion de la bactérie. Pour cela, nous avons détaillé le protocole de manipulation de la bactérie. Après cela, nous avons décrit l'assemblage des composants utilisés pour la détection optique en passant par la carte commande Arduino, le capteur TCS230, l'objectif optique et le support fabriqué par l'imprimante 3D. Nous avons finalisé ce chapitre par des tests de ce prototype sur des surfaces de différentes couleurs et fonctionnalisations pour le calibrage et sur des surfaces avec des bactéries vivantes. Nous avons clairement démontré un changement de signal pour chaque changement d'état de surface.

## **Conclusion générale**

## Conclusion générale

Dans ce projet de fin d'étude, nous avons développé un détecteur de bactérie, en se basant sur un système optique et la transmission de la lumière. L'idée de cette détection s'inscrit dans un contexte de développement d'un biocapteur. L'étude fait appel à une multidisciplinarité de connaissances dans les domaines scientifiques en chimie, biologie et électronique.

Cette étude a englobé plusieurs parties, la première consistait dans le choix de la surface en se basant sur les propriétés de mouillabilité/hydrophobicité par le calcul de l'énergie de surface à travers le modèle d'Owens Wendt. Cette mesure a été effectuée par un système développé dans le cadre de ce projet, en utilisant un montage photographique permettant de mesurer les angles de contacts afin de remonter aux énergies de surfaces.

La deuxième partie a comporté le test de plusieurs protocoles de modifications de la surface verre par l'APTS. Ce dernier va former une couche moléculaire liée chimiquement à la surface et possédant un bras espaceur fonctionnalisé par une amine ( $\text{NH}_2$ ). Cette fonction a été choisie dans le but de réagir avec l'enveloppe extérieure de l'anticorps afin de l'accrocher via la formation d'une liaison peptidique. Ainsi, cette surface est très compatible avec les anticorps en général pour accueillir à la fin la bactérie correspondante.

La partie détection a été entreprise par la conception en premier lieu du détecteur optique par l'assemblage des composants suivants ; la carte commande Arduino, le capteur TCS230, l'objectif optique et le support fabriqué par l'imprimante 3D. Dans un deuxième lieu, la culture de la bactérie a été réalisée.

Des tests de détection optique sur des surfaces fonctionnalisées par APTS, APTS+ anticorps puis APTS+Anticorps+bactérie ont permis de montrer un changement de signal lorsque la surface est contaminée par la bactérie. Les résultats obtenus restent pour l'instant qualitatives où on détecte facilement la présence ou non de la bactérie in-vivo. Prochainement, notre challenge est de calibrer de manière quantitative ce prototype dans le but d'avoir une information précise sur le temps de détection qui dépend directement de la culture bactérienne et la sensibilité du capteur.

Ce signal peut être étudié de manière optimale afin de tirer des résultats quantitative en utilisant par exemple des solutions fluorescentes et ou étudier la distance de focalisation entre le capteur et l'échantillon. D'autres types de bactéries peuvent être envisagées pour d'éventuelle test grâce à son ergonomie et sa facilité d'utilisation

## Bibliographies

- [1] G.O'Toole, H.B. Kaplan et R.Kolter, Biofilm formation as microbial development, Annual review of microbiology, vol.54, 2009, p 49-79
- [2]Hahn, M. W., H. Lunsdorf, Q. Wu, M. Schauer, M. G. Hofle, J. Boenigk, and P. Stadler. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1442-1451
- [3] Hahn, M. W., Lunsdorf, H., Wu, Q., Schauer, M., Hofle, M. G., Boenigk, J. et Stadler, P., (2003). Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3): 1442-1451.
- [4]H.Schulz, B.Jorgensen, Big bacteria , *Annu Rev Microbiol* 55 : 105 – 37, 2001.
- [5] Lecointre G. Le Guyader H. Classification phylogénétique du vivant, Belin 2001(ISBN 2-7011-2137-X)
- [6]J.Robertson, M.Gomersall, P.Gill , *Mycoplasma hominis: growth, reproduction, and isolation of small viable cells* , *J Bacteriol*, 124 (2): 1007 – 18, 1975.
- [7] I.Burgun, Bactéries : La guerre des mondes, Agence Science-Press, 28 novembre 2012.
- [8]G.Macagno, L'immense univers microbien , émission Continent sciences sur France Culture, 18 février 2013
- [9] CLSI, Principles and Procedures for Blood Cultures; Approved Guideline. CLSI document M47-A. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2007.
- [10] Lamy, B., S. Dargere, M.C. Arendrup, J.J. Parienti, P. Tattevin, How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art.*Frontiers in Microbiology*, 2016.7.
- [11] Buchan, B.W. et N.A. Ledebor, Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 2014. 27(4): p. 783-822.
- [12] Stefani, S., Diagnostic techniques in bloodstream infections: where are we going? *Int J Antimicrob Agents*, 2009. 34 Suppl 4: p. S9-12.
- [13]TEMPLIER, V. Exploration de méthodes alternatives pour la détection de bactéries dans le sang, 2016, p25-26.
- [14] J.-M Friedt. Introduction à la microbalance à quartz : aspects théoriques et expérimentaux, Belgique, p3-5
- [15] B.W.Buchan , S. Allen, C.A. Burnham, E. McElvaniaTeKippe, T. Davis, M. Levi, et al. , Comparison of the next-generation Xpert MRSA/SA BC assay and the GeneOhmStaphSR assay to routine culture for identification of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in positive-blood-culture broths. *Journal of ClinicalMicrobiology*, 2015. 53(3): p. 804-9.
- [16]SihemBouguelia. Développement de biopuces dédiées à la détection de bactéries pathogènes à faibles taux, 2013, p44-45

- [17] F.Dridi, Développement d'un nouveau biocapteur enzymatique ultrasensible pour la détection conductimétrique de l'ochratoxine A dans l'huile d'olive ,2016 ,p4 .
- [18] D.Sadava, D.M. Hillis, H.C. Heller, M.R. Berenbaum, The evolution of diversity. Chapitre 26 :Bacteria and Archaea: The Prokariotic Domains, in Life : the science of biology. 2011, Sinauer Associates: Etats-Unis. p. 536-559.
- [19] A. Ulman. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. Chemical Reviews, 1996, 96, 1533.
- [20] N. D. Brault, C. Gao, H. Xue, M. Piliarik, J. Homola, S. Jiang, and Q. Yu. Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto SiO<sub>2</sub> via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media. Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25, 2276.
- [21] A. Menawat, H. Joseph, and R. Siriwardane. Control of surface energy of glass by surface reactions: Contact angle and stability. Journal of Colloid and Interface Science, 1984, 101, 110.
- [22] M. Wei, R. S. Bowman, J. L. Wilson, and N. R. Morrow. Wetting Properties and Stability of Silane-Treated Glass Exposed to Water, Air, and Oil. Journal of Colloid and Interface Science, 1993, 157, 154.
- [23] C. R. Kessel and S. Granick. Formation and characterization of a highly ordered and well anchored alkylsilane monolayer on mica by self-assembly. Langmuir, 1991, 7, 532.
- [24] J. Sagiv. Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. Journal of the American Chemical Society, 1980, 102, 92.
- [25] K. Mathauer and C. W. Frank. Naphthalene chromophore tethered in the constrained environment of a self-assembled monolayer. Langmuir, 1993, 9, 3002.
- [26] E. R. Pohl and F. D. Osterholtz. Molecular Characterization of Composite Interfaces. 1985. p. 157.
- [27] E. P. Plueddemann. Silane Coupling Agents. 2 ed. 1991: Springer US. XIII.
- [28] J. Bortoluzzi, M. P. Bassez, le microscope à force atomique, 2010/2011 , Vol 32 .
- [29] P. Egli, Angles de raccordement et énergie de surface, mars 2008
- [30] A. Safer, introduction à la chimie des surfaces, université des sciences et technologie Oran, 2016, vol 103, p 41.
- [31] <http://www.france-scientifique.fr/produits/analyse-des-surfaces/mesure-dangle-de-contact/> consulté 18 juin 2019
- [32] W.A. Zisman. Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution. Advances in chemistry , 43, 1961, pp 1-51
- [33] S. Wu . Calculation of Interfacial Tension in Polymer Systems , J. Polymer Science, 34, 1971, pp 19-30
- [34] F.K. Hansen, University of Oslo .The Measurement of surface energy of polymer by means of contact angles of liquids on solid surfaces .

- [35] Fowkes, F.M. ; Industrial and Engineering Chemistry , 56 ,12, 40 , (1964)
- [36] V.Oss, C.J. Good, R.J. ; Chaudhury , M.K. ; J. Coll. Inter. Sci , 376 , 111 , (1986)
- [37] D.K. Owens, R.C. Wendt « Estimation of the Surface Free Energy of Polymers », J. Applied Polymer Science. 13, 1969, pp1741-1747
- [38] D.H. Kaelble, . Dispersion-polar surface tension properties of organic solids. J. Adhes. Vol 2 pp 6681, 1970.
- [39] N. Moll , E. Pascal , D. H. Dinh , J.P.Pillot , B.Bennetau ,D. Rebiere , D.Moynet , Y. Mas, D.Mossalayi , J. Pistre , C.D'éjous . A Love wave immunosensor for whole E. coli bacteria detection using an innovative two-step immobilisation approach.2007,Page 2145- 2150
- [40] N.Moll, D.H.Dinh, E.Pascal, C.Déjous1, J.P.Pillot, B.Bennetau , D.Rebière1, D.Moynet, Y. Mas, and J. Pistré,Laboratoire IXL, 351, cours de la Libération, Université Bordeaux 1, Talence, 33405, France
- [41] Y.L. George, A.Essex , T. B. John , V.Datta , H. M . Hoffman, J.F. Bastian , J. Fierer , V.Nizet , *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity , publié le 11 juillet 2005 .
- [42]K .B. D.Harmsen, A. Mellmann, C. Meier , P.Schumann, G.Peters, et C.V. Eiff , Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species.journal of Clinical Microbiology , 2004, 42(11),p 4988-4995.
- [43]J.Kluytmans,A.V. Belkum,et H.Verbrugh , Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* :epidemiology ,underlying mechanisms ,and associated risks.Clinical Microbiology Reviews , (1997), 10(3),p 505-520.
- [44] J.Bockaert , J.Odile , La communication de vivant , 2017 , p 87
- [45]S.DaddiOubekka ,Dynamique réactionnelle d'antibiotiques ausein des biofilms de *Staphylococcus aureus*:apport de la microscopie de fluorescence multimodale , 2012, p 15
- [46]T.J.Foster et M.Hook, surface protein adhesions of *Staphylococcus aureus* ,Trends in microbiology,1998 ;vol 12.
- [47]T.J.Foster ,adhesion, invasion and evasion : the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*,2014,



## 1. protocoles de modifications chimiques des surfaces

### Protocole 1

Une solution de APTS de concentration  $C_{\text{APTS}}=0.1 \text{ M}$  est préparé dans une fiole de  $V=25\text{mL}$  en utilisant les calculs suivants.

Calcul de la masse d'APTS :

$C_{\text{APTS}}=0.1 \text{ M}$

$V=25 \text{ mL} = 2.5 \times 10^{-2} \text{ L}$

On a  $n=C V$  }  $m=MC$

$n=m/M$  }

AN :  $m=221.37 \times 0.1 \times 2.5 \times 10^{-2}$  donc  $m=0.5534\text{g}$

$\rho=m/V$  donc  $V=m/\rho$

AN :  $V=0.5534/0.946$  Donc  $V=0.585\text{mL}$

3 lames en verre sont immergées dans une solution de  $C_{\text{APTS}}=0.1 \text{ M}$  pendant divers durées (1h ; 2h et 4h) dans des boîtes de pétries, les mêmes conditions de température et d'humidité, tel que :

Lame 1 pour 1h

Lame 2 pour 2h

Lame 3 pour 4h

Ensuite, les lames sont rincées au dichlorométhane 2 fois puis séchées à l'air libre.[1 modifié].

### Protocole 2

Une solution de APTS à partir d'un volume  $V_{\text{APTS}}=0.1\text{mL}$  dans une fiole de 10ml est préparée

On met 3 lames dans les boîtes de pétries, tel que:

Lame 4 pour 1h

Lame 5 pour 2h

Lame 6 pour 4h

Dans les mêmes conditions de température et d'humidité, ensuite rinçage des lames deux fois par le dichlorométhane.[1 modifié]

Calcule de la concentration d'APTS pour un volume de 0.1 ml dans un volume totale de 10 ml :

On a  $n=C V$  ; donc  $C=n/V$  ; D'autre part on a  $n=m/M$  donc  $C=m/(M V)$ .

Calcule de la masse d'APTS :

$C=n/V =m/MV$  ;

On a  $n=m/V$  ; donc  $m=n V$  ;

AN:  $m=0.946 \times 0.1$ ;  $m=0.0946g$

Donc  $C=m /MV$ ;

AN:  $C=0.0946/(221.37 \times 10 \times 10^{-3})$  ;  $C =0.043 M$

### Protocole 3

Une solution APTS de concentration 0.043 M est préparée. Les lames (Lame 7,Lame 8,Lame 9,Lame 10) sont mises dans des boîtes de pétries pour 1h, 2h ,4h et 24h successivement dans un volume de 25ml de la solution APTS préparée.

Les lames sont rincées deux fois par le dichlorométhane puis séchées à l'air libre. [1modifié].

### Protocole 4

Préparation des lames de verre, de l'or et de silicium oxygéné par le rinçage dans l'éthanol et les US pour 1h à température ambiante.

#### Solution 1 : solution non acide :

Nous avons préparé une solution de 1% APTS dans une fiole de 100 ml.

Les lames(lame13, lame14,lame15,la lame 16) sont mis en solutions APTS 1% pour des temps respectifs de 1h, 2h ,4h et 24h.

les lames sont rincées ensuite au dichlorométhane, ensuite mises dans l'éthanol aux US pour 20 min puis séchage à l'air libre.

#### Solution 2 : solution acide

Préparation de la solution acide est composé de à partir d'une solution APTS 1%, et une solution d'acide acétique 1M.

- Préparation de la solution : APTS 1%

Dans une fiole de 50 ml, on met 0,5 ml de APTS et on ajoute le toluène jusqu'à 50 ml

$\left. \begin{array}{l} 1 \text{ mL APTS} \rightarrow 100 \text{ mL solution} \\ V_{\text{APTS}} \rightarrow 50 \text{ mL solution} \end{array} \right\} V_{\text{APTS}} = 0,5 \text{ mL}$
---

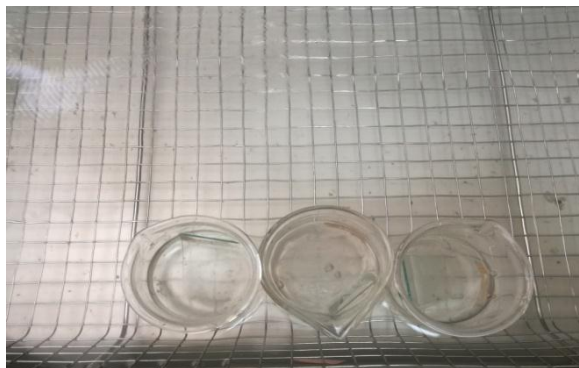
- Préparation de la solution acide 1M  
On prépare une solution d'acide acétique à 1M.  
Dans une fiole de 100ml, une masse calculée d'acide est mise avec de l'eau distillée jusqu'à trait de jauge.

On a $n = C V$	
AN : $n = 1 \times 10^{-3} \times 100$	donc $n = 0,1 \text{ mol}$
On a $d = m/V$	donc $m = d / V$
Et d'autre part $n = m/M$	} $V = n M/d$
AN: $V = (0,1 \times 60,05) / 1,049$	$V = 5,724 \text{ ml}$
On a $d = m/V \rightarrow m = d V$	
AN : $m = 1,049 \times 5,724$ donc $m = 6,004 \text{ g}$ masse d'acide	

- Préparation de solution 2

Dans une fiole de 10ml, nous avons mis un volume  $V_{\text{acide}} = 50 \mu\text{l}$  par micropipette de solution acide et complété par la solution APTS 1%. Nous avons placé les lames (Lame 16, Lame 17 et Lame 18) pendant 1h, 2h et 4h successivement.

Le rinçage se fait au Dichlorométhane, acétone, puis dans l'éthanol à l'ultra son pour 20min. [2 modifié]



**Figure.1.** Rinçage des lames aux ultrasons(US) dans l'éthanol.

## Protocole 5

Préparation de la solution APTS 1% acide et non acide, (cité dans le protocole 4) le temps de pose des lames (Lames 19, 20, 21 et 22) pour 24h, et (23, 24, 25 et 26) est de 4h. Alors que les lames 27, 28, 29 et 30 pour 2h et les lames 31, 32, 33 et 34 pour 1h (détaillée dans le tableau 1).

**Tableau.1.** Présentation des lames de verre et le protocole appliqué sur chacune.

		1h	2h	4h	24h
Solution APTS 1% + Acide	Avec US	31	27	23	19
	Sans US	32	28	24	20
Solution APTS 1%	Avec US	33	29	25	21
	Sans US	34	30	26	22

## 2. Protocoles de modifications biologiques des surfaces

### Protocole de la culture bactérienne

Parmi les techniques fréquemment employées, nous trouvons l'ensemencement d'une souche en boîte de pétri ou tube à essai : L'ensemencement s'agit de placer des bactéries à la surface d'une gélose (gélose de Chapman) par une anse de platine. Alors que la culture dans un tube à essai, nous plaçons par la pipette de pasteur ou l'anse de platine les bactéries prises de la souche dans un bouillon BHIB. Après, elles seront incubées dans l'étuve pendant 24h à une température  $T = 37^{\circ} \text{C}$ . finalement, nous les conservons dans le réfrigérateur ( $T = 20^{\circ} \text{C}$ ).

### Protocole de préparations de la solution tampon PBS

La solution tampon PBS sert à empêcher la prolifération d'autres bactéries et réaliser une saturation de la surface en jouant le rôle d'un isolateur. cette solution est stockée au réfrigérateur jusqu'à utilisation.

Pour 250mL de PBS nous avons besoin de :

0.282g de mono sodique  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

0.967g de di sodique  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

2.125g de Na Cl

250 ml d'eau distillée (fiolle de 250ml)

### Protocole de la préparation de la solution anticorps

Une solution d'anticorps de concentration  $50 \mu\text{g/mL}$  [3] est préparée dans la solution tampon puis stockée à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

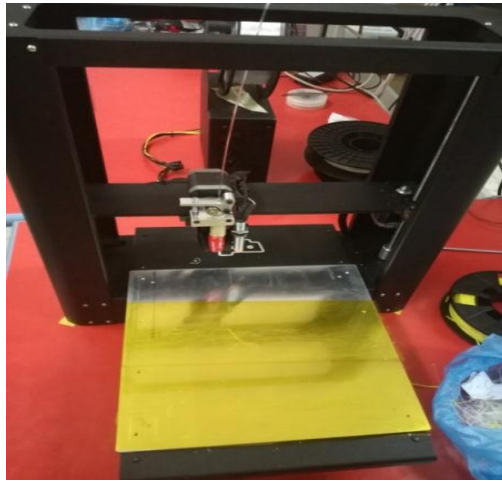
Un agent de couplage DCC peut être ajouté en très faible quantité pour accélérer la réaction anticorps-APTS.

## Références

- [1] N. Moll , E. Pascal , D. H. Dinh , J.P.Pillot , B.Bennetau ,D. Rebiere , D.Moynet , Y. Mas, D.Mossalayi , J. Pistre , C.Déjous.A Love wave immunosensor for whole E. coli bacteria detection using an innovative two-step immobilisation approach.2007,Page 2145-2150
- [2]V.V.Tsukruk, I.Luzinov, and D.JulthongpiputCollege of Engineering & Applied Sciences, W.MichiganUniversity,Kalamazoo, Michigan 49008. Sticky Molecular Surfaces: Epoxysilane Self-AssembledMonolayersReceived November 23, 1998. In Final Form: March 3, 1999
- [3] N.Moll, D.H.Dinh, E.Pascal, C.Déjous<sup>1</sup>, J.P.Pillot, B.Bennetau , D.Rebière<sup>1</sup>, D.Moynet, Y. Mas, and J. Enhancement of Antibody Binding on SiO<sub>2</sub> Love Wave Sensor Surface using (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane ,2006 Vol. 915

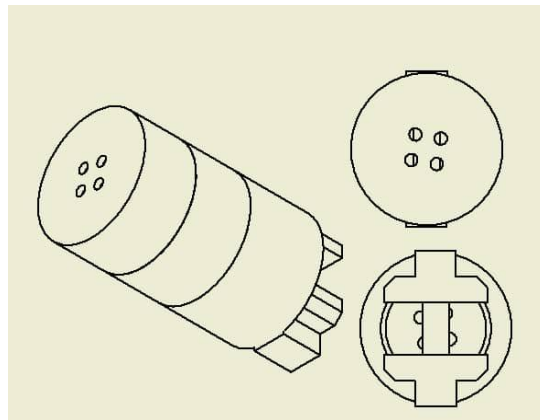
## 1. L'imprimante 3 dimensions

C'est la fabrication de pièces en volume par ajout ou agglomération de matière, elle permet de réaliser un objet réel et dessiner l'objet 3D grâce à un outil de conception assistée par ordinateur (CAO). L'imprimante 3D (*Figure1*) reste proche de celui d'une imprimante 2D classique avec une grande différence qui est l'empilement des couches qui crée le volume. Le désigne a été réalisé sur le logiciel Autodesk Inventor en prenant les mesures avec un pied de coulisse.

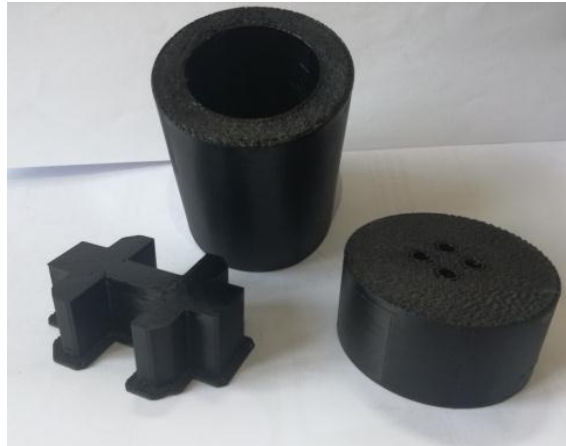


**Fig.1.**L'imprimante 3D.

Pour obtenir la forme finale du capteur, on a eu recours à la fabrication de trois pièces (*Figure2*) séparément a fin de lancer l'impression (*Figure 3*)

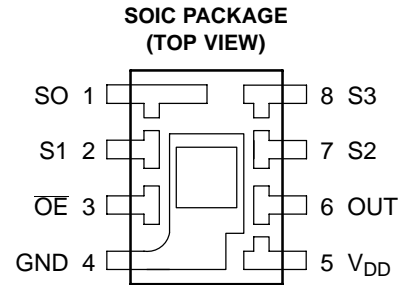


**Fig.2.**Le désigne du capteur sur le logiciel Autodesk Inventor.



**Fig.3.**Le résultat de l'imprimante 3D.

- High-Resolution Conversion of Light Intensity to Frequency
- Programmable Color and Full-Scale Output Frequency
- Communicates Directly With a Microcontroller
- Single-Supply Operation (2.7 V to 5.5 V)
- Power Down Feature
- Nonlinearity Error Typically 0.2% at 50 kHz
- Stable 200 ppm/°C Temperature Coefficient
- Low-Profile Surface-Mount Package

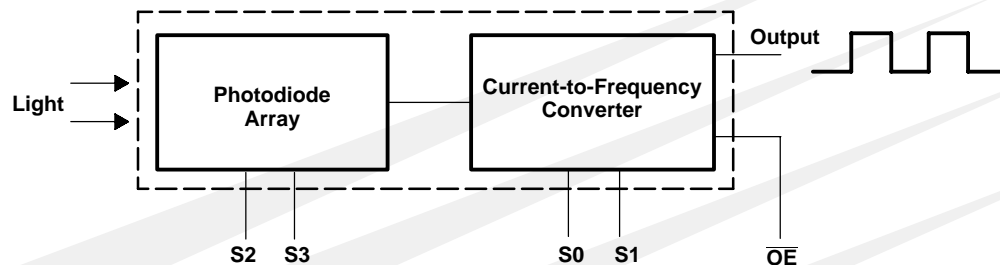


## Description

The TCS230 programmable color light-to-frequency converter combines configurable silicon photodiodes and a current-to-frequency converter on single monolithic CMOS integrated circuit. The output is a square wave (50% duty cycle) with frequency directly proportional to light intensity (irradiance). The full-scale output frequency can be scaled by one of three preset values via two control input pins. Digital inputs and digital output allow direct interface to a microcontroller or other logic circuitry. Output enable ( $\overline{OE}$ ) places the output in the high-impedance state for multiple-unit sharing of a microcontroller input line.

The light-to-frequency converter reads an 8 x 8 array of photodiodes. Sixteen photodiodes have blue filters, 16 photodiodes have green filters, 16 photodiodes have red filters, and 16 photodiodes are clear with no filters. The four types (colors) of photodiodes are interdigitated to minimize the effect of non-uniformity of incident irradiance. All 16 photodiodes of the same color are connected in parallel and which type of photodiode the device uses during operation is pin-selectable. Photodiodes are 120  $\mu\text{m}$  x 120  $\mu\text{m}$  in size and are on 144- $\mu\text{m}$  centers.

## Functional Block Diagram





# TCS230 PROGRAMMABLE COLOR LIGHT-TO-FREQUENCY CONVERTER

TAOS046 – JANUARY 2003

## Terminal Functions

TERMINAL NAME	NO.	I/O	DESCRIPTION
GND	4		Power supply ground. All voltages are referenced to GND.
$\overline{OE}$	3	I	Enable for $f_o$ (active low).
OUT	6	O	Output frequency ( $f_o$ ).
S0, S1	1, 2	I	Output frequency scaling selection inputs.
S2, S3	7, 8	I	Photodiode type selection inputs.
$V_{DD}$	5		Supply voltage

Table 1. Selectable Options

S0	S1	OUTPUT FREQUENCY SCALING ( $f_o$ )	S2	S3	PHOTODIODE TYPE
L	L	Power down	L	L	Red
L	H	2%	L	H	Blue
H	L	20%	H	L	Clear (no filter)
H	H	100%	H	H	Green

## Available Options

DEVICE	$T_A$	PACKAGE – LEADS	PACKAGE DESIGNATOR	ORDERING NUMBER
TCS230	-25°C to 85°C	SOIC-8	D	TCS230D

## Absolute Maximum Ratings over operating free-air temperature range (unless otherwise noted)†

Supply voltage, $V_{DD}$ (see Note 1)	6 V
Input voltage range, all inputs, $V_I$	-0.3 V to $V_{DD} + 0.3$ V
Operating free-air temperature range, $T_A$	0°C to 70°C
Storage temperature range	-25°C to 85°C
Lead temperature 1,6 mm (1/16 inch) from case for 10 seconds	260°C

† Stresses beyond those listed under “absolute maximum ratings” may cause permanent damage to the device. These are stress ratings only, and functional operation of the device at these or any other conditions beyond those indicated under “recommended operating conditions” is not implied. Exposure to absolute-maximum-rated conditions for extended periods may affect device reliability.

NOTE 1: All voltage values are with respect to GND.

## Recommended Operating Conditions

	MIN	NOM	MAX	UNIT
Supply voltage, $V_{DD}$	2.7	5	5.5	V
High-level input voltage, $V_{IH}$	$V_{DD} = 2.7$ V to 5.5 V		2	$V_{DD}$
Low-level input voltage, $V_{IL}$	$V_{DD} = 2.7$ V to 5.5 V		0	0.8
Operating free-air temperature range, $T_A$	0		70	°C

**TCS230**  
**PROGRAMMABLE**  
**COLOR LIGHT-TO-FREQUENCY CONVERTER**

TAOS046 – JANUARY 2003

**Electrical Characteristics at  $T_A = 25^\circ\text{C}$ ,  $V_{DD} = 5\text{ V}$  (unless otherwise noted)**

PARAMETER		TEST CONDITIONS	MIN	TYP	MAX	UNIT
$V_{OH}$	High-level output voltage	$I_{OH} = -4\text{ mA}$	4	4.5		V
$V_{OL}$	Low-level output voltage	$I_{OL} = 4\text{ mA}$		0.25	0.40	V
$I_{IH}$	High-level input current				5	$\mu\text{A}$
$I_{IL}$	Low-level input current				5	$\mu\text{A}$
$I_{DD}$	Supply current	Power-on mode		2	3	mA
		Power-down mode		7	15	$\mu\text{A}$
	Full-scale frequency (See Note 2)	$S0 = H, S1 = H$	500	600		kHz
		$S0 = H, S1 = L$	100	120		kHz
		$S0 = L, S1 = H$	10	12		kHz
	Temperature coefficient of output frequency	$\lambda \leq 700\text{ nm}, -25^\circ\text{C} \leq T_A \leq 70^\circ\text{C}$		$\pm 200$		ppm/ $^\circ\text{C}$
$k_{SVS}$	Supply voltage sensitivity	$V_{DD} = 5\text{ V} \pm 10\%$		$\pm 0.5$		%/V

NOTE 2: Full-scale frequency is the maximum operating frequency of the device without saturation.

# TCS230 PROGRAMMABLE COLOR LIGHT-TO-FREQUENCY CONVERTER

TAOS046 – JANUARY 2003

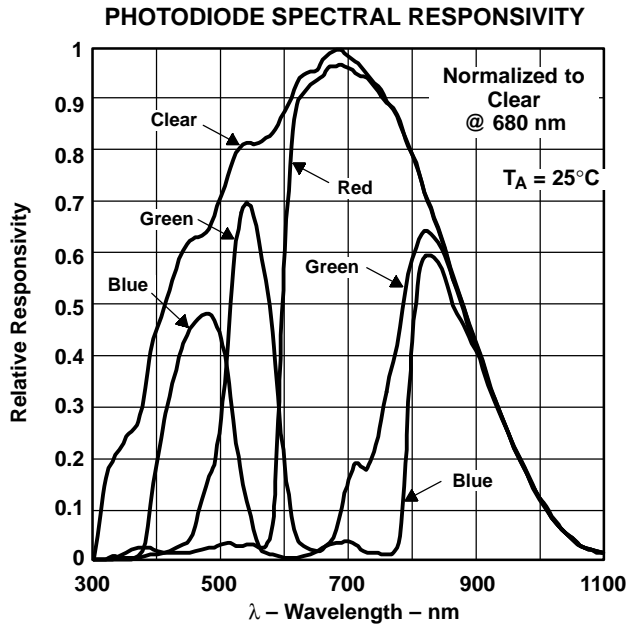
Operating Characteristics at  $V_{DD} = 5\text{ V}$ ,  $T_A = 25^\circ\text{C}$ ,  $S_0 = \text{H}$ ,  $S_1 = \text{H}$  (unless otherwise noted)  
(See Notes 3, 4, 5, 6, and 7).

PARAMETER	TEST CONDITIONS	CLEAR PHOTODIODE S2 = H, S3 = L			BLUE PHOTODIODE S2 = L, S3 = H			GREEN PHOTODIODE S2 = H, S3 = H			RED PHOTODIODE S2 = L, S3 = L			UNIT
		MIN	TYP	MAX	MIN	TYP	MAX	MIN	TYP	MAX	MIN	TYP	MAX	
$f_o$ Output frequency	$E_e = 45.6\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , $\lambda_p = 470\ \text{nm}$	16	20	24	11.2	16.4	21.6							kHz
	$E_e = 39.2\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , $\lambda_p = 524\ \text{nm}$	16	20	24				8	13.6	19.2				kHz
	$E_e = 32.8\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , $\lambda_p = 635\ \text{nm}$	16	20	24							14	19	24	kHz
	$E_e = 0$		2	12		2	12		2	12		2	12	Hz
$R_e$ Irradiance responsivity (Note 8)	$\lambda_p = 470\ \text{nm}$		439			360			88			31		Hz/ ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )
	$\lambda_p = 524\ \text{nm}$		510			189			347			46		
	$\lambda_p = 565\ \text{nm}$		548			49			318			110		
	$\lambda_p = 635\ \text{nm}$		610			30			37			579		
Saturation Irradiance (Note 9)	$\lambda_p = 470\ \text{nm}$		1370			1670								$\mu\text{W}/\text{cm}^2$
	$\lambda_p = 524\ \text{nm}$		1180						1730					
	$\lambda_p = 565\ \text{nm}$		1090						1890					
	$\lambda_p = 635\ \text{nm}$		980								1040			
$R_v$ Illuminance responsivity (Note 10)	$\lambda_p = 470\ \text{nm}$		585			480			117			41		Hz/ lx
	$\lambda_p = 524\ \text{nm}$		98			36			67			9		
	$\lambda_p = 565\ \text{nm}$		92			8			53			18		
	$\lambda_p = 635\ \text{nm}$		407			20			25			386		
Nonlinearity (Note 11)	$f_o = 0$ to 5 kHz		$\pm 0.1\%$			$\pm 0.1\%$			$\pm 0.1\%$			$\pm 0.1\%$		% F.S.
	$f_o = 0$ to 50 kHz		$\pm 0.2\%$			$\pm 0.2\%$			$\pm 0.2\%$			$\pm 0.2\%$		% F.S.
	$f_o = 0$ to 500 kHz		$\pm 0.5\%$			$\pm 0.5\%$			$\pm 0.5\%$			$\pm 0.5\%$		% F.S.
Recovery from power down			100			100			100			100		$\mu\text{s}$
Response time to output enable (OE)			100			100			100			100		ns

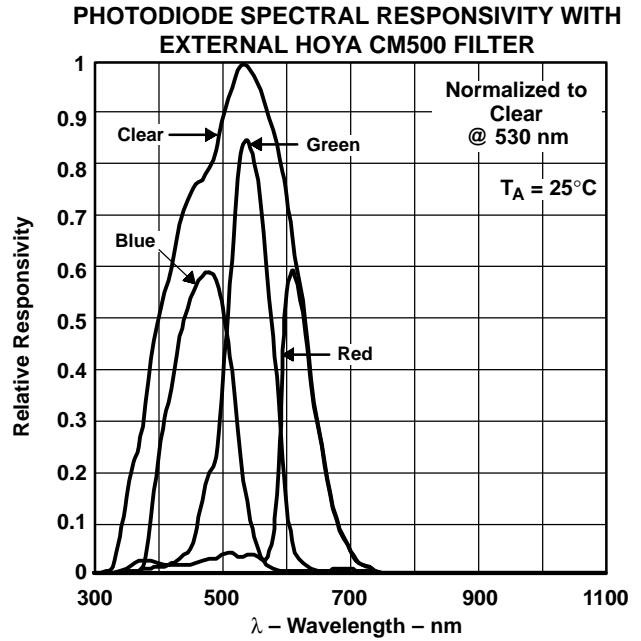
- NOTES:
- Optical measurements are made using small-angle incident radiation from a light-emitting diode (LED) optical source.
  - The 470 nm input irradiance is supplied by an InGaP light-emitting diode with the following characteristics: peak wavelength  $\lambda_p = 470\ \text{nm}$ , spectral halfwidth  $\Delta\lambda_{1/2} = 35\ \text{nm}$ , and luminous efficacy = 75 lm/W.
  - The 524 nm input irradiance is supplied by an InGaP light-emitting diode with the following characteristics: peak wavelength  $\lambda_p = 524\ \text{nm}$ , spectral halfwidth  $\Delta\lambda_{1/2} = 47\ \text{nm}$ , and luminous efficacy = 520 lm/W.
  - The 565 nm input irradiance is supplied by a GaP light-emitting diode with the following characteristics: peak wavelength  $\lambda_p = 565\ \text{nm}$ , spectral halfwidth  $\Delta\lambda_{1/2} = 28\ \text{nm}$ , and luminous efficacy = 595 lm/W.
  - The 635 nm input irradiance is supplied by a AlInGaP light-emitting diode with the following characteristics: peak wavelength  $\lambda_p = 635\ \text{nm}$ , spectral halfwidth  $\Delta\lambda_{1/2} = 17\ \text{nm}$ , and luminous efficacy = 150 lm/W.
  - Irradiance responsivity  $R_e$  is characterized over the range from zero to 5 kHz.
  - Saturation irradiance = (full-scale frequency)/(irradiance responsivity).
  - Illuminance responsivity  $R_v$  is calculated from the irradiance responsivity by using the LED luminous efficacy values stated in notes 4, 5, and 6 and using  $1\ \text{lx} = 1\ \text{lm}/\text{m}^2$ .
  - Nonlinearity is defined as the deviation of  $f_o$  from a straight line between zero and full scale, expressed as a percent of full scale.



**TYPICAL CHARACTERISTICS**



**Figure 1**



**Figure 2**

# TCS230 PROGRAMMABLE COLOR LIGHT-TO-FREQUENCY CONVERTER

TAOS046 – JANUARY 2003

## APPLICATION INFORMATION

### Power supply considerations

Power-supply lines must be decoupled by a 0.01- $\mu$ F to 0.1- $\mu$ F capacitor with short leads mounted close to the device package.

### Input interface

A low-impedance electrical connection between the device  $\overline{OE}$  pin and the device GND pin is required for improved noise immunity.

### Output interface

The output of the device is designed to drive a standard TTL or CMOS logic input over short distances. If lines greater than 12 inches are used on the output, a buffer or line driver is recommended.

### Photodiode type (color) selection

The type of photodiode (blue, green, red, or clear) used by the device is controlled by two logic inputs, S2 and S3 (see Table 1).

### Output frequency scaling

Output-frequency scaling is controlled by two logic inputs, S0 and S1. The internal light-to-frequency converter generates a fixed-pulsewidth pulse train. Scaling is accomplished by internally connecting the pulse-train output of the converter to a series of frequency dividers. Divided outputs are 50%-duty cycle square waves with relative frequency values of 100%, 20%, and 2%. Because division of the output frequency is accomplished by counting pulses of the principal internal frequency, the final-output period represents an average of the multiple periods of the principle frequency.

The output-scaling counter registers are cleared upon the next pulse of the principal frequency after any transition of the S0, S1, S2, S3, and  $\overline{OE}$  lines. The output goes high upon the next subsequent pulse of the principal frequency, beginning a new valid period. This minimizes the time delay between a change on the input lines and the resulting new output period. The response time to an input programming change or to an irradiance step change is one period of new frequency plus 1  $\mu$ S. The scaled output changes both the full-scale frequency and the dark frequency by the selected scale factor.

The frequency-scaling function allows the output range to be optimized for a variety of measurement techniques. The scaled-down outputs may be used where only a slower frequency counter is available, such as low-cost microcontroller, or where period measurement techniques are used.

### Measuring the frequency

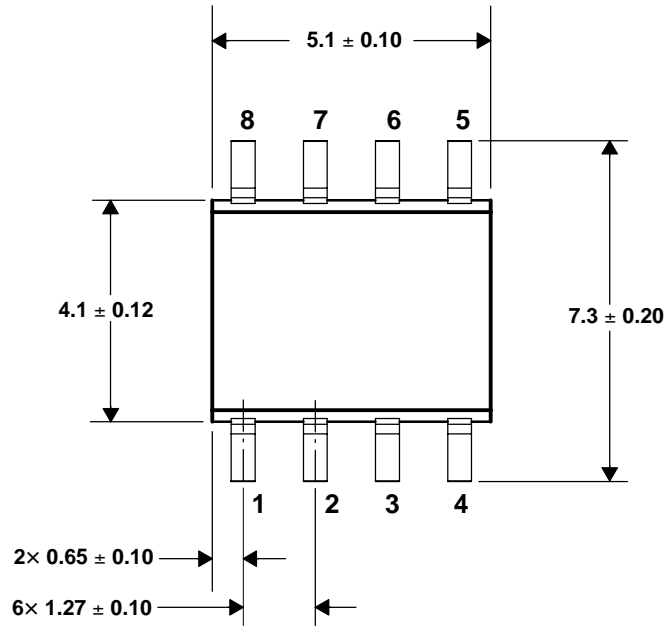
The choice of interface and measurement technique depends on the desired resolution and data acquisition rate. For maximum data-acquisition rate, period-measurement techniques are used.

Output data can be collected at a rate of twice the output frequency or one data point every microsecond for full-scale output. Period measurement requires the use of a fast reference clock with available resolution directly related to reference clock rate. Output scaling can be used to increase the resolution for a given clock rate or to maximize resolution as the light input changes. Period measurement is used to measure rapidly varying light levels or to make a very fast measurement of a constant light source.

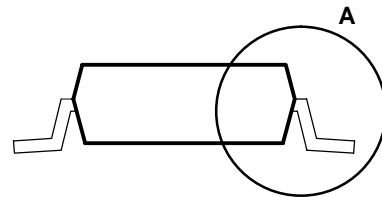
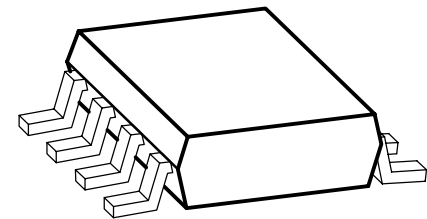
Maximum resolution and accuracy may be obtained using frequency-measurement, pulse-accumulation, or integration techniques. Frequency measurements provide the added benefit of averaging out random- or high-frequency variations (jitter) resulting from noise in the light signal. Resolution is limited mainly by available counter registers and allowable measurement time. Frequency measurement is well suited for slowly varying or constant light levels and for reading average light levels over short periods of time. Integration (the accumulation of pulses over a very long period of time) can be used to measure exposure, the amount of light present in an area over a given time period.

**MECHANICAL INFORMATION**

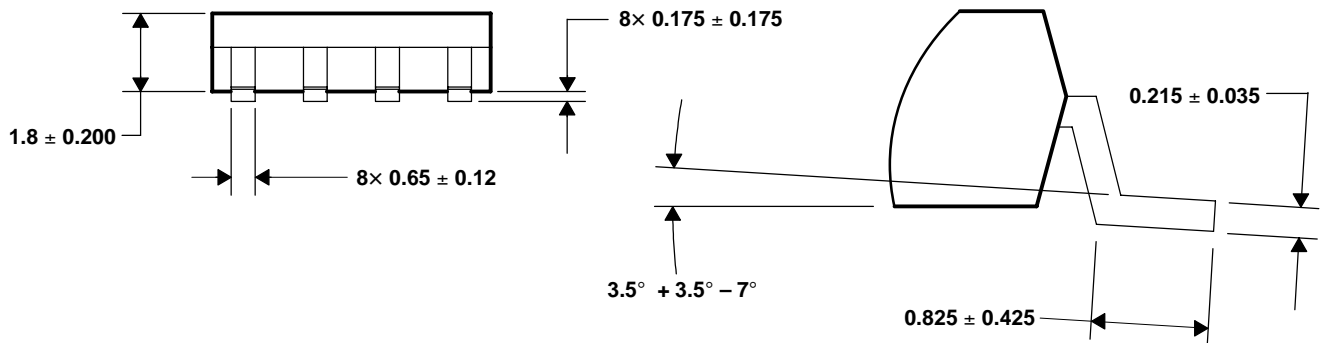
**PACKAGE D**



**PLASTIC SMALL-OUTLINE PACKAGE**



**DETAIL A**



- NOTES: A. All linear dimensions are in millimeters.  
 B. Package is molded with an electrically nonconductive clear plastic compound having an index of refraction of 1.55.  
 C. Actual product will vary within the mechanical tolerances shown on this specification. Designs for use of this product **MUST** allow for the data sheet tolerances.  
 D. Pin 4 (GND) is mechanically connected to the die mount pad.  
 E. The 8 × 8 photodiode array area is 1.15 mm × 1.15 mm (1.33 sq. mm).  
 F. This drawing is subject to change without notice.

**Figure 3. TCS230 Mechanical Specifications**

# TCS230 PROGRAMMABLE COLOR LIGHT-TO-FREQUENCY CONVERTER

TAOS046 – JANUARY 2003

---

**PRODUCTION DATA** — information in this document is current at publication date. Products conform to specifications in accordance with the terms of Texas Advanced Optoelectronic Solutions, Inc. standard warranty. Production processing does not necessarily include testing of all parameters.

## **NOTICE**

Texas Advanced Optoelectronic Solutions, Inc. (TAOS) reserves the right to make changes to the products contained in this document to improve performance or for any other purpose, or to discontinue them without notice. Customers are advised to contact TAOS to obtain the latest product information before placing orders or designing TAOS products into systems.

TAOS assumes no responsibility for the use of any products or circuits described in this document or customer product design, conveys no license, either expressed or implied, under any patent or other right, and makes no representation that the circuits are free of patent infringement. TAOS further makes no claim as to the suitability of its products for any particular purpose, nor does TAOS assume any liability arising out of the use of any product or circuit, and specifically disclaims any and all liability, including without limitation consequential or incidental damages.

TEXAS ADVANCED OPTOELECTRONIC SOLUTIONS, INC. PRODUCTS ARE NOT DESIGNED OR INTENDED FOR USE IN CRITICAL APPLICATIONS IN WHICH THE FAILURE OR MALFUNCTION OF THE TAOS PRODUCT MAY RESULT IN PERSONAL INJURY OR DEATH. USE OF TAOS PRODUCTS IN LIFE SUPPORT SYSTEMS IS EXPRESSLY UNAUTHORIZED AND ANY SUCH USE BY A CUSTOMER IS COMPLETELY AT THE CUSTOMER'S RISK.

LUMENOLOGY is a registered trademark, and TAOS, the TAOS logo, and Texas Advanced Optoelectronic Solutions are trademarks of Texas Advanced Optoelectronic Solutions Incorporated.