

Développement d'un laboratoire sur puce intégrant un microcapteur électrochimique pour la détection des micropolluants dans l'eau

Rezgui. A¹, Madec. M¹, Lallement. C¹, Haiech. J²

¹Laboratoire des sciences de l'Ingénieur, de l'Informatique et de l'Imagerie (ICUBE), Université de strasbourg

²Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (LIT), Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg

RESUME - L'article décrit le développement de laboratoires sur puce pour la détection de micropolluants dans l'eau potable. Le système cible des composés spécifiques et de très faibles quantités, contenues dans les eaux polluées. Pour cela, nous nous intéressons au développement des méthodes de conception de circuits microfluidiques, à l'intégration des biotechnologies et au développement de différents capteurs. Cette première application est basée sur des capteurs de pH de type ISFET pour mesurer la concentration ions H⁺ libérés suite à une réaction biologique avec la molécule cible. Nous présenterons un modèle de haut niveau permettant de simuler le comportement du laboratoire sur puce complet. Pour le réaliser, une modélisation compacte du capteur, des circuits microfluidiques et la biologie des systèmes mis en jeux est effectuée. Des premiers résultats de simulation et validation expérimentale seront présentés.

Mots-clés—Lab-On-Chip, Analyse de l'eau, système micro-fluidique, ISFET, réaction enzymatique, modélisation compacte.

1. INTRODUCTION

Les laboratoires sur puce (appelé LOC pour la suite) s'inscrivent à l'interface entre la biologie et les autres domaines des sciences de l'ingénieur. Ils intègrent et miniaturisent des systèmes visant à réaliser un protocole de mesure impliquant les analyses chimiques et biologiques. Son principe consiste à faire circuler des faibles quantités de réactifs en suivant un protocole d'analyse: préparation d'échantillon, réaction, séparation et détection [1]. C'est un microsystème cohabitant des physiques différentes (fluidique, biologique, électronique). Ils ouvrent de nouvelles voies pour la compréhension du vivant et pour des applications médicales/pharmaceutique, ainsi que de nouvelles applications d'environnement [2].

Malgré les nombreux efforts, les LOC ayant atteint la maturité pour une industrialisation sont rares. Leur conception reste difficile. L'amélioration des technologies doit donc s'accompagner du développement de méthodologies de conception robustes et des outils associés. L'idée serait de proposer des outils et des méthodes génériques pour la conception des LOC. C'est dans ce cadre que s'inscrivent nos travaux. Notre objectif est de proposer une boîte à outils de modèles compacts permettant de concevoir, par prototypage virtuel et par modélisation, un LOC répondant à une spécification donnée. La modélisation de ces microsystèmes est difficile, car ils couvrent différentes physiques chacun

d'eux ayant leurs propres outils et langages. De plus, les interactions entre les domaines ne sont pas toujours triviales. Des simulateurs puissants existent dans chaque domaine physique; le circuit micro-fluidique, par exemple, est modélisé par des FEM. Or, la simulation fluidique n'occupe qu'une partie du LOC et il existe un couplage fort avec le reste du système qui n'est pas évident à prendre en compte en FEM. Les modèles analytiques sont une alternative intéressante. Nous avons choisi le langage VHDL-AMS, comme support pour la modélisation, dans la mesure où: (i) son efficacité pour la modélisation multi-domaine au niveau système est prouvée, (ii) un formalisme pour décrire de mécanismes biologiques a été développé dans [3], (iii) Voigt et al. ont prouvé qu'il pouvait être adapté pour la fluidique.

Dans cet article, nous présenterons notre laboratoire sur puce d'étude. Ensuite, nous détaillerons les différents modèles compacts pour le capteur, la micro fluidique et la biologie. Enfin, ils seront assemblés de façon à obtenir le modèle haut niveau du laboratoire sur puce et les premiers résultats de simulation et validation expérimentale seront présentés.

2. LABORATOIRE SUR PUCE D'ETUDE

Aujourd'hui, l'émergence de applications industrielles potentiellement polluantes, ont poussé les autorités à renforcer les contrôles. Les nouvelles normes exigent la détection des faibles concentrations de micropolluants (bactéries, pesticides, médicaments), de l'ordre du $\mu\text{g.l}^{-1}$ dans l'eau. Dans ce contexte, la fig.1 présente notre laboratoire sur puce pour la détection de micropolluants (molécule cible) dans l'eau, montrant l'hétérogénéité de ses composantes. Il se compose de quatre sous-systèmes de natures différentes :

- (i) un réseau de micro-fluidique qui stocke et transporte des différents réactifs,
- (ii) une réaction biochimique produisant des espèces chimiques qui peuvent être détectées (dans cet exemple, les espèces chimiques conduisent à une variation du pH de la solution),
- (iii) un système de détection électrochimique (un capteur ISFET) avec l'électronique conditionnement associé.
- (iv) un séquenceur qui commande le système micro-fluidique et électronique en conformité avec le protocole de mesure.

A l'issue de l'incubation, le ratio entre le nombre d'anticorps lié à une cible et ceux liés à un ensemble cible-enzyme est directement en rapport avec la concentration de cible que l'on veut mesurer.

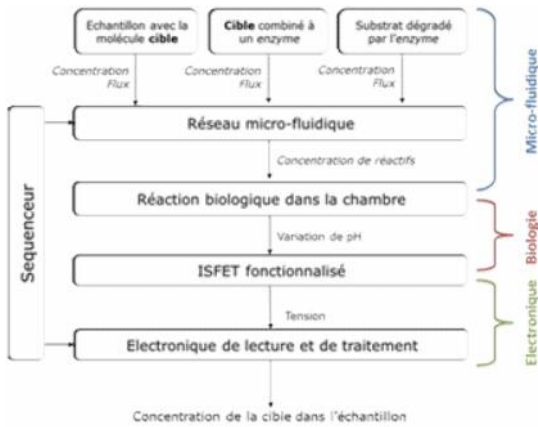


Fig.1 Laboratoire de puce étudié pour l'analyse de l'eau

Le système biologique ici est un ensemble de réactions chimiques provoquant une modification du pH. Il est basé sur une méthode de dosage immuno-enzymatique (ELISA) compétitif. Ce test est utilisé pour détecter la présence d'une substance, généralement un antigène, dans un échantillon. Il est basé sur une réaction compétitive entre un composé cible et le même composé couplé à une enzyme et leur reconnaissance par un anticorps spécifique. La séquence du test ELISA est la suivante:

- (i) L'échantillon contenant le composé cible et le composé cible avec enzyme sont introduit dans la chambre de réaction et peuvent se lier à des anticorps déposés sur la surface du capteur.
- (ii) Au cours de la phase d'incubation, une réaction compétitive se produit au cours de laquelle l'échantillon, et le composé cible avec l'enzyme se lient aux anticorps.
- (iii) La chambre est rincée pour évacuer les molécules qui n'ont pas pu se fixer.
- (iv) Un substrat est ajouté et réagit avec l'enzyme lié à la substance cible afin de générer un signal mesurable, ici une variation de pH, provoqué par la réaction enzymatique. Cette variation est d'autant plus rapide que le ratio de complexe enzyme-cible lié aux anticorps est grand, et donc que la concentration en cible seul est faible.

Les avantages de ce procédé consistent à sa spécificité et sa sensibilité. Cette technique est générique, dans le sens où elle est applicable à tout autre molécule cible; il suffit alors de choisir l'anticorps qui lui est spécifique. Le système complet avec les différentes réactions est résumé dans la Fig. 3.

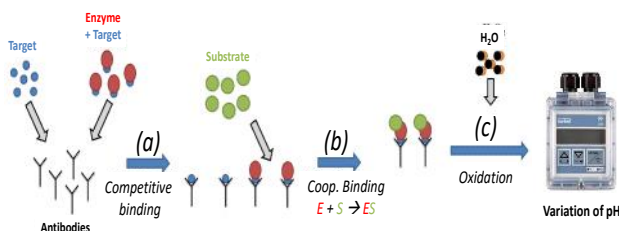


Fig.2 Description du système biologique

Le circuit micro-fluidique sert à acheminer les réactifs grâce à un microsystème de pompage et en fonction du protocole choisi. Il assure un mélange homogène dans la

chambre de mesure pendant la durée d'incubation. La chambre de mesure en contact avec l'ISFET. Le système de transduction, quant à lui, consiste à convertir une quantité biochimique (concentration d'une espèce donnée) en une grandeur électrique [3]. Plusieurs approches de transduction sont utilisables; elles peuvent être directes ou indirectes. Dans une détection directe, la composition chimique de la solution modifie les propriétés électriques d'un dispositif. Plusieurs solutions existent : mesure électriques (variation de la conductivité), mesure magnétique au travers de GMR (Giant Magneto-resistors) [4], mesure electro-chimiques (variation de pH mesurée par un ISFET [5]). Pour la mesure indirecte, les informations chimiques sont d'abord récupérées avant d'être mesurées électriquement. Par exemple, la concentration de la cible dans une solution peut modifier ses propriétés optiques (fluorescence dans la plupart des cas) et les propriétés sont détectées par le capteur optoélectronique [3]. Les dispositifs mécaniques et des capteurs piézo-électriques peuvent également être une alternative pour détecter les espèces biochimiques [6].

Le séquenceur, au final, commande les différentes opérations sur le LOC dans un ordre spécifique selon le protocole de mesure choisi. Il est la plupart du temps un dispositif numérique (microcontrôleur, FPGA ...), avec des interfaces pour les capteurs, actionneurs et autres pièces électroniques du système.

3. MODELISATION DU LABORATOIRE SUR PUCE

Les différents modules du laboratoire sur puce ont été modélisés à haut niveau et implémentés en VHDL-AMS pour permettre une simulation de l'ensemble du système et prédire ses performances.

3.1. Modélisation du circuit microfluidique

Nous avons identifié et modéliser en VHDL-AMS les composants élémentaires permettant de décrire un circuit micro-fluidique: canaux droits, serpentins, jonctions, réservoirs, chambres de stockage, pompes, vannes. Le comportement dynamique des fluides est bien représenté par les lois classiques de conservation de la masse, de l'énergie et du moment. Sous des approximations (écoulement incompressible, flux laminaire et transport unidirectionnel), les modèles de canaux sont modélisés par l'équation de Hagen-Poiseuille(1) définissant la chute de pression sur la longueur de canal [8].

$$Q = \frac{\Delta P}{R_h} ; R_{h(\text{canal droit})} = \frac{12\mu L}{wh^3} \quad (1)$$

Où Q est le débit volumique du fluide, P la variation de pression, R_h est la résistance hydraulique, μ la viscosité du fluide et h, w et L sont respectivement la hauteur, largeur et longueur du canal.

Des améliorations peuvent être apportées afin de tenir compte de la forme de la section du micro-canal. Pour un canal droit de section rectangulaire, une solution exacte existe en utilisant une série de Fourier:

$$Q = \frac{8\Delta P \cdot h}{\mu \cdot w \cdot L} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\beta_n^4} \left(1 - \frac{2}{h \cdot \beta_n} \cdot \text{th} \beta_n \cdot \frac{w}{2}\right) \quad (2)$$

$$\beta_n = (2n - 1) \cdot \frac{\pi}{w} \quad (3)$$

Les résultats de simulation des modèles VHDL-AMS ont été validés en comparaison par rapport aux modèles FEM développé sous COMSOL (Fig.3). Une comparaison entre les simulations VHDL-AMS et COMSOL est présentée sur la

Fig.4. Les résultats sont en bon accord, avec une erreur quadratique moyenne de 4% (l'erreur maximale de 11%) concernant la pression le long du canal et de 1,5% (une erreur maximale de 7,5%) pour la vitesse. Les dépassements de la vitesse du fluide, qui peuvent être observés dans les simulations COMSOL, correspondent à la vitesse locale des fluides au niveau des canaux en forme de T. Ils n'ont pas encore été intégrés dans les modèles VHDL-AMS. Il convient également de remarquer que pour cette première version, un dispositif de mélange mécanique est introduit dans la chambre de réaction. Il n'a pas été modélisé ici.

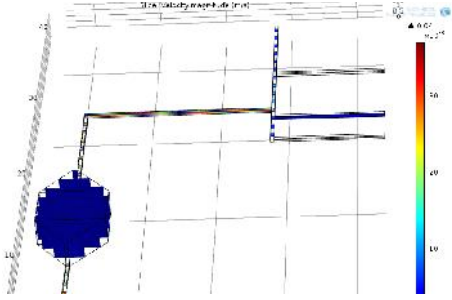


Fig 3 – Modélisation COMSOL du système microfluidique

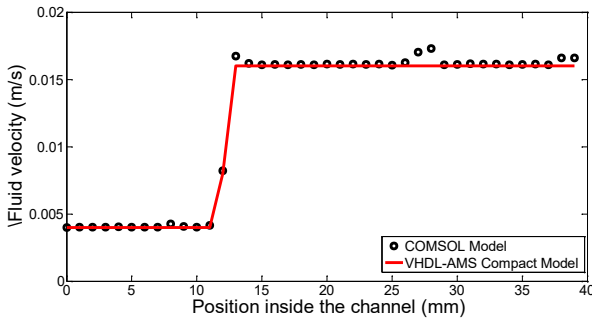
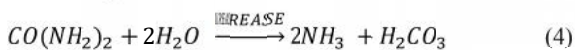


Fig 4 – Variation de la vitesse moyenne le long d'un canal

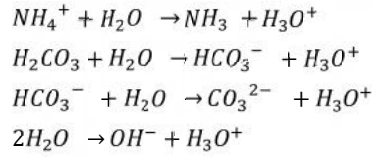
3.1. Modélisation de la réaction biologique

Le système biologique est un ensemble de réactions chimiques provoquant une variation du pH corrélée avec la concentration du polluant. Les modèles compacts de réactions biologiques sont décrits selon le formalisme développé par Gendraut et al [7]. Ce formalisme exploite l'analogie de comportement entre les circuits électroniques et les systèmes biologiques. Chaque réaction a été modélisée par un réseau électrique avec des résistances (modélisation d'une dégradation des espèces chimiques), un condensateur (stockage d'une espèce donnée dans un volume donné) et une source de courant à tension contrôlée (taux d'espèces en fonction de la synthèse de la concentration des autres espèces). Chaque composant possède un caractère spécifique en fonction des espèces chimiques auxquelles elle est liée. Comme la réaction se produit dans la même enceinte, les modules sont reliés entre eux, qui mènent à un ensemble de réseau électrique (par une espèce concernée) qui peuvent être calculés en parallèle par le simulateur.

Les premières réactions modélisées concernent la compétition entre le composé cible et le composé avec l'enzyme et l'anticorps. Ensuite, des réactions de transformations du substrat ont été définies. Dans notre étude, nous avons utilisé la réaction enzymatique d'hydrolyse de l'urée. Cette enzyme convertit l'urée $CO(NH_2)_2$ en ammoniac et en acide carbonique (Eq. 4) et le déplacement du pH d'une solution d'urée peut être détectée par l'ISFET.



La production d'ammoniac (NH_3) et de l'acide carbonique (H_2CO_3) en solution aqueuse est responsable des réactions chimiques entre les différents couples acido-basique: NH_4^+/NH_3 , H_2CO_3/HCO_3^- , HCO_3^-/CO_3^{2-} , H_3O^+/H_2O et H_2O/OH^- .



La cinétique de cette réaction a été décrite par les équations de Michaelis-Menten. Un modèle biologique a été développé sur la base de la langue VHDL-AMS décrivant les équations cinétiques chimiques et de l'évolution de la concentration de chaque espèce. La Fig.3 trace l'évolution du pH pendant la réaction enzymatique.

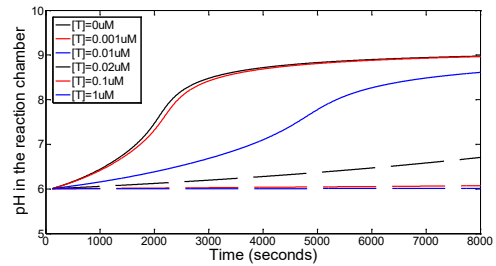


Fig 5 Variation de pH pour différentes concentrations de la cible

3.2. Modélisation de l'ISFET

La modification du pH de la solution d'urée est détectable par l'ISFET. Ce microsysteme est utilisé à un point de fonctionnement statique optimum. Le développement de ce modèle est une adaptation d'un modèle EKV du MOSFET. Une série d'expérimentations ont été réalisées pour caractériser l'ISFET et ainsi valider un premier modèle. Les résultats sur le courant I_{DS} en fonction de V_{DS} dans la région linéaire et pour une large gamme de pH sont donnés sur la fig. 3. Nous avons un bon accord mesure-simulation. Des tests de fonctionnalisation des ISFET pour y accrocher des anticorps sont en cours, permettront ensuite de faire évoluer le modèle.

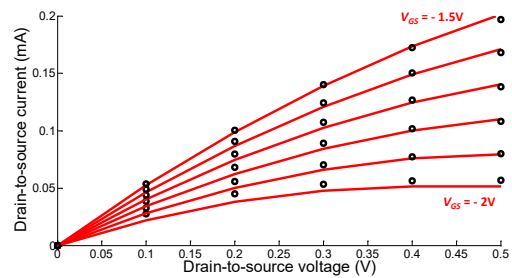


Fig6 Caractéristique ID-VD pour différentes valeurs de VGS à pH 7.

Le circuit de readout utilisé dans ce LOC est donné à la Fig.7. La tension de sortie correspond à une mesure différentielle entre les deux ISFETs, l'une pour la mesure du pH, et l'autre servant de référence (fonctionnant à un pH constant). Ce modèle de lecture a été mis en œuvre en VHDL-AMS. Les résultats sont donnés à la Fig. 8. Pour la réponse supérieure obtenue avec un tampon à pH 6, on observe un comportement linéaire avec $U_a = 0$ à pH = 6 et de la pente attendue de 583 mV / pH. La courbe inférieure ont exactement la même pente, mais est traduit pour avoir $V_{out} = 0$ à pH = 10, ce qui est le pH du tampon de référence. Le modèle peut être utilisé pour la prédiction des performances.

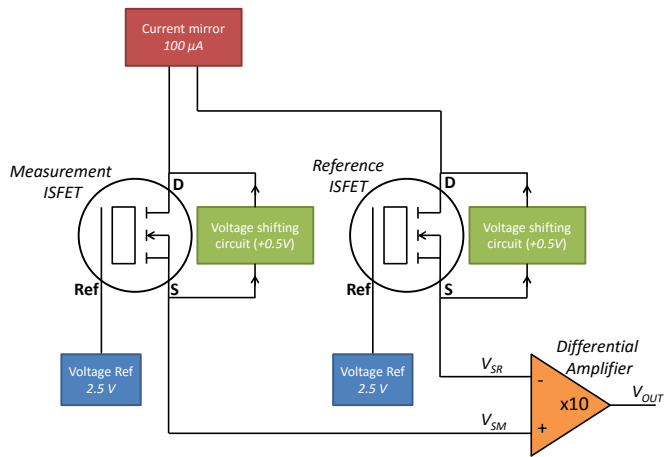


Fig.7 Diagram of the read-out circuitry.

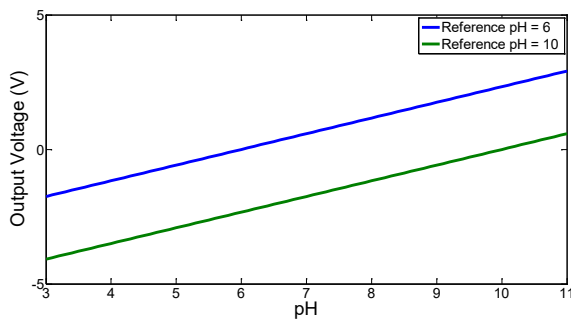


Fig.8 Comparison between experimental and simulated V_{out} -pH characteristics when the reference pH equal to 6 (upper curve) and 10 (lower curve).

3.3. Modélisation du LOC complet

Un modèle système du laboratoire sur puce pour détecter des micropolluants dans l'eau est proposé en combinant les sous-systèmes présentés auparavant. La fig. 9 montre la variation de pH couplée avec l'ISFET.

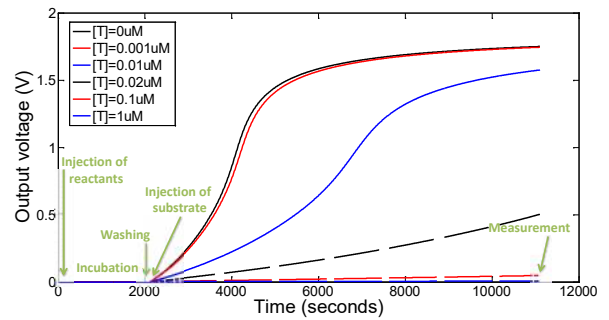


Fig.2 Tension de sortie pour différentes concentrations de la cible

4. CONCLUSIONS

Ce travail représente une première percée vers la réalisation d'une boîte à outils génériques, intégrant des briques électroniques, fluidiques, biologiques pour la conception des laboratoires sur puce. Nous avons présenté un modèle de haut niveau d'un laboratoire sur puce pour la détection de micropolluants dans l'eau. Ce modèle système est basé sur plusieurs modèles compacts représentant chaque sous système. Les premiers résultats de simulation obtenus avec ces modèles compacts sont conformes aux attentes et ont été validé par expérimentations et vont nous permettre d'approfondir les modèles afin d'obtenir un prototype virtuel plus fidèle.

5. REFERENCES

- [1] K. E. Herold, "Lab-on-chip technology: fabrication and microfluidics", ed. Horizon Scientific Press, 2009
- [2] E. Oosterbroek, A. Van den Berg, "Lab-on-a-Chip Miniaturized Systems for (Bio) Chemical Analysis and Synthesis", 2003
- [3] R. Bashir, "BioMEMS state-of-the-art in detection opportunities and prospects", Advanced Drug Delivery Reviews (2004) D.A. Hall et al., "GMR biosensor array: a system perspective", in Biosensors and Bioelectronics, vol. 25, 2010.
- [4] P. Bergveld, "Development, operation, and application of the ion-sensitive field-effect transistor as a tool for electrophysiology", IEEE trans. On Biomedical Engineering, vol. 19(1), 1972
- [5] A. Subramaniam et al, "Glucose biosensing using an enzyme-coated microcantilever", in Applied Physics Letter, vol. 81, 2002.
- [6] J.B. Kammerer, M. Madec, L. Hébrard, "Compact modeling of a magnetic tunnel junction—Part I: dynamic magnetization model", in IEEE Trans. Electron Devices, vol. 57(6), 2010.
- [7] Y. Gendault, et al. "Modeling biology with HDL languages: a first step toward a Genetic Design Automation tool inspired from microelectronics" Biomedical Engineering, IEEE Transactions on, 2014
- [8] H. Bruus, "Theoretical Microfluidics", Oxford University Press, 2007.
- [9] S. Guiton, A. Rezgui, et al. "System-level Modeling of a Lab-On-Chip for Micropollutants Detection", (IJMCS), Vol. 5, No.3, 2014.