HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Date de la soutenance : **13 janvier 2022**

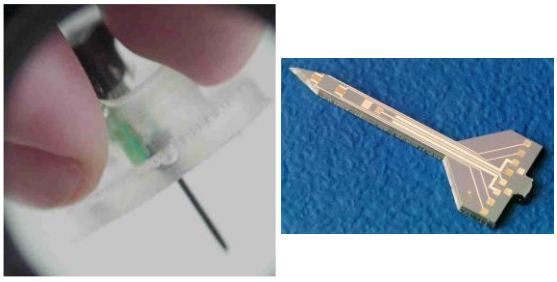
Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame ZINE LOUKILI Nadia**

Titre de la thèse : *« Développement de laboratoires sur puce pour des applications biomédicales et environnementales »*

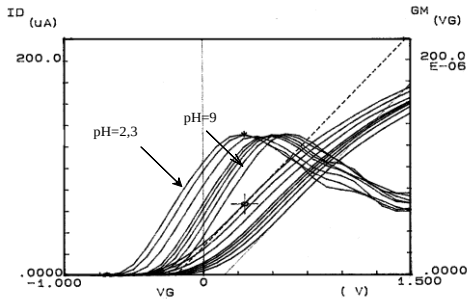
Résumé

Mon parcours de recherche a commencé en 2001 avec la réalisation de ma thèse au sein du groupe des microsystèmes et technologie de silicium à l'Institut de Microélectronique de Barcelone (IBM-CNM). J'ai participé à la conception et la réalisation de microcapteurs à base de silicium pour la détection des ions et leur intégration dans des microsystèmes analytiques pour des applications biomédicales. Ce travail était réalisé dans le cadre de deux projets Européens Microcard et Microtrans.

Le travail réalisé consiste au développement d'une nouvelle technologie de fabrication d'un multi-microcapteur en silicium sous forme d'aiguille pour le contrôle de différents ions pendant la chirurgie cardiaque ou pendant le transport des organes pour des greffes, en utilisant deux voies différentes : La première est une combinaison de la technologie de fabrication des ISFETs, CMOS et celle du micro-usinage du silicium [1]. L'aiguille en silicium comprend deux microcapteurs chimiques de type ISFETs. L'un est sensible à l'ion H^+ et l'autre à l'ion K^+, grâce à une membrane polymérique déposée sur le nitrure de la grille de l'ISFET. Le dispositif comprend aussi une pseudo-électrode de référence de platine et un capteur de température basé sur une résistance de platine.



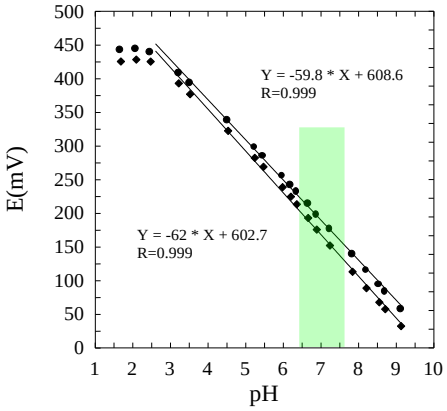
Photographie du chip encapsulé et du multicapteur sous forme d'une aiguille



Variation des caractéristiques électriques de l'ISFET pour différents pH

La deuxième voie est basée sur une nouvelle génération de microélectrodes sélectives aux ions H^+ et K^+ sur des substrats de silicium sous forme d'aiguille [2]. Une couche polymérique de polypyrrole dopé avec l'anion cobaltabis (dicarbollide) ([3.3'- Co $(1,2\text{-}C_2B_9H_{11})_2$]) a été déposée sur le substrat pour augmenter l'adhérence de la membrane sélective à la surface de l'électrode. La fiabilité de la technologie de fabrication a été démontrée et tous les dispositifs ont montré un comportement très satisfaisant (bonne sensibilité et sélectivité).

Photographie d'une microélectrode sensible au pH



Courbes d'étalonnage pour deux microélectrodes à pH

Après la thèse en 2005 j'ai intégré l'Institut de Bio ingénierie de Catalogne (IBEC) dans le cadre d'un contrat jeune chercheur financé par le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur espagnol. J'ai travaillé dans un projet national, ONCNOSIS qui vise à développer de nouveaux et meilleurs tests pour la détection précoce du Cancer, augmentant ainsi les chances de guérison. Ce projet cherche aussi à élaborer des stratégies pour le traitement de la maladie, fondée sur la connaissance des changements qui caractérisent les cellules cancéreuses. Dans le cadre de ce projet, j'ai participé à l'élaboration et la caractérisation électrochimique d'un biocapteur implantable pour la surveillance in vivo de l'évolution de l'état d'un patient atteint du Cancer. Pour cela on a mis au point un processus d'immobilisation des anticorps antiCEA sur la surface des microelectrodes en or suivi d'une caractérisation par spectroscopie d'impédance de l'interaction anticorps/antigène.

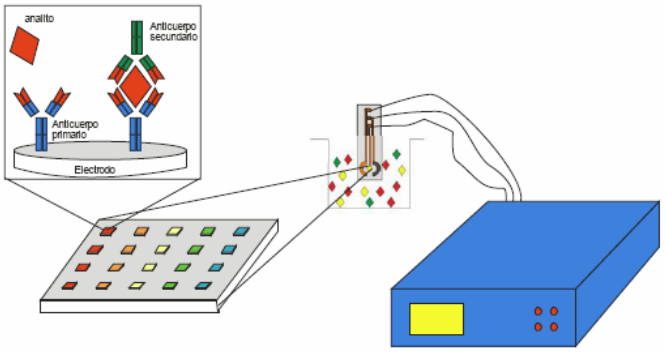
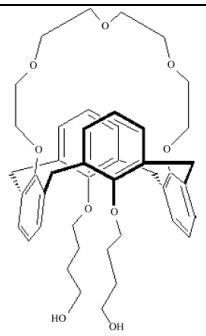
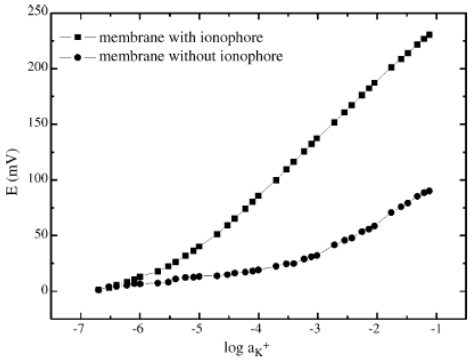


Schéma du microtransducteur multianalyte

En parallèle et dans le cadre d'une collaboration avec une équipe de l'unité de chimie inorganique de l'Université Autonome de Barcelone et du Laboratoire Hubert Curien de l'Université de Saint Etienne, j'ai participé au développement de microélectrodes pour la détection de différent ions en utilisant de nouveaux ionophores synthétisés basés sur des calixarènes [3]. Les microcapteurs développés ont été caractérisés en utilisant des mesures potentiométriques et ont montré de bonnes caractéristiques comme la sensibilité, sélectivité vis-à-vis d'autres ions, temps de vie….



Structure du ligand sélectif à l'ion potassium



Réponse potentiometrique de la microélectrode sélective à l'ion K+: (■) membrane optimisée; (●) membrane sans ligand

J'ai été partenaire d'un projet Européen NATO qui avait pour objectif le développement d'un capteur enzymatique à base d'une nouvelle enzyme la méthylamine oxydase taguée $(His)_6$ pour la détection des méthylamines dans le poisson [4]. L'enzyme a été purifiée à partir de l'extrait acellulaire d'une souche recombinante par chromatographie d'affinité sur Ni-NTA-agarose, et ensuite immobilisée sur la surface d'une microélectrode modifiée avec un ester activé pour assurer la liaison covalente de l'enzyme sur les microélectrodes. Le biocapteur ainsi développé a été caractérisé par la méthode de spectroscopie d'impédance présentant un domaine de réponse linéaire de 10 µM à 40 mM avec une limite de détection de 10 µM. Une telle sensibilité élevée et un large intervalle linéaire, observés pour les biocapteurs développés dans ce projet, sont meilleurs par rapport aux travaux publiés dans la littérature dans le domaine de la détection des methylamines.

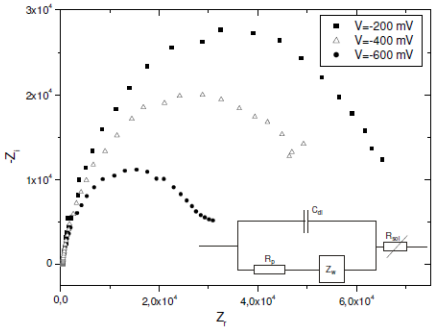


Diagramme de Nyquist correspondant au biocapteur (AMO/Au/Ti/SiO2/Si/SiO2) pour différentes polarisations vs Ag / AgCl et le circuit électrique de Randal équivalent au biocapteur

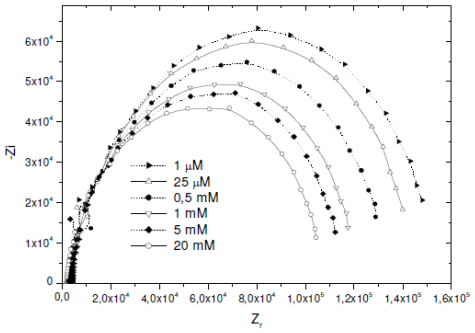
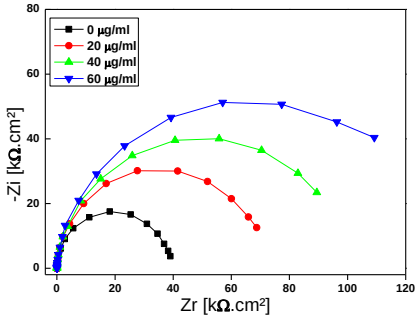
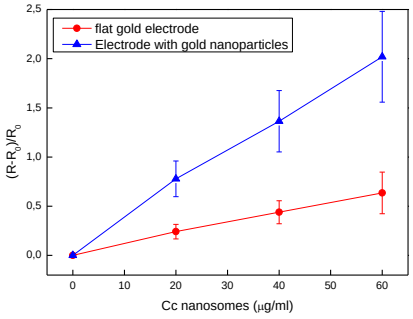


Diagramme de Nyquist correspondant au biocapteur AMO/Au/Ti/SiO2/Si/SiO2 pour différentes concentrations MA (Potentiel appliqué de -0,6 V vs Ag / AgCl).

En 2009, j'ai intégré le Laboratoire des Sciences Analytiques en tant que post-doc dans le cadre du projet Européen BOND (Bioelectronic Olfactory Neuron Device). L'objectif du projet est le développement d'un nouveau dispositif bioélectronique à base de récepteurs olfactifs pour détecter la présence et mesurer la concentration d'odorants spécifiques [5]. J'étais chargée, dans ce projet des techniques de biofonctionalisation ainsi que de la caractérisation électrochimique du biocapteur. Pour augmenter la surface du transducteur et amplifier ainsi le signal de transduction électrochimique, des nanoparticules d'or ont été générées sur la surface des microélectrodes en utilisant la méthode de chronoampérometrie. Les propriétés électrochimiques du biocapteur ont été déterminées par la méthode de spectroscopie d'impédance électrochimique. L'utilisation des nanoparticules en or a contribué à l'augmentation de la surface active amplifiant ainsi le signal de la réponse électrochimique.



Diagrammes de Nyquist pour différentes concentrations du récepteur olfactif CmycOR1740 dans un intervalle de fréquence de 100KHz à 100mHz, et une amplitude de 10mV.



Variation relative de la résistance de transfert de charge avec (noir) et sans (rouge) nanoparticules d'or

En 2011 j'ai eu un poste de Maître de Conférences à l'UCBL et j'ai initié mes activités de recherche, au sein de l'Institut des Sciences Analytiques, dans le développement de micro-outils et de microsystèmes dans le cadre de collaborations dans plusieurs projets Européens et de co-encadrements de plusieurs thèses.

Ainsi on a développé une plateforme flexible constituée d'un assemblage de dispositifs microfluidiques et de microcapteurs sélectifs pour différentes applications biomédicales comme le diagnostic de l'insuffisance cardiaque (Heart failure) en suivant la sécrétion des cytokines TNF-α, interleukines (IL-1 et IL-10) (Projet sensorArt) [6]. Ces Biolab-On-Chip sont basés sur des microélectrodes entièrement intégrées avec des systèmes microfluidiques sur des substrats flexibles. Le processus est basé sur la combinaison de l'impression "microcontact printing" et la gravure chimique pour la production de microélectrodes, et, de la lithographie douce pour la fabrication de systèmes microfluidiques poly(diméthylsiloxane) (PDMS).

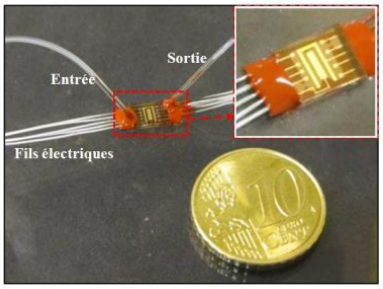


Image du Lab on Chip avec les connections électriques

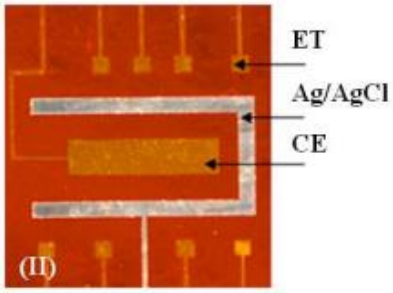
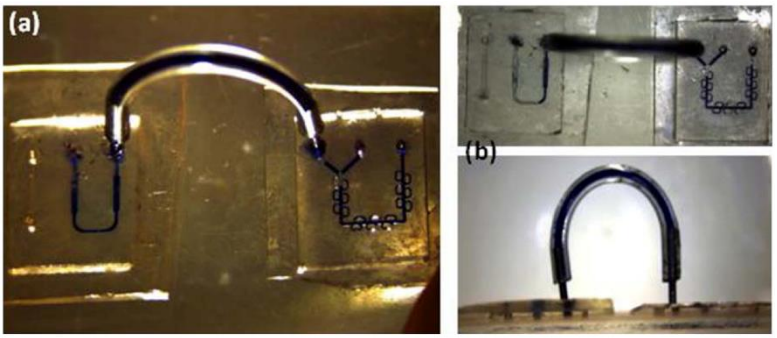


Image du multicapteur flexible integrant

Dans le cadre du même projet et pour pouvoir filtrer des microparticules, on a réalisé d'une part un micro-mélangeur 'passif' et d'autre part un micro-filtre totalement flexible par des méthodes douces de microfabrication [7]. Des moules souples en poly(diméthylsiloxane) (PDMS) micro-structurés sont préparés à partir d'un moule mère en silicium qui a été préalablement structuré par lithographie électronique et gravure ionique réactive (RIE). Un procédé de collage direct a été mis au point pour fabriquer ces dispositifs «PDMS-sur-Polymère» suffisamment résistants en pression pour permettre des études de mélange de fluides ou pour filtrer les microparticules.

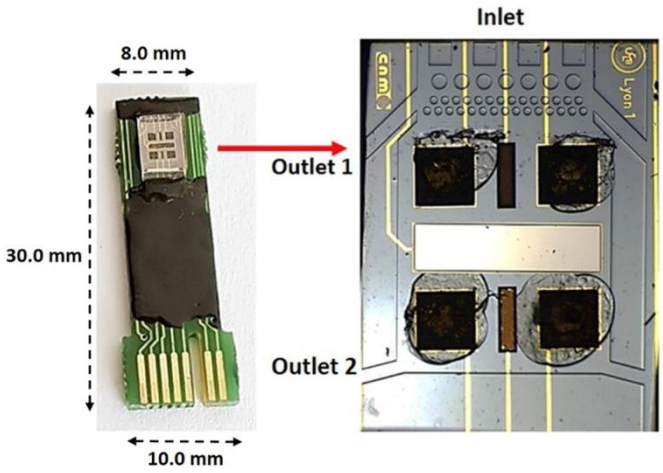
L'assemblage de tous les objets fabriqués constituet le concept du développement d'un laboratoire sur puce pour des appareils d'analyse médicaux pour encourager la médecine portable afin de garantir les points majeurs de la recherche biomédicale en terme du gain de coût et d'un temps de réponse réduit pour un diagnostic médical.



Injection de colorant pour observer le flux fluidique du microfiltre au micromélangeur

Dans le cadre du projet européen MicroMole, on a développé un dispositif pour le contrôle des amphétamines dans les égouts pour aider la police scientifique à localiser des laboratoires clandestins d'amphétamines et produits dérivés [8]. Il s'agit d'une nouvelle génération de Lab-on-a-chip (LOC) pour effectuer des mesures potentiométriques in situ et en temps réel dans l'eau courante. Le dispositif se compose de deux parties différenciées : une structure microfluidique poly (diméthylsiloxane) (PDMS) obtenue par lithographie douce permettant de contrôler le flux d'échantillon arrivant à la partie sensible du microcapteur en utilisant des micro-filtres et micro-mélangeurs et une plateforme de détection chimique entièrement intégrée comprenant quatre microélectrodes de travail, deux microélectrodes de référence et une contre micro-électrode pour détecter l'ammonium en mode continu. Deux générations de capteurs potentiométriques sélectifs à l'amphétamine ont été réalisés : l'un en utilisant l'ionophore commercial dibenzo-18-crown-6 éther et autre en utilisant l'ion-pair complexe $[\text{amphetamine-H}]^+[3,3'\text{-Co}(1,2\text{-}C_2B_9H_{11})_2]^-$ comme site actif pour la reconnaissance sélective d'amphétamine.

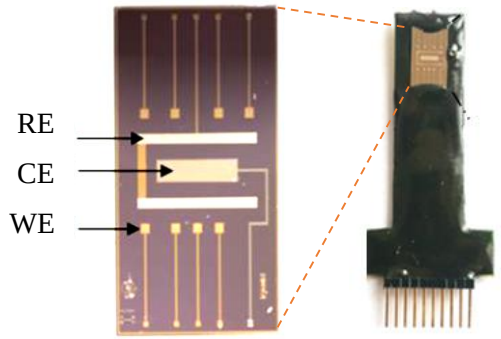
Le dispositif peut fournir des données rapides et fiables en temps réel lorsqu'il est immergé dans un courant d'eau plus lent. Le test de robustesse a montré qu'il était toujours fonctionnel après l'immersion dans les eaux usées pendant au moins 15 minutes. En outre, le LOC fabriqué peut être utile pour une grande variété d'applications d'écoulement d'eau telles que le contrôle des sorties d'aquaculture, analyse in situ et continue des effluents des rivières et surveillance des eaux de mer, entre autres.



Lab on Chip contenant 4 microelectrodes en or et système microfluidique colé dessus

J'ai été coordinatrice d'un projet PHC Toubkal qui avait pour objectif la conception de multicapteurs électrochimiques pour la détection et quantification d'antibiotiques dans le miel. L'intérêt de cette étude repose sur les exigences des législations alimentaires obligeant les producteurs à déterminer l'authenticité et les origines de leurs produits, ce qui permet aux consommateurs de prendre des décisions d'achat en meilleure connaissance de cause. Pour se faire, nous avons développé des immunocapteurs sur des structures dites Bio-MEMS basées sur des microélectrodes en or [9]. L'élaboration de ces immunocapteurs a été dédiée à la

détection des résidus d'antibiotiques à savoir la sulfapyridine (SPy) et la tétracycline (TC). Une nouvelle structure des nanoparticules magnétiques (MNPs) revêtues du copolymère poly (acide pyrrole-co-pyrrole-2-carboxylique) a été exploitée dans ces travaux pour leur réseau d'immobilisation tridimensionnel permettant de fixer une quantité plus élevée d'anticorps ainsi que pour leur stabilité pendant de longues périodes. La détection de la SPy et de la TC a été réalisée par différentes approches compétitives combinées avec la méthode d'impédance.



Dispositif Bio-MEMS intégré sur un substrat de silicium

Mon projet de recherche à court terme consiste au développement d'un nouveau microsystème flexible polyvalent et peu couteux, dans lequel seront intégrés plusieurs nanoTransistors à Effet de Champ (nanoFET) pour assurer la multidétection ainsi qu'un système microfluidique pour faire circuler l'échantillon. L'ensemble des élements sera construit sur un substrat flexible.

La plate-forme développée pourra trouver des applications dans différents domaines, notamment les domaines de la santé, de l'alimentation et de l'environnement. Ce dispositif présentera donc une solution bénéfique non seulement pour la sécurité agroalimentaire et environnementale, mais également pour la surveillance continue de la santé et pour les diagnostics de la médecine légale. L'avantage de ce dispositif ultra-sensible réside dans sa portabilité, sa faible consommation et son coût réduit, offrant une réponse immédiate dans toutes les conditions de mesures avec un respect de l'environnement. Par conséquent, l'utilisation d'un tel laboratoire sur puce pourrait constituer un nouveau créneau marqué dans le scénario actuel, où la demande d'appareils sensibles, précis, portables et *in situ* est forte, dans le but de contribuer à l'amélioration à la qualité de vie des êtres humains et de l'environnement.

[1] **N. Zine,** A. Ivorra, J.Aguilo, R. Villa, J. Millan, J.Bausells, A. Errachid, P. Godignon, A. Benvenuto, L. Beccai, F. Valvo, A. Menciassi, P. Dario, « Multisensor silicon needle for cardiac applications » IEEE Xplore proceedings, 1st Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine & Biology October 12-14, 2000, Lyon, France

[2] **N. Zine**, J. Bausells, A. Ivorra, J. Aguiló, M. Zabala, F. Teixidor, C. Masalles, C. Viñas, A. Errachid, "Hydrogen-selective microelectrodes based on silicon needles", Sensors & Actuators B91 (2003) 76-82.

[3] **N. Zine**, J. Bausells, F. Vocanson, R. Lamartine, Z. Asfari, F. Teixidor, E. Crespo, I.A. Marques de Oliveira, J. Samitier, A. Errachid, "Potassium ion selective solid contact microelectrode based on novel 1,3-(di-4-oxabutanol)-calix[4]arene-crown-5 neutral carrier", Electrochimica Acta 51 (2006) 5075-5079.

[4] M. Gonchar, A Zakalskiy, M Ben Ali, C. Dridi, A. Errachid, Y. Korpan, O. Zakalska, **Nadia Zine**, N. Jaffrezic-Renault "Impedance response to toxic methylamine of recombinant primary amine oxidase coupled with mercaptohexadecanoic acid monolayer", pp.125-136, 2015, DOI:10.13140/RG.2.1.2574.896.

[5] **N Zine**, E. Pajot, M.A. Persuy, H. Korri-Youssoufi, S. Chebil, A. Errachid, N Jaffrezic-Renault, "Amplification of the electrochemical signal of an olfactory receptor based biosensor by in situ generated gold nanoparticles", Procedia Engineering, V 25 (2011).

[6] Abdoullatif Baraket, **Michael Lee**, **Nadia Zine**, Monique Sigaud, Joan Bausells, Abdelhamid Errachid, “A fully integrated electrochemical biosensor platform fabrication process for cytokines detection”, Procedia Engineering 87 (2014) 377-379

[7] **Lee, Michael**; Lopez-Martinez, Maria J.; Baraket, Abdoullatif; **Nadia Zine**, Jaume Esteve, Jose A. Plaza, Naveed Ahmed, Abdelhamid Elaissari, Nicole Jaffrezic-Renault, Abdelhamid Errachid, “Combination of PDMS microfilters and micromixers based on flexible thermoplastic films for size sorting and mixing of microparticles” Journal of Applied Polymer Science 132 Issue 25 (2015) 42088.

[8] **J. Gallardo-Gonzalez**, A. Baraket, S. Boudjaoui, T. Metzner, F. Hauser, T. Rößler, S. Krause, **N. Zine**, A. Streklas, A. Alcácer, J. Bausells, A. Errachid, “A fully integrated passive microfluidic Lab-on-a-Chip for real-time electrochemical detection of ammonium: Sewage applications” Science of the Total Environment, 653 (2019) 1223-1230.

[9] **N. El Alami El Hassani**, A. Baraket, S. Boudjaoui, E. Taveira Tenório Neto, J. Bausells, N. El Bari, B. Bouchikhi, A. Elaissari, A. Errachid, **N. Zine**. Development and application of a novel electrochemical immunosensor for tetracycline screening in honey using a fully integrated electrochemical Bio-MEMS. Biosensors and Bioelectonics, 130 (2019) 330-337