



Nouvelle technique d'optimisation de la détection moléculaire à base d'un spectromètre microscope-FTIR

Thèse

Hamza Landari

Doctorat en génie électrique
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

**Nouvelle technique d'optimisation de la détection
moléculaire à base d'un spectromètre
microscope-FTIR**

Thèse

Hamza Landari

Sous la direction de:

Prof. Amine Miled
Prof. Younès Messaddeq

Résumé

L'identification et la quantification des espèces transmises aux cellules nerveuses lors des échanges moléculaires entre les neurones sous la forme de neurotransmetteurs nous permettent de mieux comprendre certains fonctionnements du cerveau et certaines maladies neurodégénératives. À son tour, cette compréhension nous permettrait à long terme d'améliorer la qualité de vie des patients souffrants de ces maladies. D'un autre côté, la composition des aliments sous la forme de valeurs nutritionnelles nous permet de mieux connaître l'effet de la consommation de ces aliments sur la santé afin d'éviter de graves complications. De plus, la connaissance de cette composition nous permet d'améliorer la qualité de ces produits. Pour extraire la composition et la concentration des neurotransmetteurs dans le cerveau ou les valeurs nutritionnelles des aliments, il faut développer des outils d'analyse chimique et moléculaire très précise et sélective. L'analyse chimique d'un échantillon biologique nécessite deux étapes : (1) l'échantillonnage du liquide biologique et (2) l'étude de la composition de l'échantillon. Cette dernière étape consiste à identifier/quantifier la composition moléculaire des échantillons et à caractériser les propriétés chimiques de ces derniers. Cette étape nécessite donc le développement des instruments et des algorithmes de détection moléculaire avancés qui permettent de déterminer les concentrations physiologiques des neurotransmetteurs et d'autres molécules biologiques. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux neurotransmetteurs suivants : dopamine hydrochloride, acide L-ascorbique, acétylcholine chlorure, γ -aminobutyrique, glycine et acide L-glutamique et aux molécules de sucre, incluant le glucose, le fructose et le saccharose. Le choix de l'instrument à utiliser dépend de plusieurs critères, dont les caractéristiques de l'échantillon (viscosité, volume parmi d'autres). Dans le cadre de cette thèse de doctorat, nous examinons les performances de plusieurs méthodes et instruments de détection, soit l'électrochimie, la spectroscopie d'impédance et la spectroscopie UV/Visible et infrarouge (IR), pour la détection de différents types de molécules dans des échantillons aqueux. Par la suite, nous proposons une nouvelle approche d'analyse des échantillons aqueux basée sur la spectroscopie IR. Nous nous intéressons plus particulièrement au spectromètre microscope-FTIR qui nous permet d'effectuer des analyses spectroscopiques IR et de visualiser la distribution spatiale et moléculaire dans l'échantillon. Cependant, le spectromètre microscope-FTIR, dans sa configuration standard, ne permet pas l'analyse des échantillons aqueux à cause de la forte absorption des rayonnements IR par les molécules d'eau. Pour résoudre ce problème, nous avons proposé

un nouveau système microfluidique de contrôle et de manipulation des liquides qui a été intégré au spectromètre microscope-FTIR pour analyser des échantillons aqueux. Le nouveau système proposé consiste en un module de réflexion, une couche hydrophobe et un module microfluidique. Le module de réflexion est maintenu à une température élevée pour l'évaporation rapide du solvant. La couche hydrophobe permet à son tour de confiner l'échantillon en un espace restreint pour avoir une distribution plus uniforme des molécules sur la surface du substrat. Ce nouveau système nous a permis d'identifier et de quantifier différents types de molécules tels que les neurotransmetteurs et les molécules de sucres, dont le glucose, le fructose et le saccharose. La limite de détection que nous avons pu atteindre avec notre système est de $10 \mu\text{Molaire}$ pour les neurotransmetteurs, de 3mMolaire pour le glucose et le fructose et de 1mMolaire pour le saccharose. En plus, nous avons proposé un nouvel algorithme pour une identification automatique des neurotransmetteurs par le microscope FTIR. À travers cet algorithme, nous avons pu identifier, dans des solutions synthétiques (homogènes et hétérogènes), les six neurotransmetteurs suivants : la dopamine hydrochloride, l'acide L-ascorbique, l'acétylcholine chloride, l' γ -aminobutyrique, la glycine et l'acide L-glutamique. La précision de la détection du nouvel algorithme est de 75% à 100% pour les six neurotransmetteurs que nous avons étudiés dans 36 échantillons homogènes et 45 échantillons hétérogènes.

Abstract

The identification and quantification of species transmitted/received by nerve during molecular exchanges between neurons in the form of neurotransmitters allow us to better understand certain brain functions and certain neurodegenerative diseases. This understanding helps us in the long term to improve the quality of life of patients suffering from these diseases. Also, the composition of foods and their nutritional values, allows us to better understand the effect of foods consumption on human health to avoid severe complications and to improve food quality. To extract the composition and concentration of neurotransmitters in the brain and concentration of sugar for example in foods, it is necessary to develop very precise and selective chemical and molecular analysis tools. Indeed, chemical analysis of a biological sample requires two steps: (1) sampling the biological fluid and (2) studying the composition of the sample. The second step consists of identifying / quantifying the molecular composition of the samples and characterizing the its chemical properties. Therefore, this step requires the development of advanced molecular detection instruments and algorithms that make it possible to determine the physiological concentrations of neurotransmitters and other biological molecules. In this study, we were interested in the following neurotransmitters: dopamine hydrochloride, L-ascorbic acid, acetylcholine chloride, γ -aminobutyric, glycine and L-glutamic acid and in sugar molecules including glucose, fructose, and sucrose. The selection of the detection methods/instruments depends on several criteria such as the characteristics of the sample (viscosity, volume among others). In the context of this PhD thesis, we are investigating the performance of several detection methods/instruments such as electrochemistry, impedance spectroscopy and UV / Visible and infrared (IR) spectrometry, for the detection of different types of molecules in aqueous samples. Then, we propose a new chemical analysis approach of aqueous samples based on IR spectrometry. We are particularly interested to microscope-FTIR spectrometer which allows us to perform IR spectroscopic analysis and to visualize the spatial molecular distribution in the analyzed sample. However, the microscope-FTIR spectrometer, in its standard configuration, does not allow the analysis of aqueous samples due to the high absorption of IR radiation by water molecules. To address this problem, we proposed a new microfluidic system for liquid control and handling, which has been integrated with the microscope-FTIR spectrometer to analyze aqueous samples. The new proposed system consists of a reflection module, a hydrophobic layer, and a microfluidic system. The reflection

module is heated in order to ensure rapid evaporation of the solvent. The hydrophobic layer allows the sample to be confined in a small area to ensure more uniform distribution of molecules on the surface of the substrate. This new system allowed us to identify and quantify different types of molecules such as neurotransmitters and sugar molecules. The reached detection limit with our system is $10 \mu M$ for neurotransmitters, $3 mM$ for glucose and fructose and $1 mM$ for sucrose. In addition, we proposed a new algorithm for automatic molecular identification by the FTIR microscope spectrometer. Using this algorithm, we were able to identify the following six neurotransmitters: dopamine hydrochloride, L-ascorbic acid, acetylcholine chloride, γ -aminobutyric, glycine and L-glutamic acid, in synthetic solutions (homogeneous and heterogeneous). Finally, the detection accuracy of the new algorithm is 75% to 100% for the six neurotransmitters we studied, in 36 homogeneous and 45 heterogeneous samples.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations	xiii
Remerciements	xvi
Avant-propos	xvii
Introduction	1
1 Techniques de détection pour la bio-analyse	7
1.1 Introduction	7
1.2 Techniques de détection à caractère séparatif	12
1.2.1 Chromatographie	12
1.2.2 Électrophorèse capillaire	16
1.2.3 Microdialyse	19
1.3 Techniques de détection à caractère non séparatif	20
1.3.1 Spectroscopie UV/Vis	21
1.3.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)	25
1.3.3 Spectroscopie Raman à Transformée de Fourier	40
1.3.4 Autres Techniques	41
1.4 Conclusion	44
2 Multi-Modal Sensing Platform for Continuous Analysis of Maple Syrup in Production Process	46
2.1 Résumé	46
2.2 Abstract	47
2.3 Introduction	47
2.4 System Description	49
2.5 Experimental Setup	52
2.6 Results and Discussion	54

2.6.1	Discussion	61
2.7	Conclusion	63
3	Pseudo-Continuous Flow FTIR System for Glucose, Fructose and Sucrose Identification in Mid-IR Range	64
3.1	Résumé	64
3.2	Abstract	64
3.3	Introduction	65
3.4	Microfluidic System Description	67
3.5	Experimental Procedure	71
3.6	Results and Discussion	72
3.6.1	System Optimization	72
3.6.2	Qualitative Detection	74
3.6.3	System Calibration and Quantitative Analysis	77
3.7	Conclusions	83
4	Microscope-FTIR Spectrometry Based Sensor for Neurotransmitters Detection	85
4.1	Resumé	85
4.2	Abstract	86
4.3	Introduction	86
4.4	System Description	89
4.4.1	Hardware description	89
4.4.2	Sample handling protocol	90
4.5	Experimental Protocol	92
4.6	Data Processing	93
4.7	Results and discussion	94
4.7.1	Comparison between standard SHS and newly Developed SHS results	94
4.7.2	Data analysis	95
4.8	Conclusion	108
4.9	Results Annexe	109
	Conclusion	121
	Autres Publications	125
	Bibliographie	126

Liste des tableaux

1.1	Exemples d'applications de certaines techniques de détection moléculaire	9
1.2	Exemples de détecteurs utilisés avec la chromatographie.	15
1.3	Exemples de fonctions de fenêtrages.	36
3.1	Absorption peak signatures (fingerprint) of Glucose, Fructose, and Sucrose, the line-width of each characteristic peak and sugars LOD of microscope-FTIR spectroscopy coupled to our designed microfluidic chip.	75
3.2	Absorption peaks characteristics and quantification results of unknown solution concentration based on quadratic equation.	81
3.3	Absorption peaks characteristics and quantification results of unknown solution concentration based on linear equation.	82
4.1	Spectrometric analysis parameters	92
4.2	Removed peaks from literature fingerprints based on criteria (2).	99
4.3	Given presence estimation ratio by the developed script, with literature fingerprints group and the URPG of each molecule on the 81 analyzed sample using the new SHS, microfluidic module and protocol.	103
4.4	Matched fingerprints peaks with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for Do-hy molecule.	109
4.5	Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for L-AA molecule.	111
4.6	Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for A-ch molecule.	113
4.7	Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for L-Glu molecule.	115
4.8	Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for GABA molecule.	117
4.9	Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for Gly molecule.	119

Liste des figures

1.1	Organigramme des étapes constituant une analyse chimique.	8
1.2	Illustration du processus de séparation des espèces divers contenues dans un échantillon par la Chromatographie.	12
1.3	Instrumentation de base de l'électrophorèse capillaire. L'entrée du tube capillaire est alternée entre l'échantillon et la solution tampon.	16
1.4	Image schématique d'une sonde de microdialyse [1]	20
1.5	Exemples de sondes de microdialyse. a. Sonde développée par <i>Lee et al.</i> : Une sonde à trois ports, entrée, sortie et un port réservée pour d'autres utilisations. (i). Image par Microscopie électronique à balayage (SEM) de la coupe transversale de sonde montrant une forme semi-circulaire et une couche supérieure en polysilicium mince. (ii). Image par SEM de la membrane en oxyde d'aluminium anodique. (iii). Image SEM de la pointe de la sonde de microdialyse montrant sa forme [2]. b. Sonde commerciales [3] : "CMA 11 Microdialysis Probes". La longueur de membrane : 1, 2, 3 ou 4 mm ; le Diamètre de la membrane 240, 260 ou 280 μm . c. "CMA 7 Microdialysis Probes". La longueur de membrane : 1 ou 2 mm ; le diamètre de la membrane 240, 260 ou 280 μm . d. "CMA 20 Microdialysis Probes". La longueurs de membrane : 4 ou 10 mm.	21
1.6	Principaux types de spectromètre Uv-Vis. (a) Spectromètre avec système optique séquentiel à doubles faisceaux. (b) Spectromètre avec système optique séquentiel à faisceau unique. (c) Spectromètre à optique simultanée.	24
1.7	Principaux types de modes vibratoires. (a) vibration d'étirement "Stretching" ; (i) Étirement symétrique, (ii) étirement non symétrique. (b) Déformation angulaire "Bending". (c) Balancement "Rocking".(d) Illustration 3D de la vibration à remuer "Wagging". (e) Illustration 3D de la torsion "Twisting".	28
1.8	Architecture d'un interféromètre de <i>Michelson</i>	31
1.9	Différente types de SMÉ pour un spectromètre IR. a. SMÉ en transmission. b. SMÉ en réflexion spéculaire. c. SMÉ en réflexion totale atténuée. d. SMÉ en réflexion diffuse.	32
1.10	Déconvolution de deux pics chevauchés.	38
2.1	Diagram of the developed platform.	50
2.2	(a) Electrical Impedance Analyzer Pmod IA and (b) Screen Printed Carbon Electrodes.	50
2.3	FES results of Obtained deformation as a function of different tube made with different type of materials.	52
2.4	FES results. (a) Outlet and inlet needles with the same dimension, (b) Outlet needle longer than the inlet one and (c) Inlet needle longer than the outlet one.	52
2.5	Detailed system of the fluidic setup.	53

2.6	Experimental setup in maple syrup automated farm.	54
2.7	Experimental setup of the flow control.	54
2.8	Fluidic switchboards for different °Brix analysis.	55
2.9	Gain factor versus Frequency for 21.4 °Brix solution.	56
2.10	Electrical impedance versus sampling frequency at : (a). 29 °C and (b). at 100 °C.	57
2.11	Average of electrical impedance measured with the developed platform versus °Brix at two different temperatures for a frequency range of 10 kHz-20 kHz.	58
2.12	Measured photodiode voltage versus transmitted light with different maple syrup grades using Blue, green, yellow, red, infrared and white LEDs powered with 2.3V.	58
2.13	Measured photodiode voltage versus transmitted light with different maple syrup grade using different voltage supplies for green, yellow and white LEDs.	59
2.14	Measured photodiode voltage versus °Brix using green LED powered with 2.2V.	59
2.15	Voltammogram of 66.5 °Brix maple sample.	60
2.16	Maximum current versus °Brix using cyclic-voltammetry technique. Error bare corresponds to the standard deviation through three sets of experiments.	61
2.17	Current behavior in the Chronoamperometry analysis versus °Brix at (a) 29 °C and (b) 100 °C.	62
3.1	Schematic representation of the working principle of the proposed technique for sugar detection coupled to the developed microfluidic chip for sampling and sample handling and temperature control.	67
3.2	(a) Schematic representation of the difference between the molecular distribution in the droplet before and during the solvent evaporation using the standard SHS. (b) Deposited sugar on a standard SHS after water evaporation. (c) Two recorded absorption spectrum of two sugar samples taken from the same sugar solution.	68
3.3	(a) Functional diagram of the entire system. (b) Microfluidic chip with heating subsystem.	69
3.4	(a) Pumping unit diagram. (b) Microfluidic sample handling steps : (S1) is the initial step where the liquid is injected ; (S2) is the second step where the liquid is sampled by air injection ; and (S3) is the last step where air is continuously injected to keep the liquid far from the PDMS chamber walls during the solvent evaporation.	70
3.5	Experimental setup for sugar identification and quantification based on a microscope-FTIR spectrometer with the new designed microfluidic device.	71
3.6	Cleaning setup of the TRM and the PDMS substrate.	72
3.7	(a) Sugar layer deposited on the hydrophilic surface of the TRM. The 2D graphs of sugar absorption obtained in the ARZ using (b) the classical TRM , and (c) the new microfluidic device. The variation of the absorption intensity is shown in the right column for each 2D graph.	73
3.8	Tested height-width combination of the PDMS chambers. Three zones are identified : Bright, opaque and unreliable zones.	74
3.9	Transmission spectra for different sugar types at different concentrations. (a) Glucose spectra ; (b) Fructose spectra ; (c) Sucrose spectra.	76
3.10	Glucose absorption intensity versus its concentration for different peaks, for the absorption peaks at (a) 774 cm ⁻¹ , (b) 834 cm ⁻¹ , (c) 910 cm ⁻¹	78

3.11	Fructose absorption intensity as a function of its concentration for different peaks, for the absorption peaks at (a) 978 cm^{-1} , (b) 924 cm^{-1} , (c) 870 cm^{-1} , (d) 818 cm^{-1} , (e) 784 cm^{-1} .	79
3.12	Sucrose absorption intensity versus its concentration for different peaks, for the absorption peaks at (a) 992 cm^{-1} , (b) 922 cm^{-1} , (c) 868 cm^{-1} , (d) 832 cm^{-1} .	80
4.1	Proposed approach and setup for neurotransmitter detection in aqueous solution based on microscope-FTIR spectrometer.	88
4.2	Developed SHS. SDA : sample deposition area, TRM :Total Reflective Mirror.	90
4.3	Image of deposited molecular layer on a spot after solvent evaporation (optical zoom x10).	91
4.4	Proposed algorithm.	93
4.5	Histogram of a 50 μM -(Gly) sample using literature fingerprint.	95
4.6	(a) Infra-Red image of the ARZ for a 100 μM Do-hy sample using (a) the standard SHS and (b) the new developed SHS.	96
4.7	Transmission spectra of a 100 μM Do-hy sample (a) using the standard SHS where gray vertical bars are obtained standard deviation and (b) using the new developed SHS.	97
4.8	(a). Histogram of a 50 μM -(A-ch) sample and (b). 100 μM -(L-AA) and 500 μM -(L-Glu) mixture sample based on literature fingerprints.	98
4.9	Obtained histogram based on URPG for (a).50 μM -(A-Ch) sample and (b). 100 μM -(L-AA) and 500 μM -(L-Glu) mixture sample.	101
4.10	Histogram of a 4 mM -(L-AA) sample with error_max=5 and using the modified fingerprints database.	102

Liste des abréviations

GDP	Canada's Gross Domestic Products - Produits intérieurs bruts du Canada
IR	InfraRed - Infrarouge
Mid-IR	Middle Infrared - middle Infrarouge
UV	UltraViolet
Vis	Visible
FTIR	Fourier Transfer Infrared - Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ATR	Attenuated Total Reflectance - Réflectance totale atténuée
PLS	Partial Least Squares - Moindres carrés partiels
CV	Cyclic-Voltammetry - voltamétrie cyclique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography - Chromatographie en phase liquide à haute performance
SMÉ	système de manipulation de l'échantillon
TRM	Total Reflective Mirror
SHS	Sample Handling Support / System - Support / Système de maintien des échantillons
SPCE	Screen Printed Carbon Electrodes - Électrodes de carbone imprimées
LED	Light-Emitting Diode - Diode électro-luminescente
ARZ	Analysis Rectangle Zone - Zone d'analyse rectangulaire
SDA	Sample Deposition Area - Zone de dépôt d'échantillon
L-W	Line-Width - largeur de pic
Liquid-MV	Liquid MicroValve - Microvalve du liquide
Air-MV	Air MicroValve - MicroValve d'air
MP	MicroPump - Micropompe
D_p	number of Detected Peaks - Nombre de pics détectés
N_{rp}	Number of peaks in the fingerprint database - Nombre de pics dans la base de données d'empreintes.

URPG Unique Reference Peak Group - Groupe de pics de référence unique

DPE Detection Peak Error - Erreur de détection de pic

LOD Limite Of Detection - Limite de détection

FES Finite Element Simulation - Simulation par éléments finis

HTRM High Temperature Resistance Materials - Matériaux résistants aux hautes températures

PLA PolyLactic Acid polymer - Polymère d'acide polylactique

Do-hy Dopamine hydrochloride

L-AA L-Ascorbic acid

A-ch Acetylcholine chloride

GABA γ -Aminobutyric

L-Glu L-Glutamic acid

Gly Glycine

BOD₅ Biological Oxygen

COD Chemical Oxygen

DOC Dissolved Organic Carbon

TOC Total Organic Carbon

Cd-MOF Cationic Metal-Organic

*A la mémoire de
Mon père Abed Lahmid.
Mon frère Yosri.
Dédié à
Mon cher fils Ghali
Ma chère mère Fafani.
Ma chère femme Marwa.*

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Prof. Amine Miled de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Par son aide, ses conseils et son soutien moral, il m'a permis d'acquérir une très bonne expérience en modélisation par éléments finis, en conception de dispositifs miniaturisés, en conception électrique et bien plus. Ses conseils m'ont été d'une très grande aide tout au long de ce projet. Je tiens également à remercier profondément Prof. Younès Messaddeq de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fourni toute l'infrastructure nécessaire pour pouvoir atteindre les objectifs de ce projet, ainsi que pour ces précieux conseils. De plus, je remercie Mourad Roudjane pour son implication dans le projet à travers ses commentaires, qui m'ont aidé à résoudre de nombreux défis tout au long de mes travaux de recherche. Je remercie aussi le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour son soutien financier grâce aux subventions qu'il a accordées au professeur Miled afin que je puisse mener à bien ce projet.

Avant-propos

Les chapitres 2 à 4 de cette thèse sont des articles déjà publiés dans des journaux scientifiques avec un comité de révision. Ci-dessous, un bref avant-propos de chacun des chapitres :

Chapitre 2/ Article 1

Landari, H., Blais, J. C., Messaddeq, Y., & Miled, A. (2020). Multi-Modal Sensing Platform for Continuous Analysis of Maple Syrup in Production Process. *IEEE Sensors Journal*. (publié)

Cet article décrit le développement d'une plateforme multicateur pour la détection du saccharose dans un échantillon de sirop d'érable ainsi que les résultats d'analyse avec cette plateforme. Le développement, la conception et l'assemblage électrique de cette plateforme ont été réalisés au complet par Landari, H. et Blais, J. C. En effet, Blais, J. C. est un étudiant en Baccalauréat qui a effectué un stage au laboratoire LABioTRON à l'été 2018. La conception, la fabrication et l'assemblage mécanique et fluide de la plateforme ainsi que la modélisation numérique et les tests in-situ de la plateforme ont été réalisés par le premier auteur. La rédaction de cet article a été réalisée par le premier auteur et révisée et améliorée par Messaddeq, Y. et Miled, A. À l'exception des tailles et des positions des figures ainsi que le retrait des sections remerciement, déclaration de conflit d'intérêt et bibliographie, il n'y a pas de différence significative entre l'article inclus dans cette thèse et l'article original publié.

Chapitre 3/ Article 2

Landari, H., Roudjane, M., Messaddeq, Y., & Miled, A. (2018). Pseudo-continuous flow FTIR system for glucose, fructose and sucrose identification in mid-ir range. *Micromachines*, *9(10)*, 517. (publié)

Cet article présente le développement d'un nouveau système de maintien des échantillons et de manipulation microfluidique intégrée dans le spectromètre microscope-FTIR. De plus, les résultats d'analyse de différentes molécules, avec ce nouveau système et avec la configuration standard du spectromètre microscope-FTIR, sont présentés et discutés dans cet article. La conception, la fabrication et les assemblages mécanique, électrique et fluide du système,

ainsi que les analyses des échantillons, ont été entièrement réalisés par le premier auteur. La rédaction de cet article a été réalisée par le premier auteur et révisée et améliorée par les co-auteurs. À l'exception des tailles et des positions des figures ainsi que le retrait des sections remerciement, déclaration de conflit d'intérêt et bibliographie, il n'y a pas de différence significative entre l'article inclus dans cette thèse et l'article original publié.

Chapitre 4/ Article 3

Landari, H., Messaddeq, Y., & Miled, A. (2021). Microscope-FTIR Spectrometry Based Sensor for Neurotransmitters Detection. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*. (publié)

Cet article rapporte le développement d'une deuxième version du système de maintien des échantillons et de manipulation microfluidique pour le spectromètre microscope-FTIR. Il rapporte aussi l'architecture et l'optimisation d'un algorithme de traitement de données brutes qui sert à extraire la composition de l'échantillon à partir des spectres IR. De plus, nous présentons dans cet article les résultats des analyses d'échantillons de neurotransmetteurs et du traitement des spectres à l'aide de la nouvelle version du système de maintien et de manipulation des échantillons et de l'algorithme développé. La conception, la fabrication et les assemblages mécanique, électrique et fluidique du système, ainsi que les analyses des échantillons, ont été entièrement réalisés par le premier auteur. La rédaction de cet article a été réalisée par le premier auteur et révisée et améliorée par les co-auteurs. À l'exception des tailles et des positions des figures ainsi que le retrait des sections remerciement, déclaration de conflit d'intérêt et bibliographie, il n'y a pas de différence significative entre l'article inclus dans cette thèse et l'article original soumis.

Introduction

Contexte générale

L'identification et la quantification des espèces transmises aux cellules nerveuses sous la forme de neurotransmetteurs, lors des échanges moléculaires entre les neurones, nous permettent de mieux comprendre certains fonctionnements du cerveau et certaines maladies neurodégénératives [4]. Cette compréhension à son tour nous permettrait à long terme d'améliorer la qualité de vie des patients souffrants de ces maladies. L'analyse chimique et moléculaire d'un échantillon permet de déterminer sa composition moléculaire. Ceci peut s'avérer très important pour le diagnostic des maladies en médecine, mais aussi pour déterminer les valeurs nutritionnelles des aliments en agroalimentaires et la qualité de l'eau parmi d'autres applications. Cependant, dans le cas des opérations chirurgicales, de la détection de la toxicité de l'eau ou dans un processus industriel en agroalimentaire, l'analyse moléculaire et chimique doit se faire rapidement et à faible coût [5, 6]. Évidemment, les molécules à identifier varient d'une application à une autre. Par exemple, dans les échantillons liquides du cerveau, nous nous intéressons à l'identification et à la quantification des neurotransmetteurs libérés lors d'une communication neuronale à partir d'un échantillon extrait du liquide céphalo-rachidien. Aussi, une analyse des produits alimentaires permet par exemple de déterminer la quantité de sucre ou de sel dans les aliments pour respecter les réglementations nationales ou internationales [7]. En effet, dépendamment de l'application et de l'échantillon à analyser et de la précision souhaitée, différentes techniques de détection et d'extraction peuvent être utilisées. Parmi les techniques de détection, nous citons l'électrochimie et les capteurs optiques à fluorescence ou à chimioluminescence [8]. Cependant, les instruments/techniques utilisés pour analyser des échantillons solides n'offrent pas toujours les mêmes performances pour des échantillons gazeux ou liquides. De plus, des contraintes imposées par l'échantillon peuvent nous amener à choisir une technique de détection par rapport à une autre, comme (1) la nature de l'échantillon, que ce soit aqueux ou non, (2) hautement concentré ou à faible concentration et (3) homogène (avec un seul type de molécules) ou hétérogène [8]. Par ailleurs, dans la nature, il existe des molécules comme le fructose, le glucose ou le saccharose, qui ne sont pas détectables par certaines techniques de détection telles que l'électrochimie, la fluorescence ou la chimioluminescence, dans leurs configurations standards, Leur détection nécessite des fonctionnalisations des surfaces

ou l'ajout des additifs fonctionnalisés. Cependant, ces molécules sont identifiables à l'aide de la spectroscopie IR dans plusieurs de ces configurations standards. Donc, le choix de la technique est crucial pour une analyse chimique et moléculaire performante et efficace.

Motivations et objectif du projet

Le choix des outils d'identification et de quantification moléculaires d'un échantillon dépend de plusieurs facteurs tel que la nature de l'échantillon et sa concentration moléculaire. À notre connaissance, la majorité des outils qui ont été étudiés et validés se limitent à l'analyse des échantillons ayant des caractéristiques spécifique [9]. Par exemple, la spectroscopie UV / Vis permet d'identifier et de quantifier un neurotransmetteur avec une haute sensibilité lorsque l'échantillon analysé est homogène. Ainsi, lorsqu'un échantillon contient plus d'un type de neurotransmetteurs, les processus de détection et d'analyse de données changent, en raison d'un risque élevé de chevauchement des signatures optiques dans une plage de longueurs d'onde donnée. Ceci peut être généralisé à d'autres molécules. En effet, la même situation survient lors de la détection de molécules de sucre par la spectroscopie UV / Vis ou par l'électrochimie.

Parmi les techniques de détection les plus utilisées pour l'analyse chimique, nous distinguons la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) qui est une technique optique très performante. Cette technique est utilisée dans plusieurs domaines, dont l'identification de la composition moléculaire d'échantillons variés, le contrôle de la qualité des matériaux, et l'analyse des couches minces et des revêtements. Malgré que les phénomènes mis en jeu lors de l'interaction matière-lumière sont différents en fonction des plages de longueurs d'onde, une plage plus large offre un plus grand nombre de signatures optiques. Puisque la plage de longueurs d'onde infrarouge (IR) est plus large que celle du visible et de l'ultraviolet, avoir des chevauchements entre quelques signatures optiques n'est pas aussi critique tant qu'on détecte toujours des pics isolés permettant d'identifier la composition de l'échantillon. Par conséquent, la spectroscopie FTIR offre une plus grande flexibilité de détection. Par ailleurs, le coût de la spectroscopie FTIR est souvent considérablement inférieur à ceux de plusieurs autres techniques nécessitant l'utilisation de produits consommables tels que la chromatographie, l'électrochimie et la colorimétrie. De plus, la spectroscopie FTIR peut avoir différentes configurations en fonction de son module de maintien et de manipulation de l'échantillon. Pour la plupart des configurations existantes, cette technique n'est pas recommandée pour l'analyse des échantillons aqueux. En effet, l'absorption des rayonnements IR par les molécules d'eau peut entraîner une atténuation totale du signal, ce qui complexifie l'analyse de la composition de l'échantillon. Une des configurations de la spectroscopie FTIR qui résout ce problème est la réflectance totale atténuée (ATR-FTIR). Cette configuration est mise en œuvre en plaçant l'échantillon en contact avec un support transparent à fort indice de réfraction (supérieur à l'indice de réfraction de l'échantillon) pour les radiations IR d'intérêt. Lorsqu'un faisceau traverse ce support, une haute réflexion au niveau de l'interface a lieu lorsque l'angle d'incidence

est supérieur à un angle critique qui dépend à la fois du faisceau, de l'échantillon et du support. Cependant la réflexion des radiations n'est pas totale. En effet, une onde évanescente est réfractée en pénétrant dans l'échantillon sur une distance de quelques micromètres. La distance de pénétration dépend des caractéristiques du support, des radiations émises et des caractéristiques de l'échantillon. En analysant les radiations réfléchies, nous pouvons ainsi caractériser l'échantillon. Cette configuration minimise donc l'atténuation des radiations transmises au détecteur. Bien que l'ATR-FTIR résout le problème de la forte absorption des rayonnements IR par les molécules d'eau, cette technique est très lente lorsqu'il s'agit d'un grand nombre d'analyses. De plus, son utilisation présente un risque élevé de contamination lors de la réalisation d'une série d'analyses d'échantillons, sans effectuer un nettoyage efficace entre chacune.

Une autre configuration très répandue de la spectroscopie FTIR est l'utilisation d'un microscope dédié. Ainsi, le spectromètre microscope-FTIR permet de visualiser la distribution des diverses espèces dans l'échantillon en plus de l'analyse spectroscopique IR. En effet, le spectromètre "microscope-FTIR" fournit aussi des images IR de la zone analysée de l'échantillon. Ces images illustrent la distribution spatiale de l'atténuation dans l'échantillon. Elles peuvent être ensuite utilisées dans la caractérisation de la répartition des espèces qui le composent. En plus, cette configuration offre deux modes d'utilisation possibles : le mode en transmission et le mode en réflexion. En fonction du mode choisi, un système spécifique de maintien des échantillons doit être utilisé. Dans le cas du mode en transmission, ce système est constitué d'un matériau non absorbant dans la gamme IR d'intérêt. Plusieurs matériaux sont disponibles, dont le bromure de potassium, le saphir, et le quartz fondu. Quant au mode en réflexion, un support de réflexion totale est utilisé afin de maintenir l'échantillon et réfléchir le faisceau IR. Bien que le coût de ce type de support soit relativement faible, l'atténuation du faisceau induite par l'absorption de l'échantillon est deux fois plus élevée qu'avec le mode en transmission. En effet, le faisceau traverse l'échantillon deux fois : une première fois en entrant et une deuxième fois en sortant après sa réflexion totale sur la surface réfléchissante.

L'objectif principal de cette thèse est de concevoir et d'améliorer un système simplifié de biodétection moléculaire capable d'analyser différents types d'échantillons en utilisant le spectromètre microscope-FTIR. Ces échantillons sont principalement des solutions aqueuses qui peuvent être biologiques, synthétiques, homogènes ou hétérogènes. De plus, les concentrations des molécules cibles peuvent varier de quelques mM à quelques μM . Ces molécules peuvent être des neurotransmetteurs dans un échantillon biologique ou synthétique, ou des nutriments comme des sucres dans des aliments ou autres. L'aspect distinctif de ce projet consiste dans le développement d'un nouvel outil de manipulation microfluidique avancée et d'analyse chimique basée sur le spectromètre microscope-FTIR. De plus, nous introduisons un algorithme de traitement de spectres IR pour l'identification de la composition moléculaire d'un échantillon.

Méthodologie et contributions de la thèse

Dans cette thèse, nous nous intéressons à la conception et à l'amélioration d'un système de bio-détection moléculaire capable d'analyser divers échantillons, ainsi qu'au développement d'un algorithme de traitement de données brutes pour l'identification de la composition d'un échantillon. Nous avons d'abord testé plusieurs techniques d'analyse chimique pour la détection des molécules de saccharose dans des échantillons biologiques de sirop d'érable. Les techniques testées sont principalement l'électrochimie, la spectroscopie d'impédance électrique et la spectroscopie UV / Vis. Bien que les résultats obtenus soient prometteurs, ces techniques avaient une faible sensibilité et une sélectivité pour les applications visées et dans les conditions expérimentales utilisées. Par la suite, la technique de spectrophotométrie a été testée avec des solutions de glucose synthétiques. Cette technique avait les mêmes limitations précédentes dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées. Enfin, la spectroscopie IR a été testée sur des échantillons synthétiques de glucose, de fructose et de saccharose, en choisissant le microscope-FTIR en mode réflexion comme instrument d'analyse. Ces tests ont été effectués en utilisant le système de maintien standard du spectromètre microscope FTIR, qui consiste en un miroir entièrement réfléchissant. Les résultats préliminaires montrent les limites de cette configuration pour l'analyse des échantillons aqueux. En effet, le faisceau IR réfléchi est entièrement atténué par les molécules d'eau contenues dans l'échantillon. par conséquent, le défi de ce travail de recherche est d'améliorer et d'optimiser cet instrument dans sa configuration en réflexion pour analyser divers échantillons aqueux. En outre, l'originalité de ce projet réside principalement dans l'amélioration du microscope-FTIR. Ainsi, l'objectif était purement du côté implémentation matérielle au niveau électrique/électronique, fluïdique et mécanique. D'abord, cette méthode présente le plus faible risque de contamination par rapport aux autres méthodes. En effet, grâce à son principe de fonctionnement optique, l'échantillon n'est jamais en contact avec le détecteur ou les modules optiques de l'instrument. Ensuite, certaines molécules, comme les sucres, ne réagissent pas à la lumière visible (et aux UV). D'autres molécules, comme les neurotransmetteurs, ont des signatures optiques très similaires dans cette plage de longueurs d'onde. Bien que les récentes avancées technologiques nous ont permis de détecter un grand nombre de types de molécules avec la spectroscopie UV/Vis, électrochimie, fluorescence, etc., ces techniques peuvent nécessiter un niveau d'expertise avancé par rapport à la manipulation des additives chimiques. Par ailleurs, la plupart des molécules retrouvées dans la nature réagissent aux radiations IR, qui ont une plus large plage de longueurs d'onde. De plus, chaque molécule possède une combinaison de signatures optiques IR qui dépend uniquement de sa composition et de son architecture. Toutefois, plusieurs configurations de la spectroscopie IR existent telles que le mode en transmission, l'ATR et le mode en réflexion spéculaire. Celui en transmission exige que la solution soit encapsulée dans une cellule dont les parois sont transparentes pour les radiations d'intérêt. Cependant, le verre est opaque pour l'IR moyen, ce qui limite son utilisation. D'autres matériaux existent à des coûts plus élevés et avec une compatibilité réduite avec le solvant d'intérêt (comme les supports d'échantillon en NaCl) [10].

L'ATR est une excellente option pour l'analyse des échantillons aqueux vu qu'elle nécessite peu de volume et très peu de préparations et elle peut analyser des solutions à forte absorption IR du solvant. Par ailleurs, le changement ou la modification du support de l'échantillon (Prisme) en fonction des caractéristiques des échantillons est complexe. En effet, ce support n'est pas un élément externe, mais il fait partie de l'instrument. Par conséquent, un nettoyage efficace entre chaque analyse doit être effectué. De plus, l'homogénéité de l'échantillon est très importante pour avoir des résultats fiables alors que la zone analysée de l'échantillon n'est pas directement observée. En effet, l'angle de réfraction et la puissance de l'onde évanescente qui pénètre dans la solution dépendent des caractéristiques de l'échantillon à l'interface. Finalement, la configuration en réflexion spéculaire pour des échantillons liquides est avantageuse par rapport au support du maintien de l'échantillon utilisé. Le nettoyage de ce support peut, dans la plupart des cas, s'effectuer facilement à l'extérieur de l'instrument. De plus, des supports réfléchissants à faibles coûts existent dans le marché. Néanmoins, les solutions aqueuses présentent une forte atténuation du signal transmis aux détecteurs. Cette atténuation limite donc l'utilisation de cette configuration. De plus, un spectromètre microscope-FTIR en mode réflexion nécessite des capsules sophistiquées pour pouvoir maintenir des échantillons liquides à faible facteur d'atténuation des radiations [11].

Notre travail permet d'améliorer l'instrument spectromètre microscope-FTIR afin de pouvoir détecter différents types de molécules dans des solutions aqueuses. Cette amélioration consiste à repousser les limites de cet instrument, dont l'inaptitude de manipuler des échantillons à l'état liquide, le temps d'analyse (incluant la préparation de la mise en œuvre) et le risque de chevauchement de la signature optique du solvant avec celle des molécules contenues dans l'échantillon. De plus, nous avons développé un algorithme de traitement de données qui permet de simplifier la tâche d'analyse des résultats. Cet algorithme permet d'identifier, avec une grande précision et peu d'expertise, différents neurotransmetteurs, dans des échantillons homogènes et hétérogènes.

Organisation de la thèse

Cette thèse est composée de quatre chapitres précédés par la présente introduction qui présente le contexte général de cette recherche, les motivations, l'objectif, la méthodologie et les contributions de la thèse, ainsi que son organisation. Le chapitre 1 est une revue de la littérature des techniques d'analyse chimique les plus communément utilisées pour la détection de différents types de molécules. Dans ce chapitre, nous avons abordé aussi le principe de détection de chacune des techniques les plus connues, en soulignant leurs principaux avantages et limites. Le chapitre 2 décrit le développement d'une plateforme multicapteur pour la détection du saccharose dans des échantillons de sirop d'érable. Il présente également les résultats des analyses obtenues par les différents modules (capteurs) de la plateforme tels que l'électrochimie, la spectroscopie UV / Vis et l'impédance électrique. Nous avons aussi évalué

les performances de chacun des modules de la plateforme pour la détection des molécules de saccharose. Le chapitre 3 de cette thèse présente le développement d'un nouveau système de maintien des échantillons et de manipulation microfluidique. Ce système est utilisé avec le spectromètre microscope FTIR pour la détection des trois molécules de sucres, soit le glucose, le fructose et le saccharose. Ainsi, nous présentons dans ce chapitre la conception, la fabrication et l'optimisation des différentes parties de ce système. Le spectromètre microscope FTIR a été testé pour la détection de ces trois molécules avec deux configurations différentes : la configuration standard du spectromètre et celle qui utilise le nouveau système. Les résultats des analyses de sucres avec ces deux configurations sont présentés et discutés dans ce chapitre. Le dernier chapitre rapporte le développement d'une deuxième version du système de maintien des échantillons et de manipulation microfluidique pour le spectromètre microscope FTIR. Outre la description de cette version du système, nous présentons les résultats des analyses de six neurotransmetteurs différents (dopamine hydrochloride, L-ascorbic acid, acetylcholine chloride, γ -aminobutyric, glycine and L-glutamic acid) en utilisant le système développé. De plus, nous présentons l'architecture et l'optimisation d'un algorithme de traitement de données fourni par le spectromètre microscope FTIR. Cet algorithme est utilisé pour extraire la composition d'un échantillon à partir de son spectre de transmission IR en se basant sur la signature optique rapportée dans la littérature. Toutefois, en utilisant l'ensemble des pics des signatures moléculaires, nous n'avons pas pu extraire la composition exacte de l'échantillon. Donc, nous avons proposé une nouvelle méthode qui permet de définir une nouvelle signature d'une molécule en se basant sur un groupe de pics de référence unique (URPG) pour chaque molécule, extrait à partir de sa signature de référence. Ainsi, chaque molécule aura son propre URPG pour la différencier des autres. Un pic de référence doit répondre à deux critères pour être considéré comme pertinent pour une molécule : (1) être unique pour la molécule ; c'est-à-dire qu'il n'est observé dans aucun spectre autre que ceux des échantillons qui contiennent la molécule cible et (2) la différence entre le pic d'une molécule et n'importe quel autre pic des autres molécules doit être supérieure à $error_max$. $error_max$ représente la différence maximale tolérée, entre un pic de référence et un pic détecté dans un spectre, pour que ce dernier soit attribué à cette molécule. Par conséquent, le nombre de pics à chaque URPG a été considérablement réduit par rapport au nombre des pics dans la signature de référence. Finalement, cette thèse est clôturée par une conclusion générale contenant un bilan des contributions réalisées dans cette recherche et des directions pour des travaux futurs pouvant être menés dans le même thème que ce projet.

Chapitre 1

Techniques de détection pour la bio-analyse

1.1 Introduction

Selon *Helmut Günzler*, la chimie analytique (ou analyse chimique) consiste dans l'examen d'un matériau dont le but est d'obtenir des informations sur ses constituants [12]. Ces informations peuvent être sur l'état de la matière, sa composition (concentration et contenu), sa distribution moléculaire (homogénéité et distribution par rapport aux surfaces limites) et sa structure (disposition spatiale des atomes et des molécules). Comme illustré dans la Figure 1.1, la chimie analytique est composée de deux grandes parties : préanalyse et expérimentale [12]. L'étape de préanalyse consiste à formuler une question spécifique sur les caractéristiques inconnues de l'échantillon tels que l'état, la concentration, la structure moléculaire, etc. Par la suite, nous devons choisir la cible de cette analyse. Cette cible peut être des ions, des atomes, des molécules, etc. D'autre part, la partie expérimentale débute par un processus d'échantillonnage suivi par des étapes de préparation. Ces deux processus sont souvent reconnues comme des sources potentielles d'erreur de l'analyse chimique [12]. Une analyse instrumentale de l'échantillon est effectuée directement après la phase d'échantillonnage et de préparation. Parmi les analyses instrumentales possibles, nous citons l'analyse qualitative et/ou quantitative de la ou les cibles. Ces analyses permettent d'extraire des informations comme, par exemple, la composition chimique, quelques interactions biologiques et quelques propriétés des aliments [12].

Il existe des techniques permettant de détecter la présence ou la quantification d'un large nombre d'espèces dans des échantillons variés en un seul test [13]. Par conséquent, les industries alimentaires, les laboratoires de recherche, et autres, utilisent plusieurs types de ces outils pour des applications diversifiées tels que la détection rapide de quelques espèces (virus, bactéries...) [14], le traitement et la surveillance d'eau [15], l'identification des souches et la définition de

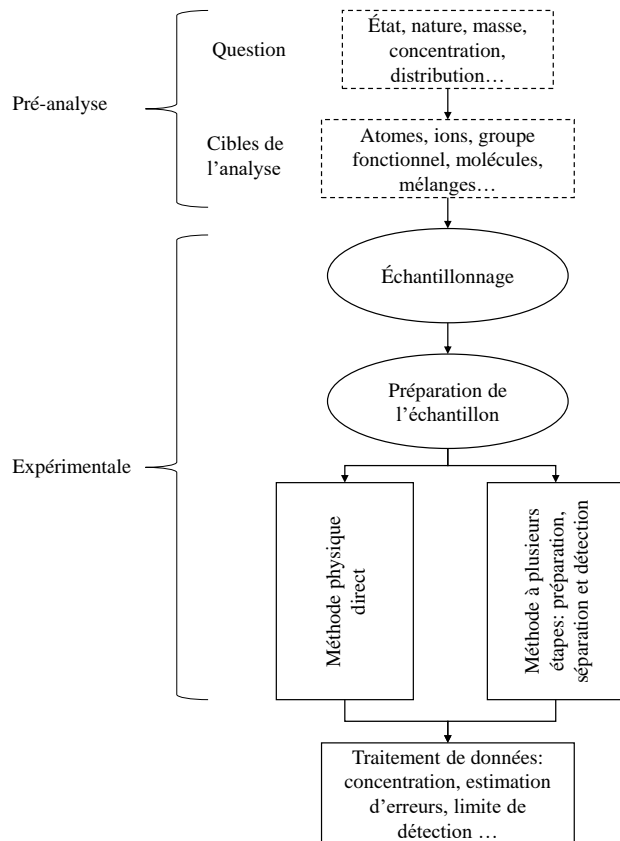


FIGURE 1.1 – Organigramme des étapes constituant une analyse chimique.

leur parenté, etc. [16].

Les outils de détection varient principalement selon leurs domaines d'application, leurs sélectivités, la reproductibilité de leur résultat et la facilité d'utilisation et d'interprétation des données. Analyser des échantillons biologiques aqueux est un défi majeur pour ces outils. Le tableau 1.1 montre quelques exemples d'application pour différentes techniques de détection.

TABLE 1.1 – Exemples d'applications de certaines techniques de détection moléculaire

Techniques	Fonctionnement	Échantillon	Espèces	Cocentrations	Ref
Spectroscopie UV/Vis	Absorption de lumière UV/Vis	Biologique (urine) Biologique (sérum foetal) Synthétique (aqueux)	Acide urique Glycine Acide folique Acide férulique Acide acrobatique Glucose	33 nM^* 100 nM^* 100 nM^*	[17]
Spectroscopie UV/Vis	Absorption de lumière UV/Vis	Synthétique (aqueux)	Dopamine	2.1 mM^*	[18]
Spectroscopie UV/Vis	Absorption de lumière UV/Vis	Coca Cola, sirop de menthe, jus de pomme et jus d'orange	Sucre total	40 gL^{-1} à 500 gL^{-1}	[19]
Chromatographie	Séparation basée sur l'affinité et détection par fluorescence	Café vert	Ochratoxine A	0.05 ngL^{-1} *	[20]
Chromatographie	Isocratique HPLC-fluorescence	Biologique (liquide cérébrale)	Norepinephrine, dopamine et sérotonine	6 à 62 $ngml^{-1}$	[21]
Chromatographie	Séparation basée sur l'affinité et détection de diffusion de la lumière par évaporation	Biologiques (fruits, plantes) dilués	Glucose, fructose, saccharose, maltose et raffinose	0.02 g à 0.68 g pour 100 g d'échantillon	[22]
Électrophorèse capillaire	Détection électrochimique	Synthétique (aqueux)	Dopamine, l'épinéphrine et catéchol	300 μM	[23]
Électrophorèse capillaire	Détection de fluorescence	Biologiques (liquide céphalo-rachidien et salive humain)	Acide glutamique, acide aspartique, glycine, taurine et glutamine	0.06 nM à 0.1 nM	[24]
Électrophorèse capillaire	Électrophorèse de zone capillaire	Biologique (fruits) dilué	Glucose, fructose et saccharose	13 à 24 mgL^{-1} *	[25]

* Limite de détection.

Table 1.1. Suite de la page précédente

Techniques	Fonctionnement	Échantillon	Espèces	Cocentrations	Ref
Spectroscopie FTIR	Microspectroscopie	Synthétique (aqueux)	Dopamine et acide ascorbique	$3 \mu M^*$ et $5 \mu M^*$	[26]
Spectroscopie FTIR	ATR-FTIR	Biologique (Miel)	Trehalose, glucose, fructose, saccharose, melezitose, turanose et maltose	$0.07 \mu gml^{-1}$ * à $0.17 \mu gml^{-1}$ *	[27]
Spectroscopie FTIR	Microspectroscopie	Synthétique (aqueux)	Glucose, fructose et saccharose	$1 mM$ à $3 mM$	[9]
Spectroscopie FTIR	ATR-FTIR	Synthétique (aqueux)	Glucose, fructose et saccharose	$50 gL^{-1}$	[19]
Spectroscopie Raman	Identification des vibrations Raman	Synthétique (aqueux)	Dopamine	$10 mM$	[28]
Spectroscopie Raman	Identification des vibrations Raman	Non mentionné	Dopamine et sérotonine	$100 \mu M$	[29]
Spectroscopie Raman	Identification des vibrations Raman	Biologique (sérum sanguin) diluée	Glucose	Non mentionnées	[30]
Fluorescence	Émission de photons suite à une excitation	Synthétique (aqueux)	Dopamine	$0.3 \mu M$	[31]
Fluorescence	Émission de photons suite à une excitation	Biologique (In-situ)	Sérotonine, dopamine et noradrénaline	Non mentionnées	[32]
Fluorescence	Émission de photons suite à une excitation	Synthétique (aqueux)	Glucose et dopamine	$6 mM$ et $40 \mu M$	[33]
Colorométrie	Émission de photons suite à une réaction chimique	Biologique (sérum sanguin)	Sérotonine	$0.12 \mu M^*$	[34]
Colorométrie	Émission de photons suite à une réaction chimique	Biologique (sérum enrichi)	Dopamine	$0.33 \mu M^*$	[35]

* Limite de détection.

Table 1.1 Suite de la page précédente

Techniques	Fonctionnement	Echantillon	Espèces	Cocentrations	Ref
Colorométrie	Émission de photons suite à une réaction chimique	Biologique(jus de pomme) diluée	Sucre total	8.7 μM^*	[36]
Électrochimie	Voltampérométrie	Synthétique (aqueux)	Dopamine, acide ascorbique et acide urique	0.5 μM^* , 10 μM^* et 0.5 μM^*	[37]
Électrochimie	Voltampérométrie différentielle à impulsions.	Synthétique (aqueux)	Dopamine	0.06 μM^*	[38]
Électrochimie	Voltampérométrie	Synthétique (aqueux)	Glucose	0.5 μM^*	[39]
Électrochimie	Ampérométrie	Biologiques (miel et jus de raisin)	Glucose	0.29 μM^*	[40]

* Limite de détection.

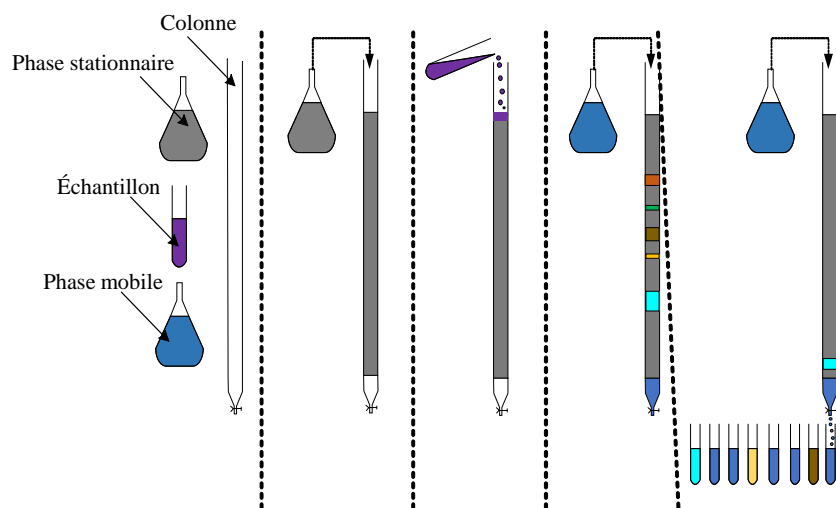


FIGURE 1.2 – Illustration du processus de séparation des espèces divers contenues dans un échantillon par la Chromatographie.

Nous présentons dans ce qui suit les des deux grandes familles de techniques de détection les plus connues, les techniques à caractère séparatif et celles à caractère non séparatif. Ce chapitre est organisé comme suit : la Section 1.2 présente des exemples de techniques de détection à caractère séparatif, ensuite la Section 1.3 rapporte des techniques de détection à caractère non séparatif.

1.2 Techniques de détection à caractère séparatif

Les techniques de détection à caractère séparatif se basent sur la séparation des constituants présents dans plusieurs mélanges en premier et la détection de ces constituants ensuite [13, 41, 42, 43, 44, 45]. Ces techniques possèdent une grande capacité de séparation, mais ne sont pas des techniques de détection en soi parce qu'elles nécessitent l'utilisation d'un détecteur avec le système de séparation. La chromatographie et l'électrophorèse capillaire font partie des techniques de détection à caractère séparatif les plus connues.

1.2.1 Chromatographie

La chromatographie est définie comme une méthode physique de séparation où les espèces à séparer sont distribuées entre deux phases (stationnaire et mobile) dans une configuration bien définie [46]. En effet, la séparation est basée sur l'entraînement d'un échantillon dissout dans une phase mobile à travers une phase stationnaire. La phase mobile peut être liquide, gazeuse ou un fluide supercritique tandis que la phase stationnaire peut être liquide ou solide [47]. La figure 1.2 illustre les étapes simplifiées d'un processus de séparation des molécules contenues

dans un échantillon par chromatographie. La phase stationnaire sert donc, à ralentir les espèces contenues dans l'échantillon dilué, lors de son écoulement à travers cette phase.

La classification de la chromatographie selon l'état physique de la phase mobile utilisée, définit 3 types : la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie en phase liquide (LC) et la chromatographie en phase supercritique (SFC) [48].

D'autres parts, 5 principaux types de chromatographie existent en fonction des phénomènes de séparation impliqués : la chromatographie d'exclusion, la chromatographie d'adsorption, la chromatographie à échange d'ions, la chromatographie de partage et la chromatographie d'affinité.

La chromatographie d'exclusion : Elle est simple par rapport aux autres types de chromatographie puisque les espèces contenues dans un échantillon sont séparées en fonction de leurs masses moléculaires, leurs tailles et leurs formes. Dans ce type, la phase stationnaire est généralement un solide poreux avec une surface inerte afin de diminuer l'interaction avec les espèces à séparer. Cette phase peut être faite à partir de divers matériaux comme le dextrane réticulé, le polyacrylamide, l'agarose, le polystyrène et le verre poreux [49]. La taille/forme des pores permet aux espèces de petite taille ou de formes spécifiques de se loger dedans et par conséquent, retarder leur déplacement par rapport aux espèces de plus grandes dimensions. Les espèces de grandes et moyennes dimensions sont donc récupérées en premier à la sortie colonne [50].

La chromatographie d'adsorption : Elle est basée sur l'affinité d'une espèce à se fixer d'une façon réversible sur la surface de la phase stationnaire par l'intermédiaire des liaisons faibles de type *Van der Waals*, par exemple. De même que la chromatographie d'exclusion, la phase stationnaire (appelée Adsorbant) est généralement de nature solide. Dans le cas où la phase mobile est gazeuse, la phase stationnaire peut être un tamis moléculaire, de l'oxyde d'aluminium ou des copolymères styrène-divinylbenzène. Pour la chromatographie liquide, l'adsorbant peut être non polaire (charbon de bois, polystyrène-divinylbenzène...), acide polaire (gel de silice) ou base polaire (oxyde d'aluminium) [49].

La chromatographie avec un échange d'ions : Elle sépare les différentes espèces en fonction de leurs charges nettes. Pour cela, on utilise des phases stationnaires chargées positivement pour un échange d'anions (les amines fortement basiques, telles que les groupes diéthyl aminoéthyle, ou faiblement basiques, tels que les groupes aminoéthyle (AE) et diéthylaminoéthyle (DEAE)) ou chargées négativement pour un échange de cations (des groupes fortement acides, tels que des ions sulfonate, ou faiblement acides, tels que le carboxyle ou le carboxyméthyle) [51, 50]. Quand les liaisons électrostatiques sont établies entre les constituants de l'échantillon et la phase stationnaire, les différentes espèces sont libérées de la phase stationnaire successivement, en fonction de la force de leurs interactions électrostatiques, suite

à l'injection de la phase mobile. Cette phase doit contenir des contre-ions pour attirer les espèces liées à la surface. Elle peut être une solution de sodium pour l'échange de cations ou une solution de chlorure pour l'échange d'anions. Cette libération, appelée aussi élution, peut être effectuée dans certains cas par un ajustement du pH afin de diminuer la charge des ions liés [51, 50].

La chromatographie de partage : se base sur la différence d'affinité (solubilité) d'une espèce à un milieu par rapport à un autre [46, 49]. Dans ce contexte, on utilise deux fluides non miscibles dont un est stationnaire et l'autre est mobile. Si les phases stationnaire et mobile sont respectivement polaire et non polaire, c'est la chromatographie en phase normale, sinon c'est la chromatographie en phase inversée [46]. Lors de l'injection de la phase mobile, les constituants de l'échantillon sont répartis entre ces deux milieux en fonction de leurs affinités respectives pour chacun d'entre eux. On définit alors un coefficient de partage de chaque espèce par rapport à chaque milieu [50]. Si une espèce moléculaire a plus d'affinité à la phase mobile, elle sera récupérée en premier et vice versa [50]. La forme la plus connue de la chromatographie de partage est la chromatographie liquide de haute performance (HPLC, "high performance liquid chromatography") [51, 52].

La chromatographie d'affinité : est la technique la plus sélective par rapport aux autres types de chromatographie où la séparation se base sur une liaison réversible qui peut avoir lieu entre une espèce de l'échantillon et un ligand spécifique sur la surface de la phase stationnaire [46]. Par conséquent, la phase stationnaire est généralement une résine avec une surface fonctionnalisée pour une molécule spécifique. L'élution de ces particules est effectuée par l'injection de la phase mobile après un lavage de la résine. Cette phase mobile doit avoir une forte force ionique ou comporte une forte concentration d'espèces fonctionnalisées avec le même ligand utilisé [46, 49, 50].

Les techniques de chromatographie peuvent aussi être classées en fonction du support de maintien de la phase stationnaire. Nous distinguons la chromatographie planaire et la chromatographie sur colonne. Le premier type consiste à utiliser une mince couche de solide comme phase stationnaire, installer généralement dans un environnement de séparation ouvert. Dans la deuxième forme, la phase stationnaire est placée dans un tube (appelé colonne) afin de former un environnement de séparation fermé [46].

Comme mentionné ci-dessus, la chromatographie est une méthode destinée seulement à la séparation des espèces contenues dans un échantillon. Cependant, on doit installer un détecteur en série avec la colonne pour avoir un outil de détection moléculaire. La réponse de ce détecteur est présentée sous forme de graphe appelé chromatogramme. Ce dernier indique la concentration des différentes molécules de l'échantillon à la sortie de la colonne en fonction du volume de la phase mobile ou du temps [53, 54]. Plusieurs types de détecteurs existent,

TABLE 1.2 – Exemples de détecteurs utilisés avec la chromatographie.

Type de détecteur	Principe de fonctionnement	Domaine d'application
Absorption [55]	Mesure l'absorption de la lumière à une longueur d'onde donnée ou à un ensemble de longueurs d'onde	Composés avec des chromophores qui peuvent absorber la lumière ultraviolette ou visible
Fluorescence [20]	Mesure la capacité de l'échantillon à absorber et à ré-émettre la lumière par fluorescence	Composés avec des fluorophores
Électrochimique [56]	Mesure le courant ou la tension résultant d'une réaction d'oxydo/réduction	Composés électrochimiquement actifs
Conductivité [57]	Mesure le changement de conductivité des ions élués	Solutés ioniques
Indice de réfraction [58]	Mesure le changement de l'indice de réfraction des composés élués	Universelle
Spectroscopie de masse [59]	Production des rapports masse/charge des ions élués	Universelle
Ionisation de flamme [60]	Production d'ions en phase gazeuse à partir de la combustion de composés organiques	Composés organiques
Diffusion de lumière évaporatif [61]	Mesure de la diffusion de la lumière après évaporation du solvant	Composés non volatils
Aérosols chargés [62]	Mesure des ions produits à partir de produits chimiques à l'aide d'une décharge corona	Composés non volatils
Conductivité thermique [63]	Mesure le changement de conductivité thermique	Universelle
Spectroscopie infrarouge [64, 65]	absorption de la lumière infrarouge	Composés absorbant les rayonnements IR

le tableau 1.2 présente quelques exemples ainsi qu'une brève description de leurs principes de fonctionnement [54].

Les performances de la chromatographie peuvent être affectées par plusieurs facteurs dont la longueur de la colonne, le débit d'injection, le volume et la viscosité de la phase mobile, le volume de l'échantillon, la température, etc. [54]. De plus, c'est une technique souvent complexe à mettre en œuvre et coûteuse, mais précise, sélective et sensible [47, 9].

Cependant, la chromatographie ne permet pas de quantifier des molécules non identifiées dans l'échantillon vu que les phases stationnaire et mobile, le mécanisme de séparation et les détecteurs sont spécifiques à des molécules en particulier. En effet, la chromatographie est une technique quantitative qui requiert une connaissance au préalable des molécules à détecter

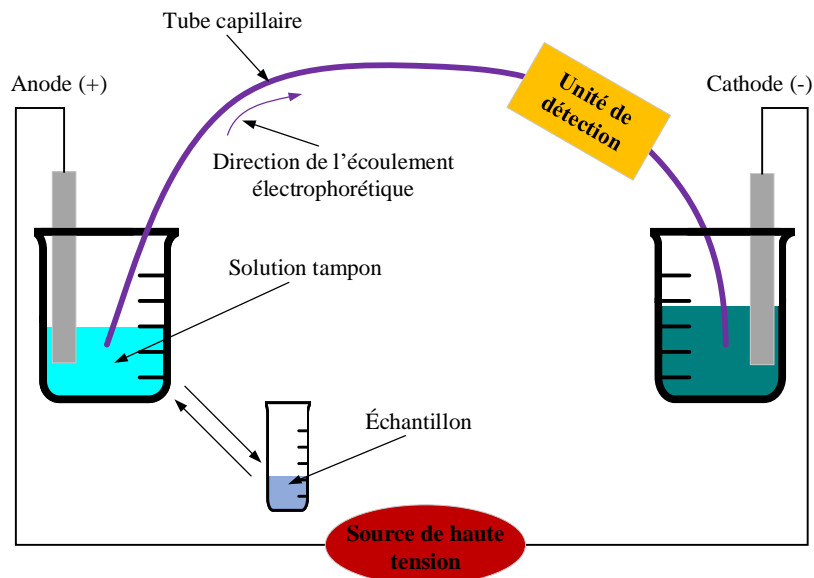


FIGURE 1.3 – Instrumentation de base de l'électrophorèse capillaire. L'entrée du tube capillaire est alternée entre l'échantillon et la solution tampon.

pour les quantifier.

1.2.2 Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une autre technique séparative qui est généralement utilisée pour séparer les espèces ioniques d'un échantillon en fonction de leurs mobilités électrophorétiques, suite à l'application d'une différence de potentiel électrique [66, 67]. La figure 1.3 montre l'instrumentation typique de l'EC pour la séparation de diverses espèces ioniques d'un échantillon. L'EC est composée donc, d'un canal capillaire, de deux électrodes et d'une source de haute tension (environ 500 V/cm) [68]. Le canal capillaire est rempli d'une solution tampon puis l'échantillon est injecté par effet capillaire. En appliquant un champ électrique entre l'entrée et la sortie du capillaire, tous les ions sont attirés par le flux électro-osmotique. Les espèces contenues dans l'échantillon sont donc séparées lorsqu'elles traversent le canal capillaire en raison de leurs différentes mobilités électrophorétiques. Le tube capillaire utilisé est souvent fabriqué à partir de la silice fondue et sa surface externe est recouverte d'une couche de polyimide de 15 à $35 \mu\text{m}$ afin d'améliorer sa résistance mécanique. Son diamètre interne varie généralement entre $25 \mu\text{m}$ et $75 \mu\text{m}$ et celui externe entre $200 \mu\text{m}$ et $375 \mu\text{m}$ [69].

Plusieurs types d'EC existent. Nous répertorions ici *l'électrophorèse capillaire de zone*, *l'électrophorèse capillaire sur gel*, *la chromatographie capillaire électrocinétique micellaire*, *l'électrochromatographie capillaire*, *l'électrophorèse capillaire à focalisation isoélectrique* et *l'isotachographie capillaire*. Ces types sont divisés en deux grandes familles, les systèmes continus et

les systèmes discontinus [70]. Les systèmes continus utilisent un électrolyte comme solution tampon alors que dans les systèmes discontinus, l'échantillon est maintenu dans le capillaire entre deux électrolytes différents (deux solutions tampons) [70, 67].

L'électrophorèse capillaire de zone : Elle est la forme d'EC la plus utilisée. Les espèces d'un échantillon sont séparées en fonction de leurs mobilités électrophorétique. Lorsqu'un champ électrique est appliqué, chacune des espèces se déplace dans le capillaire avec une vitesse différente des autres. Par conséquent, elles atteignent la sortie du tube capillaire séparément [70, 71].

L'électrophorèse capillaire sur gel : Elle sépare les espèces d'un échantillon en fonction de leur taille. Cette technique permet une diffusion minimale des différentes espèces à l'intérieur du tube capillaire et minimise aussi le transfert de chaleur causé par l'application de la haute tension. Le "polyacrylamide dodécyl sulfate de sodium" (SDS-PA) est couramment utilisé comme gel pour cette technique [71, 72].

La chromatographie capillaire électrocinétique micellaire : consiste à ajouter des micelles à la solution tampon afin de séparer les espèces par effet de partage entre ces micelles et le solvant. Cette technique offre la possibilité de séparer des espèces non chargées [70]. En effet, les micelles sont faites à partir de macromolécules amphiphiles qui contiennent des segments, à la fois hydrophiles et hydrophobes [73]. Des micelles de morphologies diverses existent en fonction de la taille/forme de ces segments, comme, des sphères, des bâtonnets, des tubules, des lamelles ou des vésicules [73]. Une micelle se compose essentiellement d'un noyau hydrophobe et d'une enveloppe externe hydrophile ou inversement [71, 72] [73]. Si par exemple, on considère les micelles comme des gouttelettes d'huile avec une surface très polaire et une charge négative, même si ces gouttelettes sont attirées vers l'anode, dans un tube capillaire non revêtu, elles migrent vers la cathode en raison du flux électroosmotique [70, 71, 72]. Cependant, les micelles se déplacent vers la cathode à une vitesse plus faible que la phase liquide (tampon) en raison de leur attraction vers l'anode. Les molécules neutres se répartissent à l'intérieur et à l'extérieur des micelles en fonction de leur hydrophobie. Par exemple, une molécule neutre très hydrophile ne sera pas attirée par la micelle et se déplace donc avec la même vitesse que la solution tampon. Par contre, une molécule neutre très hydrophobe passera beaucoup de temps à l'intérieur des micelles et se déplace donc lentement. Tous les autres solutés présentant une hydrophobie intermédiaire sont attirés par les micelles pendant seulement une partie de la migration. Par conséquent, ces solutés se déplacent à une vitesse proportionnelle à leur taux d'hydrophobie [70, 71, 72].

L'électrochromatographie capillaire : Elle utilise un principe de séparation similaire à celui de la chromatographie à échange d'ion. En effet, la surface interne du tube capillaire est recouverte par une substance qui sert à ralentir les espèces lorsqu'elles se déplacent à

cause du flux électrophorétique [71, 74]. La différence principale entre cette technique et la chromatographie, réside dans le type des forces qui induisent les déplacements de l'échantillon et de la solution tampon (pression pour la chromatographie versus forces électrostatiques pour l'électrochromatographie capillaire) [74, 75].

L'électrophorèse capillaire à focalisation isoélectrique : Elle est utilisée généralement pour séparer des espèces appelées composés zwitterioniques, comme les peptides et les protéines par exemples [76]. Ces composés contiennent à la fois des charges positives et d'autres négatives. Leurs charges nettes dépendent du pH de la solution [76]. Par conséquent, ils deviennent neutres à un pH spécifique pour chaque espèce, appelé point isoélectrique [77, 76]. Afin de séparer ces espèces, l'échantillon et une solution tampon sont placés à l'intérieur du tube capillaire. L'extrémité anodique du capillaire est placée dans une solution acide, et l'extrémité cathodique dans une solution basique [77, 76]. Suite à l'application du champ électrique, les composés de l'échantillon se déplacent dans le capillaire jusqu'à ce qu'ils s'immobilisent à un endroit où le pH est égal au point isoélectrique. Chaque espèce s'immobilise à une position différente jusqu'à un état stationnaire où il n'y a plus d'écoulement [77, 76]. Lorsque cet état est atteint, l'élution de ces espèces est effectuée par l'application d'une pression à l'une des extrémités du capillaire ou en soulevant la hauteur de l'une des extrémités du capillaire et permettant donc à ces espèces de se déplacer en traversant la cellule de détection [71, 77].

Isotachophorèse capillaire : Elle est une technique de séparation utilisée dans un système discontinu [70, 71]. Elle peut séparer un seul type d'ions à la fois, soit des anions, soit des cations. L'installation de cette technique consiste à remplir le tube capillaire par une solution contenant des ions ayant une mobilité supérieure à celle de toutes les espèces à séparer (appelé ion pilote) [78, 77]. L'extrémité du capillaire du côté de l'électrode de même signe que celui des ions à séparer est placée dans un réservoir contenant une solution avec des ions à mobilité inférieure à celle de tous les ions de l'échantillon (appelé ion terminal), cette extrémité du capillaire est, cathodique si l'échantillon contient des anions, ou anodique s'il s'agit des cations. Lorsque le champ électrique est appliqué, tous les ions se classent selon l'ordre de leur mobilité décroissante entre l'ion pilote et l'ion terminal [78, 77]. Une fois toutes les espèces sont classées, un état stationnaire est atteint où tous les ions, quelle que soit leur mobilité, se déplacent à une vitesse identique imposée par l'ion pilote de plus grande mobilité. Finalement, des zones, qui contiennent chacune une des espèces, sont formées entre l'ion terminal et l'ion pilote [78, 77].

L'EC est une technique séparative, l'ajout d'une unité de détection rend cette technique capable de quantifier les espèces moléculaires contenues dans un échantillon. Plusieurs détecteurs ont été utilisés avec cette technique, en fonction de l'application et des performances désirées [71, 69]. La plupart des détecteurs utilisés en chromatographie peuvent être utilisés en électrophorèse capillaire tel que l'absorption UV/Vis [79], la fluorescence [80], la spectroscopie de masse [81], l'électrochimie [82], etc.

Comparée à la chromatographie, l'électrophorèse capillaire offre des niveaux d'exactitude, de précision, de sensibilité et de sélectivité similaires [71, 69]. Les avantages les plus significatifs de l'EC sont les améliorations du temps et du coût de séparation [71, 69]. De plus, l'EC ne nécessite que quelques microlitres de la solution tampon, contre 20 à 30 *ml* de phase mobile pour une séparation par la LC standard [71, 69]. D'un autre côté, les limites de détection pour l'EC peuvent être inférieures à celles de la chromatographie [71, 69]. Finalement, l'application du champ électrique peut induire des changements dans la composition de l'échantillon, comme, des réactions d'oxydo/réduction qui peuvent avoir lieu, ce qui limite l'utilisation de cette technique [83, 9].

1.2.3 Microdialyse

Les sondes de microdialyse servent à échantillonner des molécules spécifiques à partir d'un milieu biologique. C'est une technique de séparation qui exige un système auxiliaire pour l'identification et la quantification moléculaire. Nous abordons dans cette section les sondes de microdialyse qui sont des techniques connues pour la séparation moléculaire in situ.

La première sonde de microdialyse a été présentée en 1966 par *Bito et al.* [84]. Elle consiste en un capillaire rigide contenu dans un autre capillaire formé par une membrane semi-perméable. La technique d'échantillonnage par microdialyse nécessite l'utilisation d'une pompe, d'une sonde de microdialyse et d'une solution de transfert (similaire au liquide du milieu biologique à analyser). Cette solution est injectée dans la sonde à travers le capillaire rigide (situé au milieu de la membrane de microdialyse) et les molécules se diffusent du milieu biologique vers cette solution à travers la membrane. Une fois les molécules diffusées, la solution est aspirée de nouveau par le deuxième canal et elle est analysée afin de quantifier les molécules séparées des autres constituants de l'échantillon. La Figure 1.4 illustre l'architecture d'une sonde de microdialyse.

La sonde de microdialyse peut être utilisée pour l'extraction des neurotransmetteurs du cerveau. Plusieurs molécules de neurotransmetteurs ont pu être extraites in situ telles que l'acétylcholine [85], la dopamine [86], la glutamate [87] et l'acide Homovanillique [86], avec des concentrations de à 0.6 μM , 0.4 μM , 20 μM et 1 μM respectivement. Cette sonde peut aussi être utilisée pour la libération contrôlée des médicaments. Il suffit d'injecter une solution à concentration élevée de la molécule à libérer, et une diffusion inverse de la sonde vers le milieu extérieur aura lieu [86]. Ainsi, la sonde a été utilisée pour effectuer la libération contrôlée in situ de médicaments pour stimuler des organes vitaux comme le cœur [88], le cerveau [89, 90, 91], les yeux [92] et les os [93] afin de tester de nouveaux traitements. Une autre application de la technique de microdialyse est dans le domaine agroalimentaire où elle permet d'extraire des échantillons à partir des fruits pour en analyser les constituants et surveiller ainsi leurs qualités [94]. Les sondes de microdialyse sont largement présentes dans la littérature. La compagnie *Microdialysis* est l'un des leaders de ce marché [3], parmi d'autres [95, 96]. La Figure

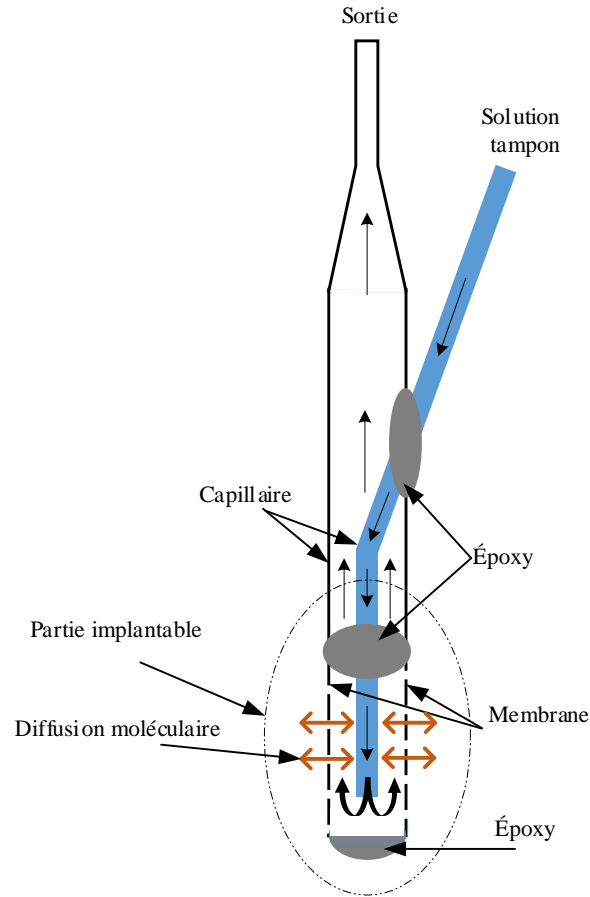


FIGURE 1.4 – Image schématique d’une sonde de microdialyse [1]

1.5 montre des exemples de sondes de microdialyse.

Cependant, la technique de microdialyse possède plusieurs limitations importantes. Il s’agit d’une méthode invasive dont les complications peuvent être graves [97]. Cela est dû au nombre de composants requis (tube d’injection, membrane et tube de récupération de la solution tampon) qui complique l’implantation de l’ensemble. Jusqu’à présent, la plus petite sonde implantable de microdialyse développée mesure $180 \mu m$ de largeur [98].

1.3 Techniques de détection à caractère non séparatif

Les techniques de détection à caractère non séparatif peuvent être utilisées pour l’identification ou/et la quantification des substances en solution avec une sélectivité inférieure à celle des techniques à caractère séparatif [9]. Elles sont souvent appelées des techniques de détection directe parce qu’elles ne sont pas précédées par des étapes séparatives. De plus, beaucoup de ces techniques sont utilisées avec des systèmes de séparation afin de détecter les espèces d’un échantillon après leur séparation. Plusieurs classifications de ces techniques existent, comme

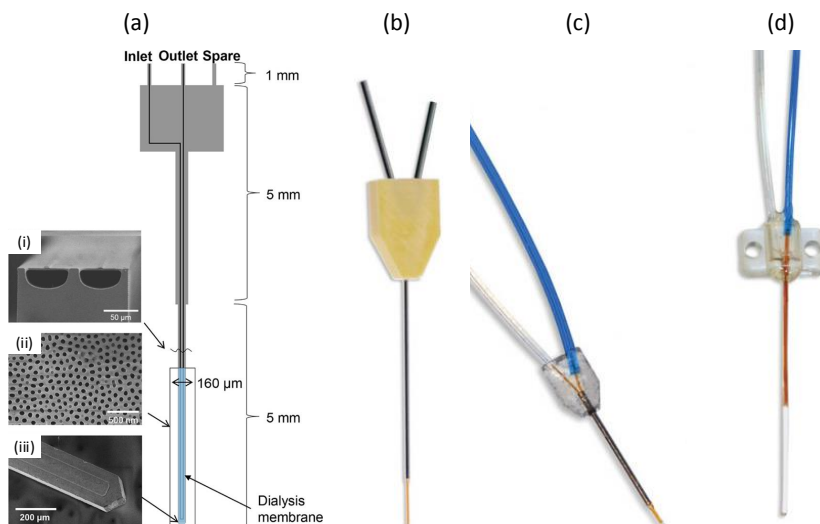


FIGURE 1.5 – Exemples de sondes de microdialyse. a. Sonde développée par *Lee et al.* : Une sonde à trois ports, entrée, sortie et un port réservée pour d'autres utilisations. (i). Image par Microscopie électronique à balayage (SEM) de la coupe transversale de sonde montrant une forme semi-circulaire et une couche supérieure en polysilicium mince. (ii). Image par SEM de la membrane en oxyde d'aluminium anodique. (iii). Image SEM de la pointe de la sonde de microdialyse montrant sa forme [2]. b. Sonde commerciales [3] : "CMA 11 Microdialysis Probes". La longueur de membrane : 1, 2, 3 ou 4 mm ; le Diamètre de la membrane 240, 260 ou 280 μm . c. "CMA 7 Microdialysis Probes". La longueur de membrane : 1 ou 2 mm ; le diamètre de la membrane 240, 260 ou 280 μm . d. "CMA 20 Microdialysis Probes". La longueurs de membrane : 4 ou 10 mm.

par exemple, les techniques optiques, non optiques, avec et sans marqueurs et les techniques de détection in situ et ex-situ, etc. Nous répertorions dans ce qui suit, quelques exemples des techniques de détection, les plus communes, sans classification spécifique.

1.3.1 Spectroscopie UV/Vis

La réaction de la matière, en réponse à son exposition à des radiations lumineuses dans la plage spectrale allant du proche ultraviolet au proche infrarouge (180nm à 1100 nm), a été considérablement étudiée d'un point de vue fondamental. Cette plage spectrale est souvent désignée par l'appellation raccourcie UV/vis (vis pour visible). En effet, la couleur d'une matière est définie par sa capacité à absorber et à émettre de la lumière. D'une façon générale, l'intervalle de longueurs d'onde concerné donne peu d'informations sur la structure des molécules, mais il est très utile pour les analyses quantitatives. Le spectre UV/Vis est divisé en trois bandes de longueurs d'onde, appelées respectivement : proches UV (185-400 nm), visible (400-700 nm) et proche infrarouge (700-1100 nm) [99]. Lorsqu'une molécule absorbe un ou plusieurs photons, l'énergie correspondante est captée par un ou plusieurs des électrons de covalence, menant à

une transition électronique qui fait passer l'énergie de la molécule d'un état fondamental à un état excité temporaire, appelé état virtuel. Cette différence d'énergie ΔE est exprimée en fonction de la fréquence ν du rayonnement par la relation de *Bohr-Einstein* :

$$\begin{aligned}\Delta E &= E_2 - E_1 \\ &= h\nu \\ &= hc\tilde{\nu}\end{aligned}\tag{1.1}$$

E_1 et E_2 sont respectivement des états d'énergies d'une molécule qu'elle peut supporter, avant et après son exposition à un rayonnement de longueur d'onde λ , $\tilde{\nu}$ est défini comme son nombre d'onde, h est la constante de *Planck* et c est la vitesse de la lumière dans le vide [99]. La transition entre E_1 et E_2 , ne peut se faire donc qu'à des nombres d'onde bien déterminés. La gamme de longueurs d'onde UV/Vis est importante, puisque les différences d'énergies correspondent aux énergies propres des états électroniques des atomes, d'où le concept de la spectroscopie électronique [100]. Ce changement d'énergie électronique est présenté sous forme de pic dans le spectre d'absorption d'un échantillon. Puisque chaque pic est lié à une transition électronique dans une ou plusieurs molécules données, l'analyse des différents pics permet d'identifier et de quantifier ces molécules d'intérêt [101].

Pour la quantification, nous utilisons la loi de *Beer* et *Lambert* présentée par l'équation (1.2) [99].

$$A_\lambda = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \varepsilon_\lambda \cdot \ell \cdot C.\tag{1.2}$$

où A_λ , $\frac{I}{I_0}$, ε_λ , ℓ et C sont respectivement l'absorption à une longueur d'onde λ , la transmittance de la solution, le coefficient d'extinction molaire [$L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$], la longueur du trajet optique à travers l'échantillon [cm] et la concentration molaire de la molécule cible [$mol \cdot L^{-1}$].

Dans la pratique, un spectromètre UV/Vis est composé principalement de trois modules : la source lumineuse, le système optique et le détecteur. La source lumineuse se compose généralement de deux lampes, une première lampe pour la partie UV ($\lambda \leq 350 \text{ nm}$) qui est généralement une lampe à arc au deutérium, et une deuxième lampe pour la partie visible et proche IR ($\geq 350 \text{ nm}$) du spectre, qui est souvent une lampe à incandescence avec un filament de tungstène et une enveloppe de verre de silice (quartz) [102, 101, 99]. Le deuxième module est le système optique de l'instrument. Il existe sous deux formes : la forme séquentielle et la forme simultanée [103, 104]. Le système optique simultané, moins utilisé, consiste à envoyer un faisceau lumineux contenant toutes les longueurs d'onde d'intérêts à travers l'échantillon. Par la suite, la lumière transmise est réfractée lors de son passage à travers un prisme. Cette réfraction est basée sur la différence des indices de réfraction de chaque longueur

d'onde [102, 101, 99]. Dans le système optique séquentiel, le plus utilisé, la lumière émise par la source est généralement colmatée par un miroir concave pour rendre les rayons incidents parallèles. Ensuite, un monochromateur permet d'exciter l'échantillon par des faisceaux de longueurs d'onde prédéterminées (faisceaux monochromatiques individuels). Le monochromateur peut être un miroir plan avec des stries parallèles (typiquement 1200 stries par millimètre) qui forment un réseau de diffraction. La présence des stries permet d'avoir des angles de diffraction qui dépendent des longueurs d'onde incidentes [102, 101, 99]. Le monochromateur peut être aussi un réseau de filtres qui laisse passer une seule longueur d'onde à la fois. Finalement, le monochromateur peut être un prisme, qui réfracte les faisceaux en fonction de leurs indices de réfraction [105, 106]. Le système optique séquentielle existe dans deux configurations, à faisceau unique et à doubles faisceaux. Un spectromètre à faisceau unique nécessite qu'une solution de référence soit analysée séparément. L'analyse de cette solution permet de définir la ligne de base ("Baseline") en mesurant l'absorption du support de l'échantillon (cuvette), de l'optique de l'instrument et du solvant. Les données fournies par cette analyse servent à construire le spectre du "background" qui sera soustrait du spectre obtenu lors de l'analyse de l'échantillon. Dans le cas d'un spectromètre à doubles faisceaux, la lumière transmise par le monochromateur est divisée en deux faisceaux d'intensités égales [105, 106]. L'un des faisceaux est utilisé pour l'échantillon, tandis que l'autre est utilisé pour la solution de référence. Cette configuration est avantageuse puisqu'elle élimine le risque d'erreur causé par la variation de l'intensité et de la composition spectrale de la source lumineuse ainsi que la variation des conditions de l'environnement d'analyse comme la température, par exemple [105, 106]. Les Figures 1.6.a, 1.6.b et 1.6.c montrent quelques exemples des systèmes optiques qui peuvent être inclus dans un spectromètre UV/Vis.

Le troisième module représente le détecteur optique qui sert à convertir l'intensité du faisceau émis par l'échantillon en un signal électrique. Généralement, deux cas se présentent selon le système optique utilisé. Dans le cas du système optique séquentiel, nous pouvons utiliser un semi-conducteur (photodiode au silicium). Pour le deuxième cas, nous devons mesurer les intensités lumineuses émises de toutes les longueurs d'onde au même instant ce qui nécessite l'utilisation d'un grand nombre de détecteurs de premier type, alignés et très rapprochés afin de former une barrette de diodes [99, 101, 102].

La plupart des spectromètres UV/Vis existants peuvent effectuer des analyses spectroscopiques entre 185 *nm* et 900 *nm*. La limite inférieure dépend de deux facteurs, la nature des matériaux optiques utilisés dans l'instrument et la présence ou non, sur le trajet optique, des particules ou molécules qui absorbent d'une manière intense en dessous de 185 *nm* (tel que le dioxygène et la vapeur d'eau contenus dans l'air ambiant) [102]. La limite supérieure ne dépend pas forcément de l'appareillage, mais aussi de la nature des échantillons à analyser. À l'exception de quelques espèces, comme des colorants polyméthiniques et des complexes inorganiques, la plupart des espèces ne présentent aucune absorption liée à une excitation électronique pour

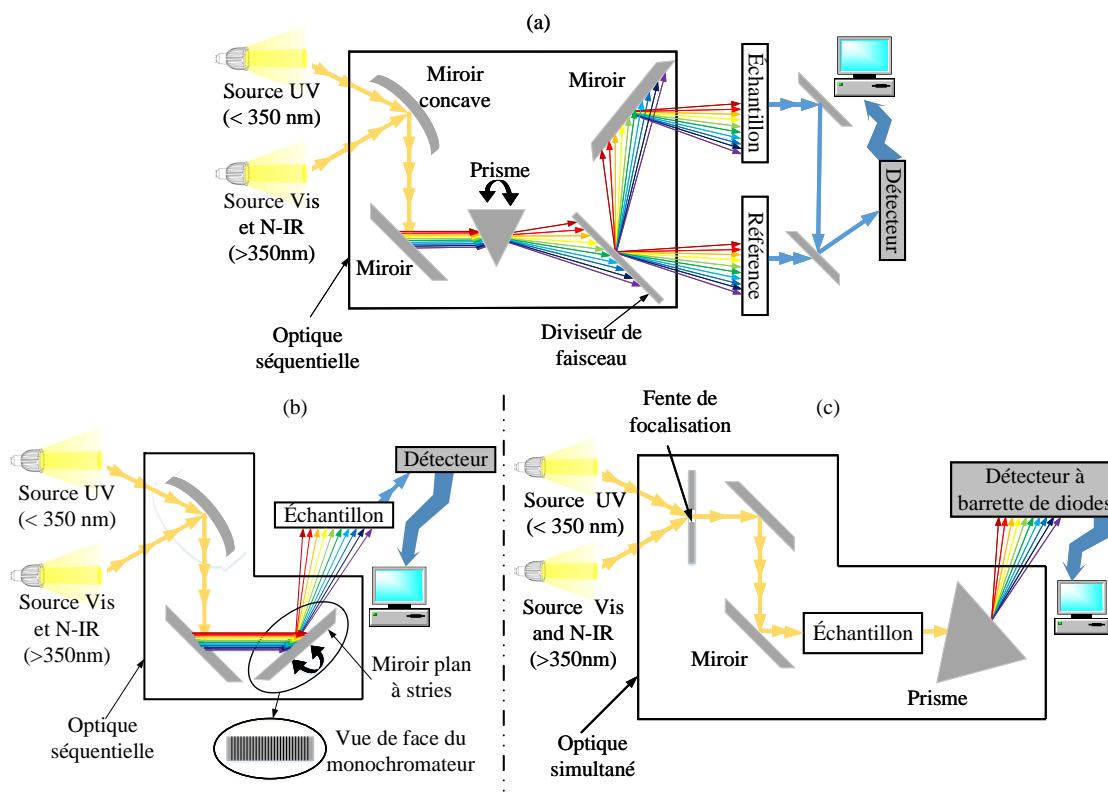


FIGURE 1.6 – Principaux types de spectromètre Uv-Vis. (a) Spectromètre avec système optique séquentiel à doubles faisceaux. (b) Spectromètre avec système optique séquentiel à faisceau unique. (c) Spectromètre à optique simultanée.

des longueurs d'onde supérieures à cette limite, mais d'autres comportements moléculaires seront impliqués [99].

Cette technique de spectroscopie est couramment utilisée dans l'analyse chimique des échantillons biologiques afin d'identifier et de quantifier des molécules en solution. Par exemple, la spectroscopie UV / Vis peut être utilisée pour détecter les ingrédients dans des produits alimentaires commerciaux [107, 108, 109, 110, 111]. Dans ce contexte, *Alves et al.* ont utilisé la spectroscopie UV / Vis avec un algorithme de post-traitement des données pour évaluer la présence de différents composants tels que le polyphénol, le tocophérol, les caroténoïdes et les chlorophylles dans différents échantillons d'huile d'olive [110]. *Martelo-Vidal et al.* ont analysé des échantillons de vin rouge à travers la spectroscopie UV/Vis. Ils ont réussi à identifier différentes espèces polyphénoliques tels que le trans-resvératrol, oenine, malvine, catéchine, épicatechine, quercétine et acide syringique, avec des concentrations respectives de 4.01 mgL^{-1} , 0.42 mgL^{-1} , 560.12 mgL^{-1} , 97.13 mgL^{-1} , 136.66 mgL^{-1} , 876.7 mgL^{-1} et 98.13 mgL^{-1} [107]. La spectroscopie UV / Vis est utilisée également dans d'autres applications comme les analyses pharmaceutiques et le traitement de l'eau. Par exemple, la spectroscopie UV /

Vis peut être utilisée pour le traitement de l'eau afin d'identifier plusieurs espèces telles que l'oxygène biologique, l'oxygène chimique et le carbone organique [112, 101, 99]. Dans le cas des applications pharmaceutiques, cette technique peut être utilisée pour le développement de nouveaux médicaments [111, 101, 99]. L'inconvénient majeur de cette technique réside dans sa sélectivité aux différentes molécules. Dans la nature, plusieurs molécules ont des signatures de transition électronique similaires dans la gamme de longueurs d'onde étudiée, ce qui rend leur identification et leur quantification dans un mélange très difficile comme dans le cas des neurotransmetteurs [113]. Afin de résoudre ce problème de sélectivité, plusieurs chercheurs ont opté à ajouter des nanoparticules fonctionnalisées dans l'échantillon afin de détecter des molécules bien précises. Plusieurs matériaux et techniques de synthèse et de fonctionnalisation de ces nanoparticules ont été développés. Nous citons la molécule de la dopamine en exemple, où des nanoparticules ont été développées par diverses techniques de synthèse pour la quantifier, telles les nanoparticules d'or [35, 114, 115] et d'argent [116, 117]. Le principe de détection de cette approche repose sur le fait que lorsqu'une nanoparticule est en présence de la molécule cible, sa signature spectrale change légèrement, ce qui permet de quantifier indirectement la molécule d'intérêt par le biais des nanoparticules si elles sont ajoutées à la solution en proportion égale ou supérieure. Grâce à l'ajout de nanoparticules, plusieurs molécules ont pu être identifiées et quantifiées à de très faibles concentrations. Une autre approche pour résoudre le problème de sélectivité, c'est l'utilisation de la spectroscopie UV / Vis comme capteurs pour des techniques de séparation telle que la chromatographie [47]. Dans ce cas, les espèces dans les échantillons sont détectées séparément [47]. Par exemple, *Yang et al.* ont utilisé la chromatographie avec un métal organique cationique (Cd-MOF) comme phase stationnaire pour séparer les colorants des eaux usées [47]. Ensuite, des molécules de colorant, y compris des colorants anioniques (CR, MO et AF), des colorants cationiques (Rho B, Rho 6G et MB) et des colorants neutres (SY 2), ont été détectées en utilisant cette technique avec une concentration de $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ [47].

1.3.2 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Principe de vibration moléculaire

Dans la nature, chaque molécule est constituée d'au moins deux atomes liés. Si on considère ce lien comme un ressort qui peut, suite à une excitation, vibrer à une fréquence qui dépend des masses des atomes, de l'amplitude de l'excitation et de la force de cette liaison [118]. Des approximations simples de l'énergie potentielle E_V et de la fréquence de vibration ν d'une molécule composée de deux atomes A et B de masses respectives m_A et m_B , sont données par :

$$\begin{aligned}
 E_V &= \left(V + \frac{1}{2}\right)hc\tilde{\nu} \\
 \nu &= \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}}
 \end{aligned}
 \tag{1.3}$$

où V et le nombre quantique vibrationnel ($=0,1,2,\dots$) qui décrit le mode de la vibration de l'oscillateur et l'état énergétique de la molécule, c est la vitesse de la lumière [$3.10^{10} \text{ cm.s}^{-1}$], k est la constante de raideur du ressort qui caractérise la force de la liaison chimique [$N.cm^{-1}$] et μ est la masse réduite $\mu = \frac{m_A.m_B}{m_A+m_B}$ de l'oscillateur [*gramme*]. L'équation (1.3) ne tient pas en compte de l'aspect quantique de la liaison [118, 119], mais elle considère seulement les vibrations harmoniques qui permettent d'associer un modèle vibratoire simple à cette liaison. Au niveau moléculaire, la génération d'une vibration fait intervenir un changement des états d'énergie vibrationnelle de la molécule. Comme pour l'énergie électronique, les états d'énergie vibrationnelle prennent des valeurs discrètes [118, 119]. En réalité, les liaisons moléculaires sont modélisées par un oscillateur anharmonique avec une énergie potentielle E_V exprimée par :

$$E_V = (V + \frac{1}{2})hc\tilde{\nu} - (V + \frac{1}{2})^2hc\tilde{\nu}x_e \quad (1.4)$$

où x_e est la constante d'inharmonicité (sans dimension) qui prend généralement des valeurs comprises entre 0,001 et 0,02, selon le mode vibrationnel [118]. Si les modes vibrationnels sont strictement harmoniques, les transitions s'effectuent seulement entre un état d'énergie et celui qui le précède ou celui qui le succède directement. L'ajout de la partie anharmonique ($(V + \frac{1}{2})^2hc\tilde{\nu}x_e$) nous permet donc de passer d'un niveau énergétique à un autre non voisins [118].

L'énergie nécessaire ΔE pour effectuer une transition entre deux états voisins, est exprimée par :

$$\begin{aligned} \Delta E &= E_{(V+1)} - E_V \\ &= hc\tilde{\nu}(1 - 2x_e(V + 1)) \end{aligned} \quad (1.5)$$

Puisque ces états d'énergie sont plus proches, l'énergie nécessaire pour effectuer une transition entre ces états, correspond typiquement aux longueurs d'onde du domaine de l'IR proche ou moyen du spectre électromagnétique [118, 119]. Par conséquent, lorsqu'une molécule est exposée à un rayonnement IR de nombre d'onde spécifique, ses atomes commencent à vibrer. Une molécule non linéaire, possédant N atomes, a $3N$ degrés de liberté dont six consistent en trois translations et trois rotations dans son repère spatial absolu. Les $3N - 6$ autres degrés représentent le nombre de modes vibrationnels possibles ($V=0,1,\dots,3N - 6$) [118]. Pour une molécule linéaire, la rotation autour l'axe de la liaison n'est pas considéré comme un degré de liberté puisque cette rotation n'implique aucun déplacement d'aucun atome. Par conséquent, une molécule linéaire a un mode vibrationnel ($3N-5$ modes) de plus qu'une molécule non linéaire ($3N - 6$ modes) [118].

Une molécule peut avoir deux types de vibrations, une vibration d'étirement des liaisons ("Stretching") ou une vibration de déformation. Par exemple, une molécule diatomique n'aura que des vibrations d'étirement [118, 120]. Les formes de la vibration de déformation, les plus

connues, sont : déformation angulaire ("Bending"), balancement ("Rocking"), remuer ("Wagging") et torsion ("Twisting") [118, 120].

La vibration d'étirement/contraction ("Stretching") ν est le mode vibrationnel le plus simple. Ce mode consiste en un changement de longueur de la liaison dans chaque groupe diatomique de la molécule. La vibration suit donc l'axe de la liaison. Ce type est souvent désigné par ν suivi du groupe atomique vibrant. Pour les molécules avec des groupes cycliques, l'étirement est symétrique et il est appelé étirement en anneau ("ring stretching") [118]. La figure 1.7.a illustre la vibration de type étirement/contraction [121].

La vibration en déformation angulaire ("Bending") ν est une vibration plane, où chaque groupe triatomique reste dans le même plan durant la vibration. Elle consiste en un changement de l'angle d'interliaison avec un déplacement atomique perpendiculaire à l'axe de chaque liaison. Par conséquent, le déplacement des deux atomes implique une flexion des liaisons de ce groupe. Cette vibration est désignée souvent par δ . Dans le cas des groupes cycliques, cette vibration est nommée déformation en anneau "ring deformation" [118]. La figure 1.7.b illustre le mode vibratoire de type déformation angulaire.

Le balancement "Rocking" ν est aussi une déformation angulaire, mais qui implique plus que trois atomes (Figure 1.7.c). Dans ce cas de figure, le déplacement angulaire d'un groupe triatomique (rotation) s'effectue par rapport au reste des groupes de la molécule. Par conséquent, le centre de rotation coïncide avec un autre atome en dehors de ce groupe triatomique et l'angle d'interliaison dans le groupe qui vibre reste constante. Cette vibration est désignée souvent par r ou ρ suivi par le groupe triatomique qui vibre par rapport aux autres groupes. Par exemple, le balancement du groupe CH_2 est désigné par rCH_3 . Cette vibration est aussi considérée comme plane puisque le groupe triatomique qui vibre est toujours dans le même plan [118].

La vibration à remuer "Wagging" consiste en une variation de l'angle entre l'axe d'une liaison et le plan contenant le groupe triatomique à son état statique (Figure 1.7.c). Cette vibration est définie aussi comme un pliage du plan statique (dite aussi plan fondamental) d'un groupe triatomique. Elle est désignée par Ω suivi par le groupe en question. Cette déformation est considérée hors plan puisque ce groupe triatomique change du plan en vibrant [118].

La vibration à torsion "Twisting" est aussi une déformation hors plan qui implique un changement de l'angle dièdre dans une molécule sans changer l'angle d'interliaison (Figure 1.7.c). Ce mode de vibration ressemble à la vibration à remuer "Wagging", mais les atomes se déplacent dans des directions opposées [118].

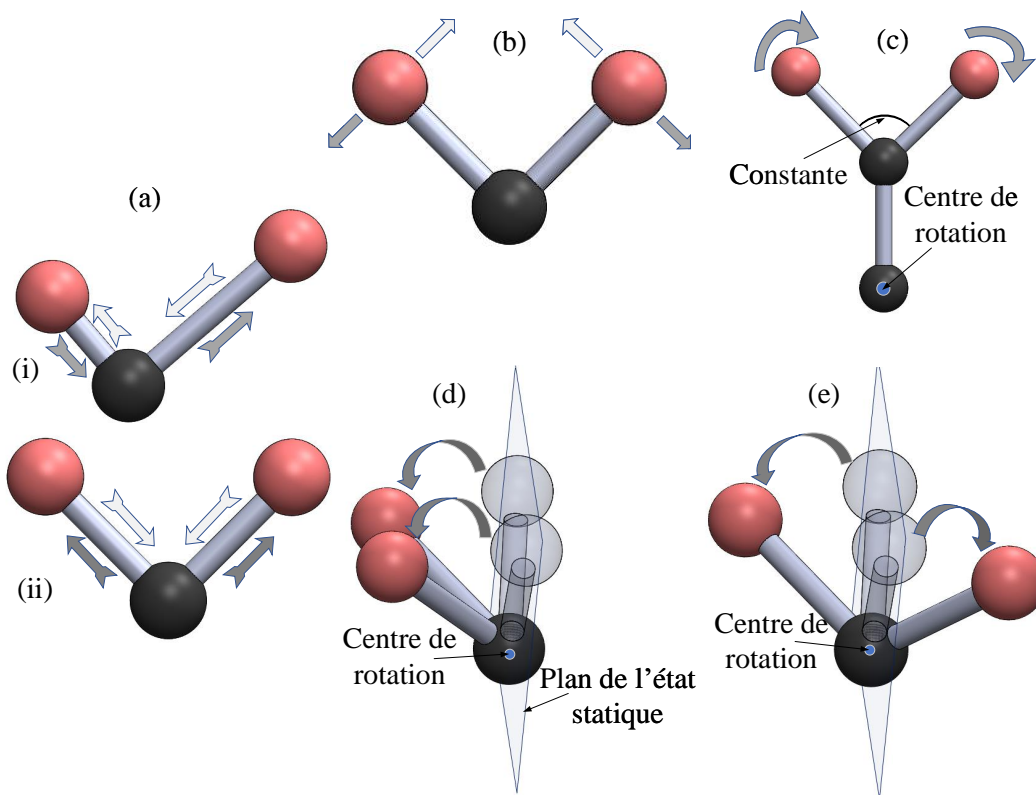


FIGURE 1.7 – Principaux types de modes vibratoires. (a) vibration d'étirement "Stretching"; (i) Étirement symétrique, (ii) étirement non symétrique. (b) Déformation angulaire "Bending". (c) Balancement "Rocking". (d) Illustration 3D de la vibration à remuer "Wagging". (e) Illustration 3D de la torsion "Twisting".

Chaque molécule possède plusieurs fréquences de vibration propres et pour chaque fréquence, un mode vibratoire est assigné. L'ensemble de ces fréquences constitue généralement une configuration unique. On trouve souvent des molécules qui ont des fréquences similaires vu qu'elles possèdent quelques groupes atomiques identiques, mais ces molécules sont distingués par au moins un groupe diatomique. Par conséquent, la connaissance de la configuration des fréquences propres d'une molécule permet d'identifier cette molécule dans un échantillon suite à l'analyse de son spectre d'absorption IR (ou de transmittance) [118, 119].

Instrumentation

Une pratique courante consiste à exciter l'échantillon à analyser par une source de lumière à large bande IR et à mesurer le rayonnement transmis (ou réfléchi). L'énergie associée à l'infrarouge ($E = h\nu$) n'est pas assez importante pour exciter les électrons, mais peut induire une excitation vibrationnelle des atomes et des groupes liés. Le rayonnement transmis (ou réfléchi) est atténué à cause de l'absorption de l'énergie par la molécule. En fonction de la quantité d'énergie absorbée et du nombre d'onde du rayonnement $\tilde{\nu}$, les atomes vibrent dans

un mode spécifique. Les informations brutes générées par le détecteur sont sous forme d'interférogramme, et ce dernier est converti en un spectre d'absorption par l'application de la transformation de Fourier, d'où le nom de cette technique de spectroscopie [118, 119, 122].

Concrètement, un spectromètre IR à transformée de Fourier (FTIR) comprend quatre modules : (1) une source de rayonnement, (2) un détecteur, (3) un interféromètre et (4) un système de manipulation de l'échantillon (SMÉ) [123]. La source de rayonnement dépend de la plage de longueurs d'onde IR d'intérêt et de la capacité de l'échantillon à atténuer l'énergie du faisceau transmis (ou réfléchi) au détecteur [124]. Généralement, la source consiste en un corps noir chauffé à une très haute température afin de générer des rayonnements par incandescence [123]. Une lampe à filament de tungstène ou à quartz-tungstène-halogène peut être utilisée pour l'IR proche (NIR) à cause de la transparence du verre et du quartz à ces rayonnements [124]. Ce type de source est généralement peu coûteux et avec une longue durée de vie [124]. Comme cette source nécessite une très haute température (>3000 K).

Pour l'IR moyen, plusieurs options existent. Puisque le verre est opaque à ce type de rayonnements, les simples ampoules ne peuvent pas être utilisées. Par conséquent, la source doit être en contact avec l'atmosphère de l'instrument, ce qui limite l'utilisation des hautes températures. La source d'IR moyen la plus utilisée dans les spectromètres FTIR consiste en une tige de carbure de silicium chauffée par résistance, connue sous le nom de Global [124]. La température de fonctionnement du Global est de ≈ 3000 K. D'autres sources qui ont une plus faible température de fonctionnement que celle du Global mais avec une faible émission énergétique existaient telles que le filament en nichrome ou en Kanthal [124]. Finalement, les lampes au mercure à haute pression sont les sources typiques à utiliser pour l'IR lointain [124, 125]. Le détecteur peut être de type thermique ou quantique [124, 126]. Les détecteurs thermiques mesurent le changement de température d'un matériau qui est exposé au rayonnement transmis (ou réfléchi) par l'échantillon, à l'aide d'un thermocouple, par exemple [124]. La principale limitation de ce type de détecteur est son temps de réponse qui peut être dans l'ordre de quelques millisecondes [124]. Les détecteurs quantiques, généralement non linéaires, sont utilisés lorsque le signal transmis par l'échantillon est très faible [124, 126]. La détection se base sur la quantification de l'interaction entre les radiations transmises et les électrons dans un solide. L'exposition de ce solide aux radiations cause l'excitation de ses électrons à un état d'énergie plus élevé. Les phototubes, les photomultiplicateurs et les semiconducteurs sont les détecteurs quantiques les plus utilisés [124, 126]. L'interféromètre existe sous plusieurs formes telles que l'interféromètre de *Michelson*, l'interféromètre à réseau lamellaire et l'interféromètre de Fabry-Perot [127, 128]. Actuellement, la plupart des spectromètres infrarouges utilisent l'interféromètre de *Michelson*. Il est constitué d'un miroir fixe, d'un miroir mobile et d'un diviseur de faisceau, comme illustrer dans la Figure 1.8 [126, 128]. En effet, ce type d'interféromètre divise le faisceau de rayonnement émis de la source en deux (les deux faisceaux sont identiques dans le cas typique) par l'intermédiaire du diviseur de faisceau. Ces deux

faisceaux sont recombinaés après avoir été réfléchis par les miroirs et après qu’une variation du trajet optique a été introduite par le déplacement du miroir mobile [127, 128]. Par exemple, si on considère une source émettant un faisceau monochromatique de longueur d’onde λ_0 et d’amplitude $I_0(\lambda_0)$. Les deux faisceaux générés par le diviseur et réfléchis par les miroirs se combinent en traversant le diviseur et génèrent deux autres faisceaux dont un se propage vers la source et l’autre vers le détecteur (ou l’échantillon). Le premier faisceau est le résultat d’une interférence des deux faisceaux, dont l’un prévenant du miroir fixe avec un déphasage nul et l’autre du miroir mobile avec un déphasage de $180 + \delta$, avec δ est la distance parcourue par le miroir mobile. Si $\delta = 0$, ces deux faisceaux sont déphasés. Dans ce cas, aucun signal n’est retransmis à la source et l’interférence est dite destructive. De même pour le faisceau transmis au détecteur, il est le résultat de la combinaison de deux faisceaux, dont l’un avec un déphasage de 270 et l’autre de $270 + \delta$. Lorsque $\delta = 0$, l’interférence est appelée constructive et toute la puissance du rayonnement émis par la source est transmise au détecteur. Dans plusieurs cas, le faisceau transmis à la source n’est pas analysé puisqu’il contient les mêmes informations que celui transmis au détecteur. Pour un rayonnement monochromatique, l’intensité du faisceau transmis au détecteur est exprimée en fonction du déplacement du miroir mobile et de son nombre d’onde $\tilde{\nu}_0$, par [128] :

$$I(\delta) = 0.5I_0(\tilde{\nu}_0)(1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}_0\delta)) \quad (1.6)$$

Seulement la partie variable ($I(\delta) = 0.5I_0(\tilde{\nu}_0) \cos(2\pi\tilde{\nu}_0\delta)$) de l’intensité du faisceau est considérée pour la suite. Pour un rayonnement continu, le signal transmis au détecteur (interférogramme $S(\delta)$) est exprimé par :

$$S(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi\tilde{\nu}\delta) d\tilde{\nu} \quad (1.7)$$

où $B(\tilde{\nu})$ est l’amplitude de l’interférogramme qui caractérise aussi l’efficacité du diviseur de faisceau et la sensibilité du détecteur en fonction du nombre d’onde. Lorsque δ est nul, l’intensité du signal émis par l’interféromètre est maximale. Ce point dans l’interférogramme est appelé ”center-burst” ou ”zero-path-difference”. En augmentant δ , le signal s’atténue progressivement à cause des interférences destructives qui se produisent. L’interférogramme est dit de l’échantillon, si ce dernier est placé entre l’interféromètre et le détecteur. En absence de l’échantillon, l’interférogramme est dit de la source. Finalement, l’interférogramme est converti par l’application de la Transformée de Fourier (d’où l’appellation de la technique de spectroscopie FTIR) en un spectre IR de l’échantillon ou de la source. Ce spectre contient l’intensité transmise en fonction de la fréquence (ou nombre d’onde) [127, 128].

Le système de manipulation de l’échantillon (SMÉ) existe sous plusieurs formes, selon des facteurs tels que le type des échantillons (liquide, gaz, solide ou poudre), l’intensité d’atténuation du rayonnement, la quantité d’échantillons disponible et le type des informations recherchées. La Figure 1.9 illustre différentes architectures possibles du SMÉ.

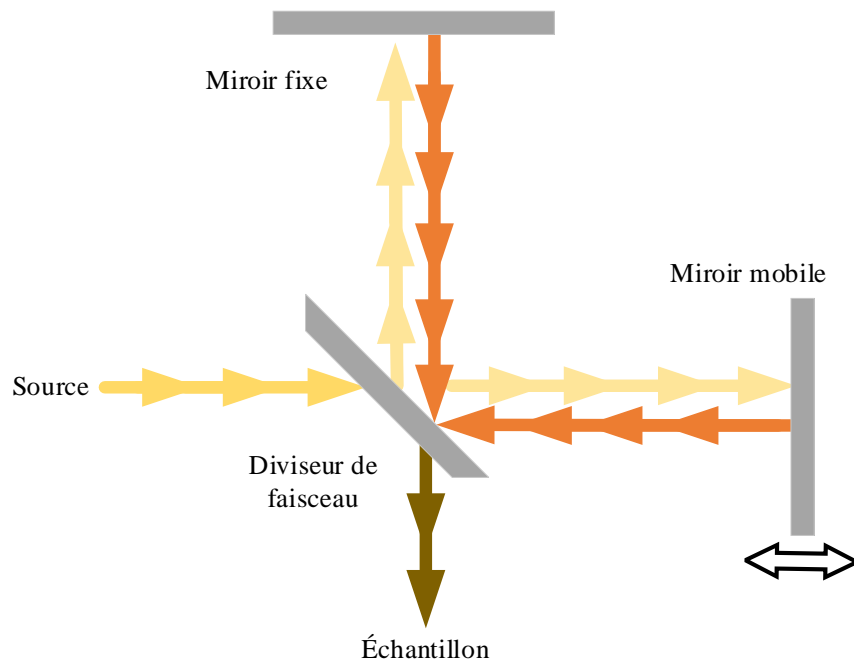


FIGURE 1.8 – Architecture d'un interféromètre de *Michelson*.

Le SMÉ en transmission assure une manière simple pour obtenir le spectre IR de l'échantillon [129]. Il est utilisé lorsque l'échantillon n'absorbe pas la totalité du rayonnement incident. Il a des applications diverses comme l'analyse des protéines en solution [130], l'analyse des échantillons de gaz [131, 10] et l'analyse biomédicale pour la diagnostique de quelques maladies (hépatite C, diabète et l'hypercholestérolémie) [132, 133]. Par exemple, plusieurs protéines peuvent être détectées dans des solutions synthétiques, y compris le phosphate de sodium monobasique dihydraté, le phosphate de sodium dibasique dihydraté, l'hydroxyde de sodium β -Lactoglobuline, l'hémoglobine, le lysozyme, la α -chymotrypsine et lyophilisé [130]. En outre, cette technique permet d'étudier des échantillons déposés sur des substrats transparents au rayonnement infrarouge ou dans des cellules d'encapsulation pour les échantillons gazeuses. La qualité du spectre obtenu, est toujours conditionnée par l'environnement expérimental tel que le trajet optique, la nature du support, la concentration de la solution ainsi que l'intensité d'absorption du solvant, dans le cas d'un échantillon liquide [134]. Les plaques faites à partir du NaCl sont souvent utilisées pour effectuer des analyses en transmission en raison de leur transparence au rayonnement IR, en particulier l'IR lointain [10, 135].

Un autre type de SMÉ est celui en réflexion, qu'on utilise lorsque l'échantillon est moins absorbant sur une faible distance d'interaction qui sépare les radiations et les molécules de

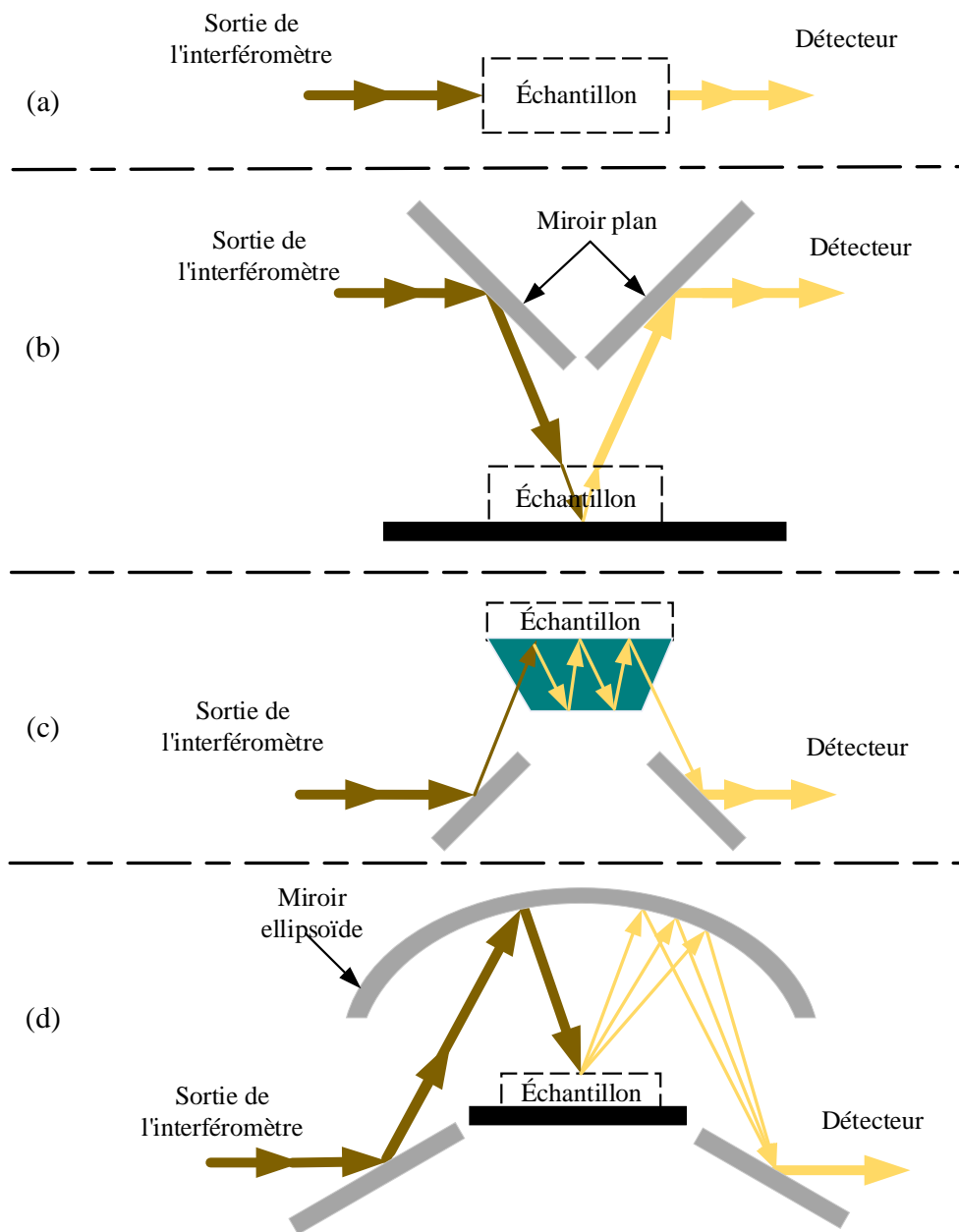


FIGURE 1.9 – Différents types de SMÉ pour un spectromètre IR. a. SMÉ en transmission. b. SMÉ en réflexion spéculaire. c. SMÉ en réflexion totale atténuée. d. SMÉ en réflexion diffuse.

l'échantillon [136]. La technique de spectroscopie est appelée dans ce cas, spectroscopie à réflexion spéculaire. Un support de réflexion externe doit être utilisé lorsque l'échantillon est faiblement réfléchissant (un support réfléchissant et non absorbant) [137]. Dans ce cas de figure, l'épaisseur de l'échantillon doit être minimale et le support ne doit pas interagir avec les radiations IR [136]. Ce support sert donc à maintenir l'échantillon et à réfléchir les faisceaux

lumineux vers le détecteur [9, 137]. Trois cas de réflexion spéculaire existent ; la réflexion de *Fresnel*, la réflexion-absorption infrarouge et la transfexion.

Quand la surface de réflexion est un matériau en poudre ou avec des surfaces non régulières, le spectre de réflexion est régi par les équations de *Fresnel* (D'où l'appellation : réflexion de *Fresnel*). Dans ce cas, la réflexion se produit à n'importe quelle interface où l'indice de réfraction change. Les équations de *Fresnel* servent donc à déterminer le facteur de réflexion [136]. Ce facteur est le rapport entre le flux lumineux réfléchi et le flux lumineux incident. Il a deux composantes par rapport au plan d'incidence qui contient à la fois les faisceaux incidents et les faisceaux réfléchis [136]. R_p et R_s représentent, respectivement, la composante parallèle et normale à ce plan et sont exprimés par :

$$\begin{aligned} R_p &= \frac{\tan^2(\theta - \theta')}{\tan^2(\theta + \theta')} \\ R_s &= \frac{\sin^2(\theta - \theta')}{\sin^2(\theta + \theta')} \end{aligned} \quad (1.8)$$

avec θ et θ' sont respectivement l'angle d'incidence et l'angle de réfraction dans le matériau. Si on considère le cas idéal dans lequel l'environnement où les radiations se propagent est parfait (indice de réfraction $n_1 \sim 1$ et indice d'absorption $k_1 \sim 0$) et pour une incidence normale à la surface ($\theta \neq 0$) [136], deux situations se présentent, (1) lorsque le matériau est absorbant (indice d'absorption $k_2 \neq 0$) et (2) lorsqu'il n'est pas absorbant (indice d'absorption $k_2 = 0$) [136]. Dans le premier cas, le facteur de réflexion est exprimé en fonction de son indice de réfraction n_2 et son indice d'absorption k_2 , par :

$$R_p = R_s = \frac{(n_2 - 1)^2 + k_2^2}{(n_2^2 + 1) + k_2^2} \quad (1.9)$$

Puisque k_2 dépend de la longueur d'onde incidente et de la composition du matériau, le facteur de réflexion dépend aussi de ces paramètres. Si $k_2^2 \gg (n_2 - 1)^2$ et $\gg (n_2 + 1)^2$, le facteur de réflexion s'approche de 1 et en conséquence une grande partie de la radiation incidente est réfléchi [136]. Si $k_2^2 \ll (n_2 - 1)^2$, le facteur de réflexion est très faible et donc les radiations sont considérablement atténuées [136]. Dans le deuxième cas où $k_2 = 0$, le facteur de réflexion est exprimé par :

$$R_p = R_s = \frac{(n_2 - 1)^2}{(n_2 + 1)^2} \quad (1.10)$$

Dans ce cas, on peut dire que le facteur de réflexion augmente proportionnellement en fonction de l'indice de réfraction [136].

La deuxième forme de la réflexion spéculaire est la réflexion-absorption qui consiste en une réflexion des radiations sur une surface plane (généralement solide) [136]. Dans ce cas l'onde réfractée se propage dans une fine couche d'épaisseur très inférieure à la longueur d'onde incidente λ [136].

Si l'épaisseur de la couche de pénétration est de même ordre que la longueur d'onde incidente, on parle de la transflexion. Cependant, le spectre de réflexion est assez similaire au spectre de transmission du matériau [136]. Le faisceau traverse cette couche deux fois, en conséquence l'absorption mesurée par la spectroscopie IR en transflexion est environ deux fois plus haute que celle mesurée par la spectroscopie IR en transmission [136].

L'instrument le plus connu qui peut utiliser le SMÉ en réflexion est le Microscope-FTIR, où la technique de détection est appelée micro-spectroscopie FTIR [137]. En plus de l'identification moléculaire, il permet d'étudier la qualité de la surface et la distribution moléculaire dans l'échantillon, ce qui favorise son utilisation dans des laboratoires de recherches. Plusieurs supports de maintien, de manipulation et d'encapsulation de l'échantillon ont été développés pour ce SMÉ dans les applications récentes, afin d'élargir son application à des domaines comme la manipulation des cellules biologiques vivantes sous un environnement contrôlé [137, 138, 139]. Le SMÉ en réflexion a été largement utilisé aussi dans le diagnostic du cancer [140, 141, 142], l'étude de diverses cellules biologiques [143, 134], les études environnementales [144], ainsi que l'étude des biofilms [145].

Il y a aussi le SMÉ en réflexion totale atténuée (Attenuated Total Reflectance "ATR"). Ce SMÉ est mis en œuvre en plaçant l'échantillon en contact avec un support transparent à fort indice de réfraction pour les radiations IR d'intérêt. Cette technique est généralement utilisée lorsque l'échantillon est très absorbant. En effet, lorsqu'un rayon lumineux se propage dans ce support d'indice de réfraction n_1 supérieur à l'indice n_2 de l'échantillon à analyser, l'angle auquel le rayonnement est réfracté est décrit par la loi de *Snell* :

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (1.11)$$

dans laquelle θ_1 et θ_2 sont respectivement l'angle d'incidence et de réfraction par rapport à la normale de l'interface qui sépare les deux milieux [146]. Une haute réflexion au niveau de l'interface a lieu lorsque l'angle d'incidence est supérieur à un angle critique définie par :

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right) \quad (1.12)$$

Par conséquent, afin de pouvoir étudier divers échantillons, θ_C doit être le plus faible possible, donc un indice de réfraction n_1 plus grand. Plusieurs matériaux sont disponibles pour ce support (généralement appelé cristal ou prisme) tel que le diamant ($n_1=2.41$ et $\theta_C=40^\circ$ pour $n_2=1.5$), le sélénium de zinc (ZnSe, $n_1=2.4$ et $\theta_C=40^\circ$ pour $n_2=1.5$), le germanium (Ge, $n_1=4$ et $\theta_C=22^\circ$ pour $n_2=1.5$) ou le silicium (Si, $n_1=3.41$ et $\theta_C=26^\circ$ pour $n_2=1.5$) [146, 147]. Cependant, la réflexion des ondes émises n'est pas totale, une onde évanescence est réfractée en pénétrant l'échantillon sur une distance de quelques micromètres, appelée profondeur de pénétration d_p entre $12 \mu m$ et $150 nm$), qui dépend de la longueur d'onde réfractée, de l'angle d'incidence et des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon analysé [146, 148]. Cette

distance est définie par :

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{\sin^2\theta - (n_2/n_1)^2}} \quad (1.13)$$

Nous constatons que, la profondeur de pénétration varie en fonction de la longueur d'onde, λ . Cette variation causera une variation de l'absorption de l'échantillon en fonction de d_p à cause que plus le faisceau pénètre, plus il interagit avec des molécules et en conséquence il s'atténue plus [146]. Le cristal joue donc le rôle de guide des radiations incidentes et permet à l'onde réfractée d'interagir, le long de la profondeur de pénétration, avec les molécules contenues dans l'échantillon. Les faisceaux réfléchis sont transmis par la suite au détecteur et l'interférogramme généré est traité pour obtenir le spectre d'absorption de l'échantillon [146]. Finalement, lors de la génération du spectre, l'impact de la variation de D_p doit être considéré [146]. Ce SMÉ est utilisé souvent pour les échantillons en solution liquide où l'absorption du solvant est souvent importante. En effet, l'onde évanescente, lorsqu'elle est réfractée, pénètre l'échantillon de quelques micromètres. À cause de la faible profondeur de pénétration, l'onde réfléchie à l'interface est atténuée légèrement. Par conséquent, le signal récupéré par le détecteur est suffisant pour extraire le spectre de l'échantillon [146]. Le SMÉ en réflexion totale atténuée est utilisé par exemple, pour étudier des échantillons à l'état solide comme les fibres végétales [149], les polymères [150], les échantillons de cheveux humains [151] et certains matériaux composites [152, 153, 154].

Autres que sa force d'analyser des échantillons à haute absorption, l'ATR nécessite une quantité minimale d'échantillons et ne nécessite que très peu de préparation. Il permet aussi d'analyser divers états d'échantillons incluant les liquides et les solides sans aucun changement nécessaire de leurs états ou structures.

Le dernier SMÉ est celui qui utilise le principe de la réflexion diffuse [155, 156]. Le spectre de réflexion diffuse est généré par combinaison de plusieurs phénomènes, dont la réflexion, la réfraction et la diffraction. Ce SMÉ est généralement utilisé pour analyser des échantillons en poudre [155, 156]. Étant donné que les spectres de réflexion diffuse résultent d'un processus d'absorption, ils ont l'apparence de spectres de transmission et peuvent fournir les mêmes informations fournies par un spectre d'absorption [155, 156]. Cette technique ressemble, en grande partie, à la réflexion de *Fresnel*. La différence majeure est l'implication d'autres phénomènes optiques comme la réfraction et la diffraction [155].

Traitement des Données et des Spectres

Le spectre de transmission d'un échantillon est défini par le pourcentage de la transmission T qui représente le rapport entre l'intensité du signal mesurée avec et sans l'échantillon :

$$T(\tilde{\nu}) = 100 \frac{I(\tilde{\nu})}{I_0(\tilde{\nu})} \quad (1.14)$$

avec I_0 est l'intensité totale émise par la source, en tenant compte des imperfections de l'optique de l'appareillage et de l'environnement d'analyse et I est celle transmise par l'échantillon, en fonction du nombre d'onde $\tilde{\nu}$ [119]. Dans la pratique, la génération du spectre de transmission est précédée par la génération des deux spectres $I_0(\tilde{\nu})$ et $I(\tilde{\nu})$ à partir des interférogrammes de la source et de l'échantillon [157]. Chacun de ces deux spectres est défini comme une "single beam spectrum". Le spectre de la source est appelé précisément le "background", et il contient toutes les informations sur les imperfections physiques de l'instrument et de l'environnement [119]. En effet, l'extraction de ces deux spectres, $I_0(\tilde{\nu})$ et $I(\tilde{\nu})$, nécessite le transfert des interférogrammes du domaine spatial au domaine fréquentiel [119, 157]. Ce transfert s'effectue par l'application du transformée de Fourier (TF) aux interférogrammes $S_0(\delta)$ et $S(\delta)$:

$$\begin{aligned} I_0(\tilde{\nu}) &= \int_{-\infty}^{+\infty} S_0(\delta) e^{i2\pi\tilde{\nu}\delta} d\delta \\ I(\tilde{\nu}) &= \int_{-\infty}^{+\infty} S(\delta) e^{i2\pi\tilde{\nu}\delta} d\delta \end{aligned} \quad (1.15)$$

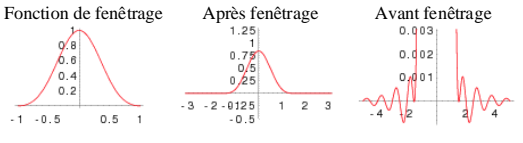
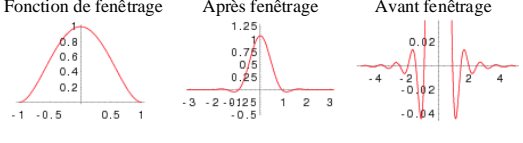
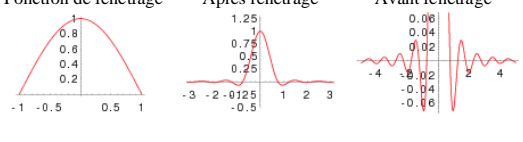
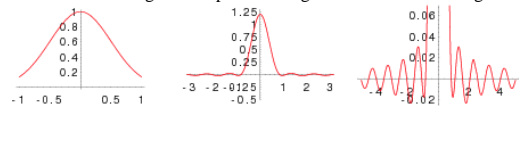
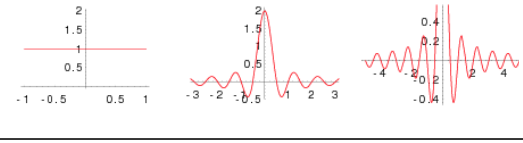
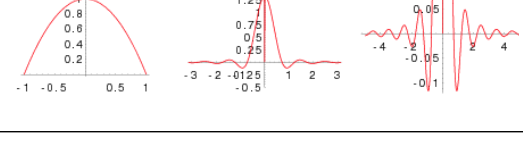
Les bornes des intégrales sont des valeurs infinies alors que le déplacement, δ , du miroir est fini. Donc, nous devons, en premier temps, changer ces bornes pour les vraies limites de déplacement du miroir (L et $-L$) [128]. Ce changement de bornes se traduit physiquement par une troncature de l'interférogramme qui génère de faux lobes secondaires ("false sidelobes") en s'éloignant du "centre-burst". Pour éliminer ces lobes, un filtre de fenêtrage ("Apodization") doit être utilisé [157]. Ce dernier consiste à multiplier l'interférogramme par une fonction $W(x)$ et à appliquer la transformée de Fourier sur le produit. Par conséquent, le spectre est défini par :

$$\begin{aligned} I_0(\tilde{\nu}) &= \int_{-\infty}^{+\infty} W(\delta) S_0(\delta) e^{i2\pi\tilde{\nu}\delta} d\delta \\ I(\tilde{\nu}) &= \int_{-\infty}^{+\infty} W(\delta) S(\delta) e^{i2\pi\tilde{\nu}\delta} d\delta \end{aligned} \quad (1.16)$$

Plusieurs fonctions de troncature existent. Le tableau 1.3 montre quelques exemples bien connus ainsi que leurs expressions [157].

TABLE 1.3 – Exemples de fonctions de fenêtrages.

Type	Fonction $W(x)$	Graphe
Bartlett	$1 - \frac{ x }{L}$	

Blackman	$\frac{21}{50} + \frac{1}{2} \cos\left(\frac{\pi x}{L}\right) + \frac{2}{25} \cos\left(\frac{2\pi x}{L}\right)$	
Connes	$\left(1 - \frac{x^2}{L^2}\right)^2$	
Cosine	$\cos\left(\frac{\pi}{2L}\right)$	
Gaussian	$e^{-\frac{x^2}{2L^2}}$	
Uniform	1	
Welch	$1 - \frac{x^2}{L^2}$	

La majorité des spectromètres FTIR utilise le TF rapide développé par *Cooley* et *Tukey*. Ce type de TF permet de réduire le temps de traitement nécessaire [158, 157]. Dans ce cas, les spectres sont extraits à des nombres d'onde discrets. D'autres traitements de filtrage et de raffinement sont effectués sur l'interférogramme afin d'éliminer des sources de bruit et d'erreur possible, telles que le bruit induit par les amplificateurs de signal relié au détecteur, l'efficacité des modules optiques et leurs désalignements ainsi que la divergence du rayonnement et son déphasage [128]. Lorsque les spectres de la source et de l'échantillon sont extraits, le spectre de transmission de l'échantillon est calculé en faisant le rapport entre ses deux spectres. Le spectre d'absorption $A(\tilde{\nu})$ est un dérivé du spectre de transmission. Il représente la quantité d'énergie absorbée par l'échantillon et il est défini par :

$$\begin{aligned}
 A(\tilde{\nu}) &= -\log_{10}(T(\tilde{\nu})) \\
 &= -\log_{10}\left(\frac{I(\tilde{\nu})}{I_0(\tilde{\nu})}\right)
 \end{aligned}
 \tag{1.17}$$

L'absorption est mesurée en unités d'absorption (AU), qui est liée directement à la transmittance. Par exemple, 1.0 Au est égal à 10 % de transmittance, 2.0 Au est égal à 1 % de transmittance et ainsi de suite dans une tendance logarithmique [119]. Lorsque les spectres de transmission ou d'absorption sont obtenus, des traitements peuvent être effectués sur ces spectres afin d'optimiser l'information extraite avec un maximum de précision. La déconvolution est l'un de ces traitements qui consiste à séparer un signal exprimé par une fonction $F(\tilde{\nu})$ en deux signaux d'expressions respectives $G(\tilde{\nu})$ et $H(\tilde{\nu})$. Ce traitement sert à extraire les pics chevauchés en les séparant en plusieurs pics indépendants [119, 159]. La déconvolution permet aussi de rendre les pics plus étroits, ce qui simplifie le processus de quantification par la suite. La Figure 1.10 montre un spectre contenant deux pics chevauchés et leur déconvolution qui produit deux spectres à un seul pic chaque. Donc, il suffit d'exprimer la transmission, $T(\tilde{\nu})$,

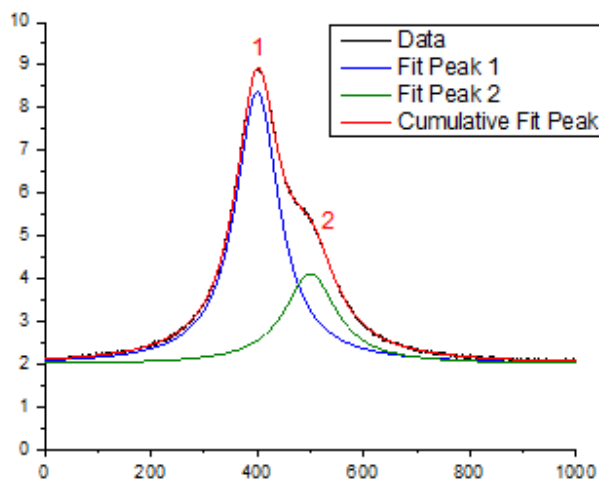


FIGURE 1.10 – Déconvolution de deux pics chevauchés.

sous forme d'un multiple de plusieurs fonctions dont chacune représente un pic bien déterminé [119, 159].

D'autres traitements peuvent être effectués tels que l'interpolation des données. Puisque le détecteur génère un signal électrique analogique, la transition à une version numérique de l'interférogramme implique un échantillonnage. Par conséquent, les spectres sont générés à partir de valeurs discrètes. Donc une interpolation est nécessaire pour avoir un spectre continu. Nous pouvons aussi effectuer un lissage des spectres qui consiste à enlever le maximum de bruit des spectres. Ce traitement est effectué à l'aide des fonctions de convolution telles que les fonctions boxcar, Lorentzian et Gaussian [119, 159]. Le traitement se termine par l'extraction des pics à partir des spectres. Ces pics peuvent être extraits manuellement ou en calculant le dérivé du spectre.

Les pics détectés dans un spectre d'absorption peut servir à déterminer la composition de l'échantillon. L'identification moléculaire s'effectue à travers une comparaison entre les pics détectés et ceux d'une base de données contenant des pics de référence associés à des espèces connues [119, 160]. La quantification des espèces identifiées est gouvernée par la loi de *Beer* et *Lambert* présentée par l'équation (1.2). La relation entre l'absorption et la concentration est donc linéaire. Cependant, certaines contraintes doivent être respectées pour garder cette linéarité, telles que l'absorption de l'échantillon qui ne doit pas dépasser 2AU [119, 160, 159]. Pour un échantillon contenant N espèces différentes, l'absorption à un nombre d'onde donné est exprimée par :

$$A(\tilde{\nu}) = \sum_{i=1}^N (a_i(\tilde{\nu})bc_i) \quad (1.18)$$

avec a_i , c_i et b sont respectivement l'absorptivité de i^{me} espèce à un nombre d'onde $\tilde{\nu}$, sa concentration et la distance parcourue par le rayonnement dans l'échantillon. Le spectre d'absorption obtenu contient généralement des erreurs de mesure due à plusieurs facteurs liés généralement aux imperfections des modules optiques, les diffractions du rayonnement et l'application des différents filtres. Afin d'effectuer une analyse quantitative précise, des approximations et des traitements supplémentaires doivent être effectués sur le spectre et sur la relation entre l'absorption et la concentration. Plusieurs techniques statistiques sont utilisées pour déterminer une approximation de la concentration d'une espèce [119, 159]. Par exemple, l'ajustement par les moindres carrés est utilisé pour avoir une relation parfaitement linéaire entre l'absorption et la concentration. Le calcul du coefficient de corrélation nous permet de vérifier la qualité de l'ajustement. Plus ce coefficient est proche de 1, plus l'ajustement est meilleur. Cette technique est dite univariée puisqu'elle n'est valide que lorsque l'absorption ne dépend que de la concentration de l'espèce d'intérêt. Cependant, l'absorption dépend de plusieurs facteurs comme illustré à l'équation 1.18. Des techniques statistiques multivariées existent afin de bien définir la relation entre l'absorption et les autres facteurs mis en jeu. La technique du moindre carré classique et la régression des moindres carrées inverses sont des exemples, qui servent à définir une approximation de la concentration d'une espèce pour une absorption donnée en tenant compte de tous les autres facteurs [119, 159]. D'autres techniques statistiques multivariées, tels que **l'analyse en composantes principales** (ACP), permettent à structurer et à résumer les informations ou à expliquer d'une façon plus simple les relations entre plusieurs variables dépendantes [161, 159]. L'ACP est très utile lorsque les variables sont corrélées. Cette corrélation indique l'existence d'une redondance dans les données initiales. Par conséquent, l'ACP est utilisé pour éliminer cette redondance et réduire le nombre des variables. En résumé, ces méthodes statistiques sont utilisées souvent pour analyser des spectres de divers échantillons contenant plusieurs espèces à la fois.

1.3.3 Spectroscopie Raman à Transformée de Fourier

Il existe d'autres types de spectroscopie qui peuvent être utiles dans l'identification et la quantification moléculaire. La spectroscopie Raman est très connue comme une technique complémentaire à la spectroscopie FTIR. Cette technique s'appuie sur la caractérisation des modes vibrationnels des liaisons atomiques. La spectroscopie Raman ne cherche pas à caractériser l'absorption énergétique de l'échantillon, mais sa capacité à diffuser des rayonnements de manière inélastique suite à une décharge énergétique causée par le retour de la molécule à des états d'énergie potentielle inférieurs [162, 163]. Sa mise en œuvre consiste à illuminer l'échantillon par un rayonnement monochromatique de nombre d'onde $\tilde{\nu}_0$, générer souvent par un laser. Ce rayonnement, lorsqu'il interagit avec la composition de l'échantillon, provoque une augmentation de l'énergie potentielle de la molécule et par conséquent, la transition à un état énergétique supérieur à son état fondamental [119]. Généralement, cette transition est suivie immédiatement par un retour à l'état fondamental. La décharge énergétique de la molécule engendre une émission dispersée des photons de longueur d'onde égale ou inférieure à celle du rayonnement incident [119]. Si l'énergie de ces photons est égale à celle du rayonnement incident, on parle d'une dispersion élastique et donc les longueurs d'onde sont égales (dispersion de *Rayleigh*) [119]. Si elle est inférieure, c'est une dispersion inélastique (dispersion de *Stokes Raman*). Par conséquent, la molécule ne revient pas à son état fondamental (état de zéro énergie ou état statique), mais à un état d'énergie supérieur, caractérisé par son nombre d'onde, $\tilde{\nu}_i$, du i^{me} mode vibrationnel. Les photons sont donc émis avec un nombre d'onde $(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_i)$ et une énergie $hc(\tilde{\nu}_0 - \tilde{\nu}_i)$ [119]. Puisqu'une molécule possède plusieurs modes vibrationnels différents, la mesure du spectre des photons émis par la molécule sur une plage de nombres d'onde allant de $\tilde{\nu}_0$ à $(\tilde{\nu}_0 - 4000 \text{ cm}^{-1})$, nous permet d'identifier les modes vibrationnels fondamentalement actifs dans cette molécule. En effet, dans un échantillon, les molécules ne sont pas toutes dans leurs états statiques [119]. Si par exemple on considère une molécule illuminée par un rayonnement monochromatique de nombre d'onde $\tilde{\nu}_0$ et qu'elle est initialement dans son premier mode vibrationnel caractérisé par son nombre d'onde $\tilde{\nu}_1$, lors de la décharge énergétique deux cas sont possibles [119]. La molécule peut retourner à son état initial et donc les photons dispersés ont un nombre d'onde égal à celui du rayonnement d'excitation. Si la molécule retourne à son état fondamental (statique), les photons ont, dans ce cas, un nombre d'onde, $(\tilde{\nu}_0 + \tilde{\nu}_1)$, supérieur à celui de l'excitation. Ce comportement est désigné par la dispersion anti-Stokes [119].

Dans la pratique, le spectre Raman dépend de la fréquence du rayonnement incident. Historiquement, les sources utilisées fournissent de la lumière visible comme les lasers ioniques à Argon qui émettent généralement des ondes entre 488 nm et 514.5 nm. L'utilisation de ces sources est très limitée à cause de la génération de la dispersion élastique [163]. Cette dispersion élastique est présentée sous forme de fluorescence de l'échantillon en raison de son spectre électronique intrinsèque et des transitions électroniques des molécules [163]. Ce-

pendant, l'utilisation de ce type de laser peut être utile dans l'analyse des échantillons non fluorescents [163]. Pour résoudre ce problème, le rayonnement incident doit avoir une longueur d'onde supérieure à celle qui cause les transitions électroniques des molécules cibles (ce qui est équivalent à des nombres d'onde plus faibles) [163]. Le laser à grenat d'aluminium et d'yttrium dopé au néodyme (Nd :YAG) peut être utilisé pour émettre des ondes de 1064 nm. La limitation de l'utilisation de ce laser réside dans sa puissance [163]. En effet, pour des lasers ND :YAG à faible puissance, les pics (appelées aussi bandes Raman qui caractérisent les modes vibrationnels actifs dans une molécule) sont très faibles et difficilement identifiables dans les spectres de Raman. Une augmentation de sa puissance engendre des coûts liés à la sécurité de l'instrument vu que ce type de faisceau laser est très destructif et invisible [163]. Une des solutions courantes est d'utiliser une source visible avec des filtres pour éliminer les bandes de dispersion élastique du spectre. Les filtres coupe-bande sont utilisés pour éliminer les bandes indésirables. Ils sont généralement placés entre l'échantillon et le détecteur, afin d'enlever ces bandes avant qu'elles atteignent le détecteur [163]. Un interféromètre est aussi utilisé dans un spectromètre Raman. La seule contrainte de choix de l'interféromètre réside dans sa résolution. Finalement, les détecteurs de type quantique sont souvent utilisés dans un spectromètre Raman. Les détecteurs à base d'Arséniure de gallium-indium et de germanium sont les plus couramment utilisés. Bien qu'ils nécessitent un système de refroidissement pour garder l'appareillage à une température ambiante, la sensibilité est suffisante pour la plupart des applications [163].

La spectroscopie Raman peut être utilisée dans les mêmes domaines d'application de la spectroscopie FTIR, tels que l'identification des polymères, l'identification structurale des sucres, l'identification des solvants organiques, l'analyse des matériaux composites, etc. [163, 164].

1.3.4 Autres Techniques

Techniques Spectroscopiques

Il existe d'autres techniques de détection à caractère non séparative telles que les techniques de spectroscopie, autres que celles présentées précédemment. On peut mentionner la spectroscopie d'absorption atomique et d'émission de flamme pour la détection des métaux et des métalloïdes dans des solutions organiques [165, 166, 167], et la spectroscopie de masse pour l'identification de protéines, le suivi des réactions chimiques et l'analyse structurale de diverses espèces [168, 169, 170].

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire : est une technique qui permet essentiellement déterminer le contenu et la pureté d'un échantillon ainsi que sa structure moléculaire [171]. Puisque la plupart des noyaux des atomes ont un spin quantique et tous ces noyaux sont chargés électriquement, un transfert d'énergie d'un niveau de basse énergie à un niveau d'une énergie plus importante peut se produire lorsqu'un champ magnétique externe

est appliqué [171]. Ces noyaux ont tendance à revenir à leurs états fondamentaux à travers une émission d'onde électromagnétique de même longueur d'onde que celle de l'excitation [172]. L'analyse du spectre des ondes émises fournit des détails sur les groupes fonctionnels individuels d'une molécule et de sa structure électronique [171, 172]. Dans la pratique, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire consiste à exciter les noyaux des atomes par des rayonnements électromagnétiques dans la plage de la radiofréquence (10MHz -1GHz) et à enregistrer par la suite les ondes émises [172]. Son appareillage typique contient un support de maintien de l'échantillon, un aimant permanent qui génère un champ magnétique uniforme et statique, une bobine électromagnétique qui génère une distorsion du champ magnétique de l'aimant, un balayeur de champ magnétique qui rend le champ appliqué homogène dans tout l'échantillon, une source d'ondes radiofréquences et un détecteur de ce même type d'ondes. [172, 173, 174, 175]. Une variante bien connue de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cette technique est généralement utilisée pour l'étude du corps humain ou animal et plus précisément le cerveau. Son principe de fonctionnement consiste à caractériser la structure et le fonctionnement de ce dernier [176]. En effet, le champ magnétique de l'IRM oriente les axes de rotations des protons des atomes d'hydrogène et par la suite ces atomes sont excités par les ondes de radiofréquence. Puisque le corps humain est composé de presque 63% d'hydrogène, l'acquisition du signal émis par ces atomes nous permet d'avoir des images de la structure du corps ou du cerveau [176].

Autres techniques non spectroscopiques

Des techniques non spectroscopiques existent telles que les techniques basées sur l'analyse des réactions et des propriétés électrochimiques d'un échantillon.

Voltamétrie : est une méthode de détection moléculaire basée sur la mesure du courant induit par la réaction d'oxydation / réduction des espèces dans un échantillon [177, 178, 179]. Cette réaction chimique est induite par une différence de tension appliquée entre deux électrodes, appelées électrodes de travail et contre-électrodes, qui sont placées dans le même échantillon [180]. Plusieurs formes de cette technique existent en fonction de la façon avec laquelle le potentiel appliqué est varié durant l'analyse. La technique est appelée voltamétrie à balayage linéaire lorsque le potentiel change linéairement, avec des pas de l'ordre de 1,0 à 1000 mV/s [180]. Une autre forme de cette technique est la voltamétrie cyclique où le potentiel varie linéairement entre deux valeurs de tension opposées. Un cycle de la voltamétrie cyclique consiste à varier la tension entre ces deux valeurs limites et dans les deux directions [180]. Ce cycle est répété plusieurs fois dans une même analyse afin d'obtenir le voltamogramme cyclique contenant le courant généré en fonction du potentiel appliqué [180]. En analysant le courant résultant, cette technique nous permet d'identifier et de quantifier un grand nombre d'espèces, mais avec une faible sélectivité malgré son faible coût et sa sensibilité élevée, lorsque nous utilisons des électrodes non fonctionnalisées [177, 178, 179].

Potentiométrie : La potentiométrie est aussi une des techniques de détection non séparatives bien connues qui se base sur l'étude des propriétés électrochimiques d'un échantillon. Son principe de détection consiste à détecter les fluctuations de la différence de potentiel mesurées entre deux électrodes qui sont immergées dans l'échantillon. Une troisième électrode appelée électrode de référence est émergée dans l'échantillon où un potentiel fixe est appliqué. La différence de tension est induite par une accumulation d'espèces chargées à l'interface cathodique. Cette accumulation de charge varie en fonction de la composition de l'échantillon, ce qui permet l'identification moléculaire et la quantification des espèces de l'échantillon [181, 182, 183]. Généralement, la voltamétrie et la potentiométrie nécessitent des procédés de fonctionnalisation destinés à des molécules spécifiques pour améliorer leur sélectivité [181, 177]. Autres que leur caractère destructif de l'échantillon, ces techniques sont limitées par la durée de vie de leurs électrodes [181, 177].

Fluorescence : La technique de fluorescence est basée sur l'émission des photons par un matériau suite à une excitation optique à une ou plusieurs longueurs d'onde [113]. L'émission de photons est causée par la transition des électrons vers leur état fondamental après un passage à un état d'énergie plus élevé suite à l'absorption de l'énergie incidente. En effet, à l'état statique d'une molécule, une partie de ses électrons sont à un état d'énergie plus élevé que celui de l'état fondamental. Par conséquent, le retour de ces électrons à l'état fondamental est suivi d'une émission d'un photon à une longueur d'onde plus élevée que celle incidente [113]. Par exemple, la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline ont été détectées par des mesures de fluorescence en excitant l'échantillon par un rayonnement de longueur d'onde égal à 279 *nm*. Par la suite, l'échantillon émet un faisceau à une longueur d'onde égale à 320 *nm* [21]. La mise en œuvre de cette technique est simple. Souvent, nous pouvons utiliser la même configuration que celle utilisée pour effectuer des analyses de spectroscopie UV/Vis [113].

Colorimétrie : La colorimétrie est basée sur la réaction chimique entre les molécules cibles à détecter et des additives qui changent de couleur suite à cette réaction. La présence de la molécule cible est confirmée par un simple changement de couleur de la solution. La concentration est donc proportionnelle à l'intensité de cette couleur. Plusieurs détecteurs qui mesurent l'intensité de la couleur de solution existent, dont les détecteurs utilisés dans les spectromètres UV/Vis. Un exemple très connu d'utilisation de cette technique est le test rapide de grossesse où l'on cherche à détecter des hormones liées à la grossesse [113].

Chimiluminescence : La chimiluminescence consiste à produire de la lumière suite à une réaction chimique entre les molécules cibles (appelées porteur de luminescence) et d'autres molécules (appelées donneuses d'énergie). Les donneuses d'énergie excitent les molécules cibles, ce qui induit une transition électronique à un état d'énergie plus élevé. Le retour à l'état fondamental produit des rayonnements lumineux qui caractérisent la réaction et les molécules en particulier. La quantification de ces rayonnements peut servir pour quantifier les porteurs

de luminescence. Les mêmes détecteurs utilisés pour la colorimétrie et la fluorescence peuvent être utilisés pour cette technique tant que les photons générés par la solution ont des longueurs d'onde dans la plage de l'ultraviolet ou du visible [113].

1.4 Conclusion

Il existe donc dans la littérature un très grand nombre de techniques d'analyse chimique qui peuvent, selon le domaine d'application, identifier et quantifier des substances en solution, caractériser des matériaux ou analyser des cellules biologiques. Ces techniques ont toutes des avantages et des inconvénients, et la pertinence d'une technique par rapport à une autre est souvent liée au domaine d'activité, à des conditions environnementales et à des expertises précises. Généralement, les méthodes de détection optique sans marqueurs comme la spectroscopie ultraviolet/visible (UV/Vis) et la spectroscopie FTIR, assurent une forte réduction de risque de contamination à cause du contact limité entre les différents modules de l'instrument d'analyse et l'échantillon. Par exemple, les techniques pour les analyses in situ sont souvent meilleures pour les applications cliniques, mais cet avantage est dans la plupart du temps accompagné d'une perte de performance (sensibilité, sélectivité, limite de détection...), d'une augmentation de complexité et d'une augmentation de coût d'analyse et de fabrication. Les inconvénients majeurs communs des méthodes de détection répertoriées dans la section (1.2) se résument dans le coût, la complexité d'installation et les étapes de préparation des échantillons. Dans ce travail, nous avons présenté les techniques de détection les plus courantes basées sur la spectroscopie. Nous avons décrit principalement la spectroscopie UV/Vis, FTIR et Raman. Nous avons aussi passé en revue d'autres méthodes de détection utilisées dans l'analyse chimique pour l'identification et la quantification moléculaire.

La spectroscopie UV/Vis est une bonne technique de quantification moléculaire avec une forte sensibilité [111, 112]. Bien que les techniques utilisant la lumière UV peuvent être destructrices au tissu biologique, elles peuvent être utilisées en toute sécurité lorsque le fluide biologique est échantillonné dans un système séparé. En revanche, elle n'offre pas une bonne sélectivité, puisqu'un grand nombre de molécules ont un comportement similaire du point de vue de la réponse optique [107, 112]. D'autre part, la plage de longueurs d'onde couvertes est étroite par rapport à d'autres techniques de spectroscopie, ce qui augmente le risque de chevauchement des signatures optiques de plusieurs molécules et complique en conséquence leurs identifications. Concernant la spectroscopie FTIR, celle par transmission nécessite moins d'installation optique et moins de préparation chimique de l'échantillon par rapport aux autres techniques, et par conséquent elle est moins complexe à mettre en œuvre [134]. Le problème majeur de cette méthode est la nécessité de l'utilisation des matériaux d'encapsulation non absorbants dans la région des longueurs d'onde d'intérêts [134] et particulièrement dans les régions IR proche et lointain. La spectroscopie ATR-FTIR est une technique qui permet d'analyser des échantillons liquides avec des solvants à forte absorption d'énergie émise par le faisceau IR vu que l'onde

ne pénètre que quelques μm [184] dans l'échantillon. De plus, cette technique n'exige pas des étapes préparatoires de l'échantillon [148, 134]. Cependant, c'est une technique d'analyse de surface et en conséquence l'analyse quantitative est peu fiable à cause de la faible répétabilité des spectres [146]. La micro-spectroscopie (microscopie-FTIR) qui se base sur la spectroscopie à réflexion spéculaire représente une technique modulaire qui assure des analyses d'imagerie microscopiques pour l'analyse de la surface ainsi que des analyses spectroscopiques pour l'identification et la quantification moléculaire [137]. De plus, cette technique peut utiliser des systèmes externes qui jouent le rôle des supports réfléchissants des rayonnements incidents. Ces supports sont à faible coût, réutilisables, et peuvent servir à plusieurs analyses [9, 134]. En revanche, l'inconvénient majeur de cette technique est la non-uniformité de la distribution moléculaire dans un échantillon liquide lorsqu'il est manipulé. Cette non-uniformité peut induire une grande déviation dans les résultats ainsi qu'une répétabilité limitée. Un autre problème se produit lorsque le solvant a une intense absorption, il devient difficile, dans ce cas, d'obtenir un spectre d'absorption descriptif de l'échantillon [9].

Plusieurs techniques semblent typiques pour des applications spécifiques, mais pas pour d'autres. Par ailleurs, des techniques sont favorables par rapport à d'autres en fonction de la concentration de cette espèce, le coût, et la complexité d'analyse. Cependant, l'analyse d'une solution aqueuse contenant plusieurs espèces à la fois peut être réalisée avec plusieurs des techniques, avec différents niveaux de sélectivité. Toutefois, il existe des espèces qui ne peuvent pas être identifiées par des techniques spécifiques dans leurs configurations standards comme l'électrochimie sans fonctionnalisation des électrodes ou la fluorescence sans ajout des additives à la solution. Il existe des techniques qui peuvent effectuer des analyses de différentes formes de matières et différents types d'espèces, comme les techniques spectroscopiques, incluant la spectroscopie Raman, ATR-FTIR et micro-spectroscopie. En résumé, la technique idéale pour toutes analyses n'existe pas encore.

Dans les chapitres suivants, nous évaluons les performances de plusieurs techniques pour l'analyse des échantillons de sirop d'érable dans un processus industriel. De plus, nous optimisons la micro-spectroscopie FTIR en réflexion pour détecter différents types d'espèces dans des solutions aqueuses, à faible coût, avec des étapes préparatoires non complexes.

Chapitre 2

Multi-Modal Sensing Platform for Continuous Analysis of Maple Syrup in Production Process

2.1 Résumé

Dans ce travail, nous proposons une nouvelle méthode/plateforme multi-capteurs pour la détection en continue de la °Brix du sirop d'érable et l'étalonnage des couleurs pendant le processus de production. Cette plateforme est basée sur différentes méthodes de détection telles que l'impédance électrique, la détection électrochimique et la détection optique. Premièrement, en utilisant la détection électrochimique, les résultats du courant maximum détecté dans le voltammogramme, obtenu avec l'analyse de voltamétrie cyclique (CV) et les courants générés pour les expériences de chronoampérométrie, présentent un écart type supérieur à 50 %. De plus, nous rapportons dans ce travail l'impact de la température sur les techniques de détection mentionnées précédemment. Nous avons remarqué que le capteur électrochimique avec des électrodes commerciales, dans nos conditions expérimentales, ne fournit pas de mesure fiable pour le procédé industriel du sirop d'érable pour la détection du °Brix. Lors de l'utilisation de la méthode de détection d'impédance électrique, une relation d'ajustement polynomiale a été établie entre l'impédance électrique et le °Brix avec un indice d'ajustement élevé (R^2) égale à 0,895. De plus, une compensation d'impédance doit être prise en compte lorsque la température change. Un capteur optique a été utilisé pour détecter le grade du sirop d'érable. Comme le grade dépend du pourcentage de transmission de la lumière à travers une épaisseur connue de la solution, un détecteur à photodiode et une LED ont été utilisés comme capteur de grade. De nombreuses DEL de différentes longueurs d'onde (verte, jaune, rouge, bleue et infrarouge) ont été testées sur différents grades de sirop d'érable. Les résultats obtenus montrent que la LED verte est la plus appropriée pour la détection du grade du sirop d'érable, ce qui peut conduire à un ajustement linéaire avec un indice d'ajustement élevé (R^2)

égale à 0,963 entre la réponse en tension du détecteur de photodiode et la transmission de la lumière qui est convertie à un grade de sirop d'érable.

2.2 Abstract

In this work, we propose a new multimodal method/platform for continuous maple syrup °Brix monitoring and color grading during the production process. It is based on different detection methods such as electrical impedance, electrochemical sensing and optical sensing. First, using electrochemistry sensing, the results of maximum detected current in obtained Voltammogram with cyclic-voltammetry (CV) analysis and generated currents for chronoamperometry experiments presents a high standard deviation higher than 50%. In addition, we report the impact of the temperatures on previously mentioned sensing techniques. We have observed that electrochemical sensor with commercial electrodes in our experimental conditions did not provide reliable measurement for maple syrup industrial process for °Brix monitoring. When using electrical impedance sensing method, a polynomial fitting relationship was established between the electrical impedance and °Brix with a high fitting index (R^2) of 0.895. Furthermore, an impedance offset must be considered when temperature is changing. Also, an optical sensor was used to detect the maple syrup grade. As the grade depends on the light transmission percentage through a known thickness of solution, a photodiode detector and a LED were used as grade sensor. Many LEDs with different wavelengths (green, yellow, red, blue and infrared) were tested on different maple syrup grades. Obtained results show that green LED is the most suitable one for maple syrup grade detection which can lead to a linear fit with high fitting index (R^2) of 0.963 between voltage response of the photodiode detector and the light transmission which is converted to a maple syrup grade.

2.3 Introduction

Canadian maple syrup production is equivalent to 94 % of the global world maple syrup market with a financial impact of more than 800 million dollars on the Canada's Gross Domestic Products (GDP) [185]. According to Agriculture and agri-food Canada *“At 360\$ million in exports, Canada was the largest exporter in the world of maple sugar and syrup in 2015, with the United States ranking second with \$26 million and Germany third with \$3.5 million. The US is the largest import market in the world for maple sugar and maple syrup with imports of \$229 million in 2015 [186].”* With such financial impact, it is critical to optimize maple syrup production in order to increase the quantity of maple syrup produced from maple sap.

Maple syrup is derived from maple sap which is transformed in order to reach 67 °Brix at room temperature and pressure [187]. It has a high concentration of sucrose, strictly regulated to 67 °Brix (the percentage by weight, of sucrose molecules in a pure water solution where one °Brix corresponds to one gram of sucrose in 100 g of aqueous solution [188]) [189, 190].

However, During the production process the °Brix must be continuously monitored in order to detect any fluctuation in sucrose concentration. The industrial production process consists of evaporating 75 % of water contained in maple sap by a reverse osmosis in order to reach 7 to 10 °Brix first. According to Timothy *et al.*, this technique is mainly used to reduce evaporation time and cost[187]. Then, obtained liquid is injected in an evaporator to remove the rest of water until it reaches the desired °Brix [187, 191].

Sucrose concentration in maple syrup can be quantified using laboratory methods such as High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [192, 193] and Infrared Spectroscopic (FTIR, FT-Raman and NIR) [9, 194]. Despite the high resolution of these techniques, their actual high cost makes them not suitable for an in-line industrial process. In addition, the HPLC analysis is not recommended in an in-line process because analyzed sample cannot be reintroduced in the fabrication process as it may be contaminated. Also, these techniques are time-consuming and not suitable for real-time monitoring in industrial process. Several researchers proposed relatively rapid sensing techniques such as the one proposed by Lagacé *et al.* who tried to predict the maple syrup grade and quality by estimating the microbial quality of maple sap using bio-luminescence [195]. Indeed, bacteria at maple syrup has a direct impact on sugar production as they are involved in the enzymatic hydrolysis of sucrose production [195]. Such effect can have an impact on the maple syrup commercial cost through its grade and its flavor [195]. Also Clément *et al.* suggested to use fluorescence spectroscopy to analyze maple syrup [196]. This technique requires syrup pre-treatment such as centrifugation to remove all solid parts from the samples. The °Brix can also be deduced by measuring the syrup density which depends on the sucrose concentration [197] [198]. However, the maple syrup density depends on the temperature, then a calibration/correction is needed for each measurement [199]. Thus, Goisser *et al.* used a miniaturized portable NIR-sensor to measure the °Brix in tomato samples [200]. The main limitation of this instrument is that it cannot handle liquid sample. Furthermore, other non-destructive techniques can be used for °Brix monitoring in industrial process. For example, Hydrometer is well known for Brix measurement. Despite that it has a relatively low cost and simple usage, it requires a cleaning process between each measurement which should be adjusted manually depending on the temperature as maple syrup density is extremely dependent on the sugar concentration and temperature [188].

Another non-destructive technique for °Brix measurement is the refractometry which is an optical measurement of the refractive index of maple syrup [188]. Indeed, when a light beam with a specific wavelength (589.3 nm) is refracted by the maple syrup on the top of a prism, the angle between initial light beam and the refracted one through the prism is used to calculate the refractive index of the maple syrup [201]. The latter depends on temperature and its correlated to the light source wavelength and sucrose concentration. Indeed, refractometers are widely used because they offer a good accuracy/sensitivity and temperature compensation.

Maple syrup is not only characterised by its °Brix but also by its grade. Many producers

of maple syrup identify syrup grade manually by comparing syrup color with known grade references. However, the grade identification is based on light transmission through a layer of syrup sample. According to the latest Canadian regulations, maple syrup is divided into four grades, Golden with a delicate taste; Amber with a rich taste; dark with robust taste and Very Dark with a strong taste. Corresponding light transmission are more than 75 %, between 74.9 % and 50 %, between 49.9 % and 25 % and less than 25 % respectively [202]. This color grade classification can be performed only at 66-68 °Brix. Despite the fact that the grade monitoring is not as critical as it is the case for the °Brix, continuous monitoring of syrup color can be very useful in terms of quality control.

In this work, we propose a new method/platform for continuous and simultaneous maple syrup °Brix determination and color grading during production process, based on electrical impedance, electrochemical sensing and optical sensing. The proposed platform offers a continuous monitoring of maple syrup (°Brix) quality with a very low-cost analysis and a novel multi-modal continuous maple grade identification in the industrial process. Also, obtained results with our platform show that temperature effect on the maple syrup °Brix can be compensated by considering an offset equation. Thus, different maple syrup solutions with different °Brix and different grades at different temperatures were analyzed with our proposed platform. This paper is organized as follows, Section 2.4 describes the developed platform for sugar sensing. The experimental setup of the proposed platform is presented in Section 2.5. Finally results of several analyzed samples of maple syrup are reported and discussed in Section 2.6.

2.4 System Description

The designed multi-modal platform contains four sensing modules (impedance, optical, thermal and electrochemical) as illustrated in Figure 2.1 of the platform. An electrical impedance Analyzer Pmod IA (Digilent, Pullman, Washington, USA), shown in Figure 2.2.a, measures the electrical impedance of the maple syrup to detect sucrose concentration. Microcontroller was set to perform impedance measurement between 1 Hz and 20 kHz but reliable data from the sensor is limited to 10 kHz to 20 kHz frequency range. Impedance measurements at lower frequency were not reliable and they were not considered for maple syrup characterization. The impedance sensor is connected to a commercial screen printed carbon electrodes (SPCE) (RRPE1002C, Pine Research, Durham, North Carolina, USA) as shown in Figure 2.2.b. This electrode has three exposed area (A1, A2 and A3). A1 and A2 are used for impedance measurement while A3 is used by the embedded electrochemical sensor (in addition to A1 and A2). Then, to detect syrup grade, second optical sensor was also embedded in the platform using a light-emitting diode (LED) as light source emitting at 566 nm and passing through both maple syrup and Glycerol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). The latter was used as a reference solution. Then a photodiode (Opt101, Texas Instruments, Dallas, Texas, USA) senses the transmitted light and a microcontroller compares the obtained data with the

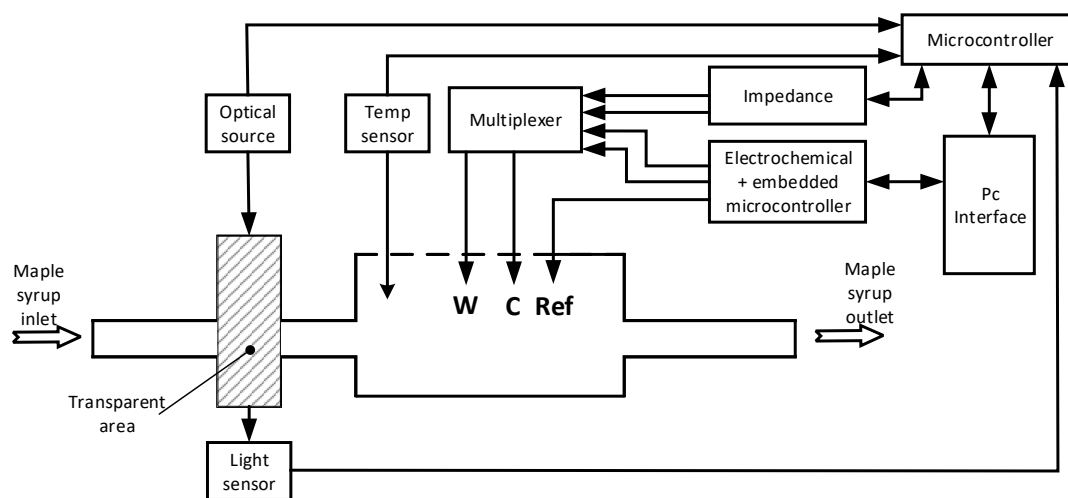


FIGURE 2.1 – Diagram of the developed platform.

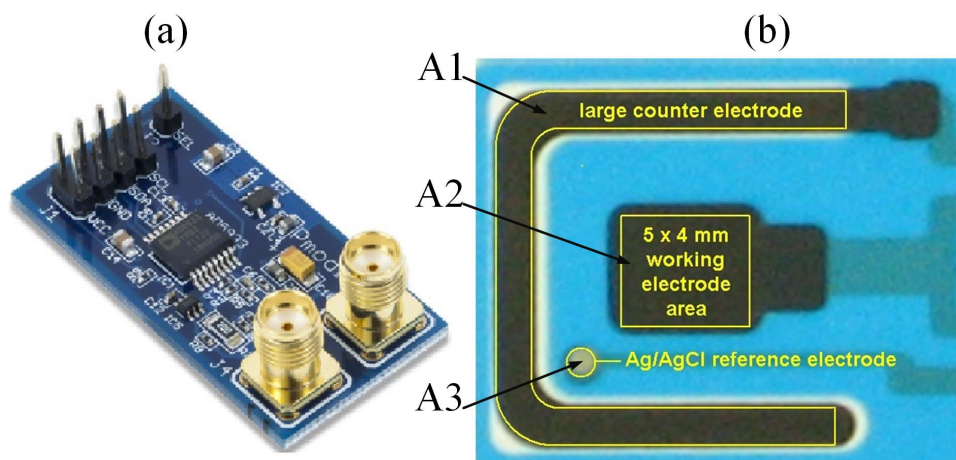


FIGURE 2.2 – (a) Electrical Impedance Analyzer Pmod IA and (b) Screen Printed Carbon Electrodes.

reference solution. Glycerol has several physical proprieties similar to maple syrup such as density and viscosity at room temperature in addition to its high transparency. The system is calibrated only one time using the Glycerol in the two compartments (reference and sample). Each compartment is a 10 mm transparent cuvette (SARSTEDT, Nümbrecht, Germany).

Temperature is an important constraints in maple syrup industry as it has an impact on the quality of the syrup. In addition, the °Brix has a strong dependence to the temperature [188]. Indeed, the density of the syrup decreases when the temperature increases and consequently sugar concentration is affected. Thus, a thermistor was implemented to monitor the fluctuation of Brix with electrical impedance and temperature.

Then, an electrochemical sensor was embedded in the platform to perform cyclic voltammetry and chronoamperometry analysis on maple syrup sample to evaluate also sucrose concentration. A home made potentiostat is used for electrochemical analysis using the same electrodes (SPCE) as the impedance sensor [203, 204]. As only one SPCE is shared by the two sensors, a multiplexing system was designed to switch between different modules. The multiplexing module consists of two relays that switch from one sensing mode to another one.

Microcontrollers (ATmega128 and ATmega2560 (Microchip Technology, Chandler, Arizona, USA)) was used to monitor the electrochemical, impedance, temperature and optical sensors. As the system is designed for in-line maple syrup monitoring, a personal computer (PC) is continuously connected to the platform which also provides the needed power supply for all electronic modules. Power consumption of the complete platform was less than 2.5 W which is enough to be powered by PC.

The working pressure inside the platform tubes in normal working conditions is 11 Psi and the temperature of the syrup is often close to 100 °C. Then, inlet tube was designed with a large inner diameter (15 mm) in order to decrease the inside pressure. It was made with a bio-compatible High Temperature Resistance Materials (HTRM) in order to avoid any tubing deformation, food contamination or tube failure. As reported in Figure 2.3, Finite Element Simulation (FES) results show that for standard tubing materials (polyamide), the tubing is exposed to a high deformation induced by the working conditions of the platform (100 °C as syrup temperature and 11 Psi as inlet pressure). Simulation results also show that other metal materials such as aluminum or copper can be used for fluidic tubing but we used stereolithography printing process for prototyping purpose. In addition, a fluidic T-junction with a lower diameter (10 mm) was implemented in order to derive a syrup sample to the optical analysis area. Then, another T-junction with a diameter of 4 mm and two 90 ° needles with 2 mm inner diameter were fabricated using HTRM, in order to generate a continuous flow inside the sample cuvette of the optical compartment. The inlet needle was longer than the outlet needle to ensure a continuous flow without precipitation. Obtained FES results reported at Figure 2.4 show that the average pressure inside the cuvette was 2.5 Psi, 1.6 Psi and 2 Psi when the outlet needle is longer, equal and shorter than the inlet needle respectively. However, as shown in Figure 2.4, when the inlet needle is longer, a better liquid mixing (illustrated by the density of streamlines) was achieved inside the cuvette which avoids precipitation. In the other side, when the outlet needle is longer or equal to the inlet, the liquid is not mixed properly as obtained streamline density is considerably low compared to the other configuration of needles as shown in Figures 2.4.a and 2.4.b. A valve was added at the inlet needle to control the flow rate in this T-junction. Then, the syrup was re-injected in the production line. Finally, an opaque cover is made with black polylactic acid polymer (PLA) to stabilize the two needles and block any optical interference from external environment. Figure 2.5 illustrates the complete designed fluidic structure of the proposed platform.

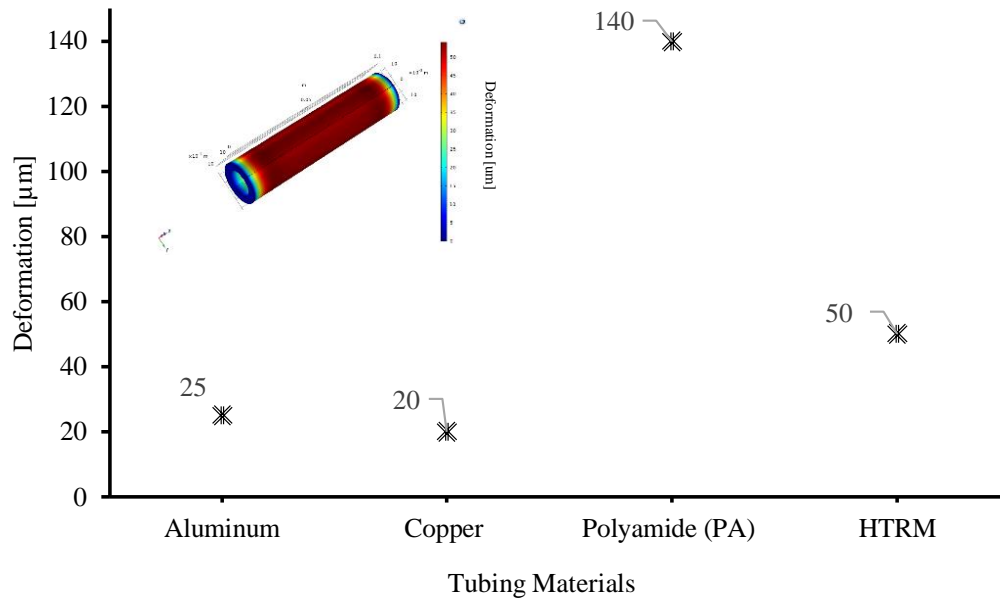


FIGURE 2.3 – FES results of Obtained deformation as a function of different tube made with different type of materials.

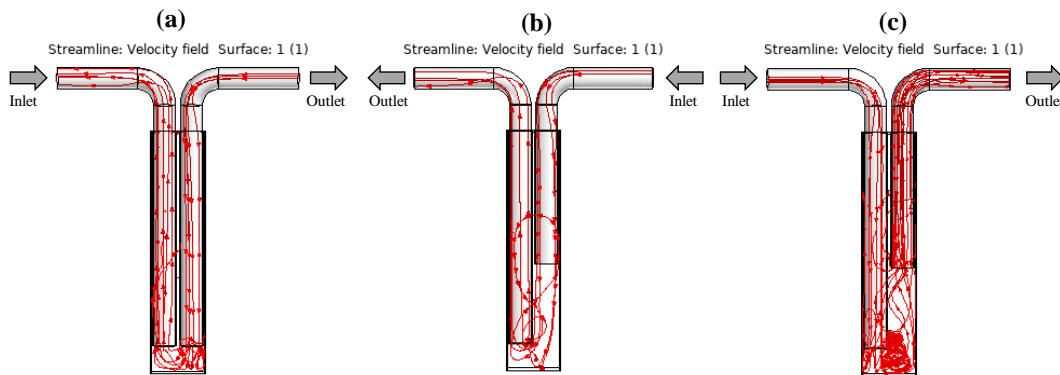


FIGURE 2.4 – FES results. (a) Outlet and inlet needles with the same dimension, (b) Outlet needle longer than the inlet one and (c) Inlet needle longer than the outlet one.

2.5 Experimental Setup

Figure 2.6 shows our proposed experimental setup for continuous maple syrup analysis and monitoring. The proposed platform was installed in the production line of maple syrup and connected to different maple syrup tanks depending on the process stage (for each process we have different °Brix). All electronic boards and tubing were embedded in an aluminum box and sealed together. The platform was coupled to a peristaltic pump, a flow-meter, two manometers, three digital refractometers, four valves and a computer interface. The flow meter was used to monitor the volume of maple syrup driven by the pump while manometers monitor

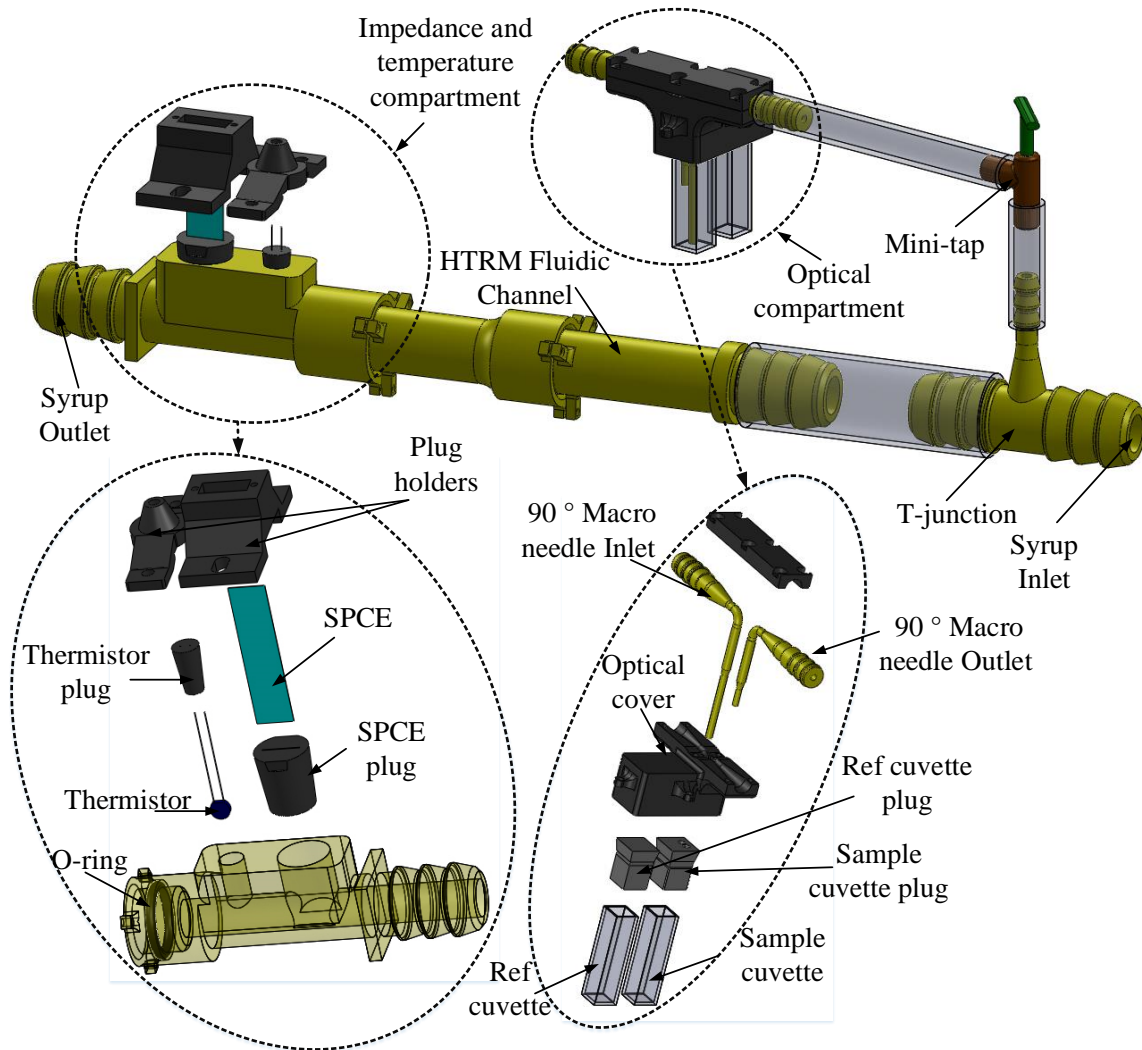


FIGURE 2.5 – Detailed system of the fluidic setup.

the pressure in the inlet and the outlet of the platform to avoid leakage or tube failure. A commercial refractometer (ATA60, Atago, Bellevue, Washington, USA) was installed before the inlet to measure the °Brix. Several valves were also added to control syrup pressure as shown in Figure 2.7. The tube inner diameter guiding maple syrup to the optical sensor is 10 mm while the main tube inner diameter connecting the maple tank to the platform is 15 mm. In order to avoid tubing failure due to diameter variation and consequently hydrodynamic resistance change, a secondary safety valve has been added to drain high pressure. If the safety valve is completely closed, the pressure inside the optical sensor is very high which can lead to a failure or a leakage. However, if the valve is completely open, pressure inside the optical sensor is near to zero and liquid cannot be driven to the optical sensor compartment. An initial calibration was achieved manually with a manual manometer. Figure 2.7 describes the detailed fluidic architecture of all the setup installed in maple syrup automated flow.



FIGURE 2.6 – Experimental setup in maple syrup automated farm.

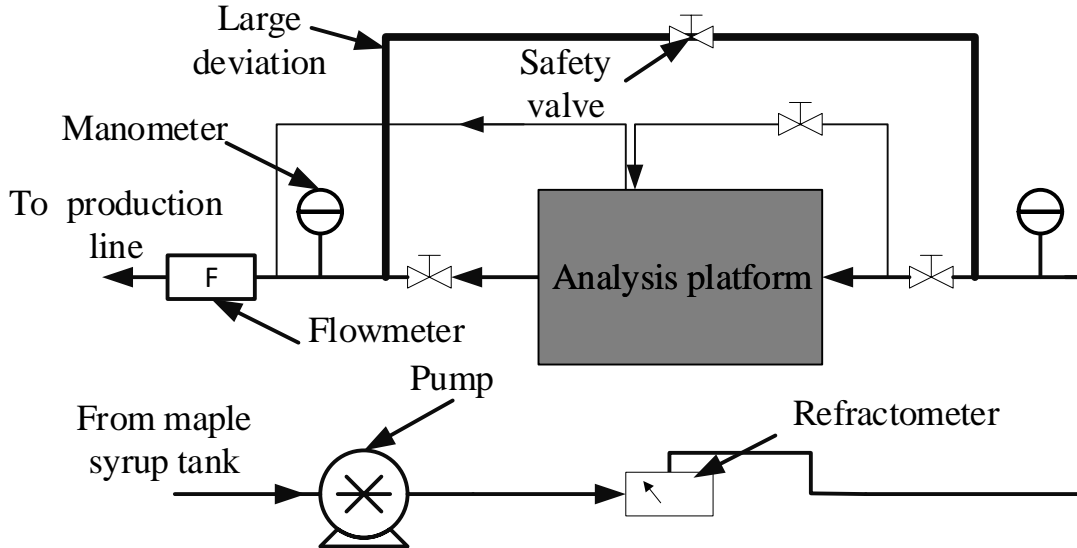


FIGURE 2.7 – Experimental setup of the flow control.

The inlet and the outlet ports of all the platform are connected to a fluidic multiplexer in order to select the maple syrup tank as shown in Figure 2.8. During the production process, three samples from different tanks can be driven into the platform with different °Brix (0, 2, 30). 0 °Brix corresponds to water used to clean the platform tubing. After performing maple syrup analysis, the same sample is re-injected in its corresponding tank.

2.6 Results and Discussion

In order to evaluate the effect of temperature on the electrical impedance of the maple syrup, different maple syrup samples were analyzed using the same impedance sensor at two different

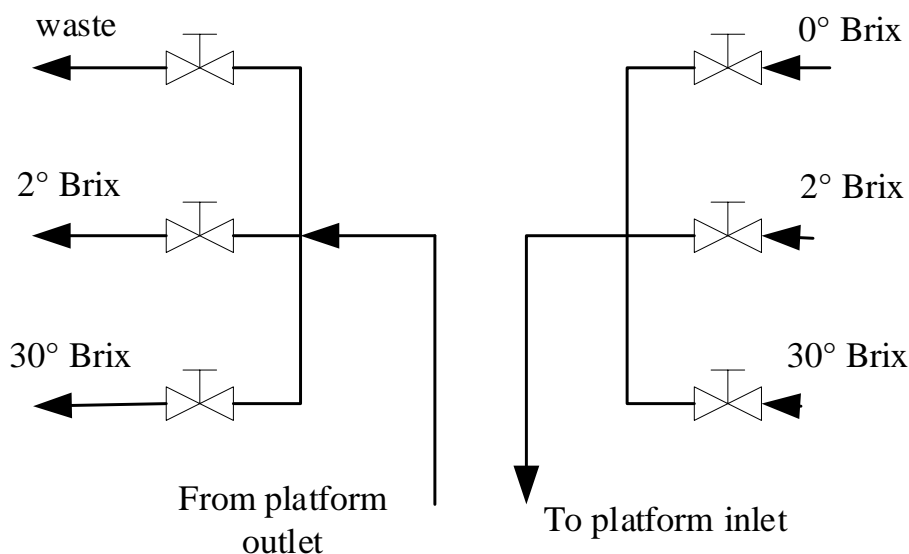


FIGURE 2.8 – Fluidic switchboards for different °Brix analysis.

temperatures (29 °C and 100°) and results were shown in Figure 2.10.a and 2.10.b. Equation (2.1) is a relation between calculated impedance and measured magnitude. The gain factor is obtained through a calibration process prior to syrup maple analysis process. In addition, as shown in Figure 2.9 the gain factor is constant for high frequency ($\geq 10\text{kHz}$) and consequently only results for frequencies higher than 10 kHz are considered.

$$Impedance = \frac{1}{Gainfactor * Magnitude} \quad (2.1)$$

Impedance phase is also dependent to °Brix, frequency and temperature which makes °Brix sensing based on the impedance phase more complex and sensitive to any frequency fluctuation. Consequently, only electrical impedance based on magnitudes is considered for °Brix detection as it is less sensitive to frequency fluctuations in our experimental conditions.

Impedance of seven maple syrup samples with seven different °Brix (21.4, 30, 38.4, 46.5, 51.6, 59.6 and 67.2) were analyzed at 29 °C. They were prepared by diluting a 67.2 °Brix syrup. Then, the °Brix of each sample was measured using the commercial refractometer as a reference. Then, for each analyzed maple syrup solution, an average of electrical impedance in the frequency range of 10 kHz to 20 kHz is calculated. A calibration curve of °Brix versus electrical impedance was plotted and reported in Figure 2.11. In addition, polynomial fittings curves were extracted to establish a relation between the electrical impedance and the °Brix for each temperature. Indeed, as it can be seen in this figure, the electrical impedance and the °Brix are exponentially inter-dependents in addition to an offset induced by a temperature

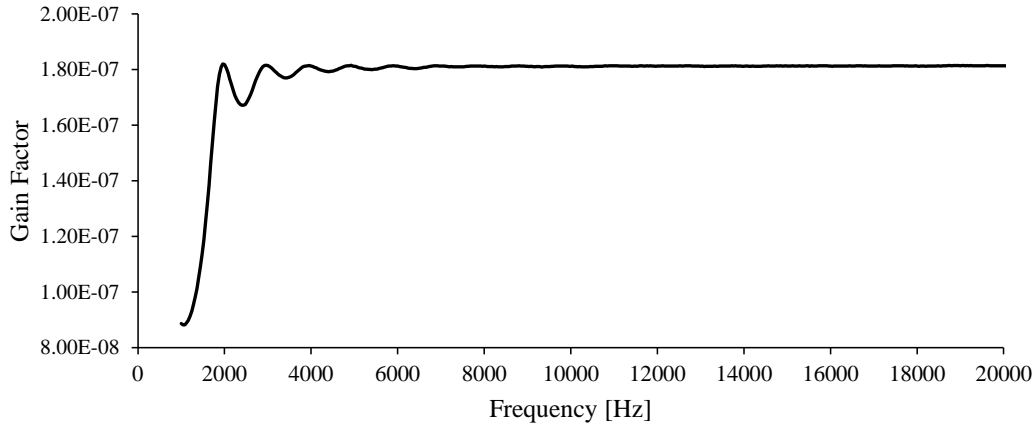


FIGURE 2.9 – Gain factor versus Frequency for 21.4 °Brix solution.

change. We observed also that when the temperature increases, the electrical impedance of the maple syrup decreases as the syrup is more conductive.

As described at Section 2.4, two identical LED and photodiodes were used in the optical chamber of maple syrup. First, an experimental setup using a transparent tube was used to analyse the impact of LED wavelength on the efficiency of the optical sensor. The optical characterisation of maple syrup was tested with, Blue (465 nm), green (560 nm), yellow (566 nm), red (590 nm), infrared (618 nm) and white LEDs as light sources. All LEDs are powered with 2.6 V (52 mA). In addition, different grade references from the ACER kit (ACER, Québec, Canada) were tested using each LED. As shown in Figure 2.12, with red and infrared LEDs, the optical sensor saturated with all syrup grades. In the case of blue LED, it was saturated when transmitted light exceeds 45 %. However with green, yellow and white LEDs it has an approximately linear behavior. For the rest of the analysis, we used only Green, yellow and white LEDs and each test was repeated three times. As shown in Figure 2.13, non-stable behavior was observed with yellow and green LED. Indeed, we observed that with these LEDs, transmitted light is higher through a golden syrup (transmission is higher than 75%) than through Glycerol. This behavior is due to the light refraction and diffraction by transparent tube material and curvature respectively. Then, a cuvette, described in Section 2.4, was used to avoid light refraction and diffraction. We observed that, the white LED powered with 2.6 V has the best linearity for a light transmission between 25 % and 75 % but when transmission is higher than 75 % (golden syrup) we observed saturation with the same LED. From the other side, green LED is complementary to white LED because the optical sensor does not saturate and we observed a peak with golden syrup. Then the photodiode could lead to the same sensor behavior for a light transmission ratio of 70 % or 90 %. Consequently, green and white LEDs can be used together in our platform. Thus, if the photodiode output voltage is 4.4 V using

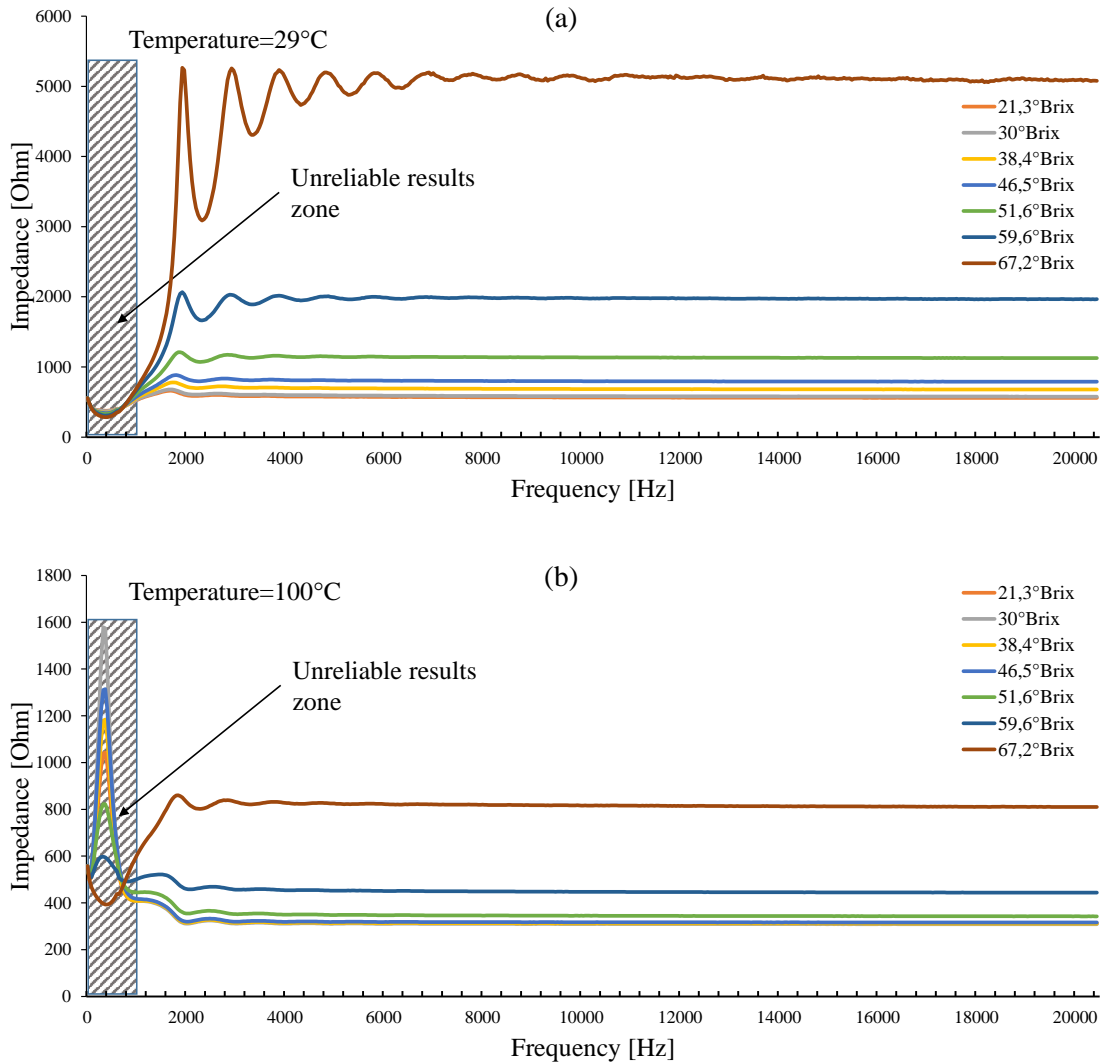


FIGURE 2.10 – Electrical impedance versus sampling frequency at : (a). 29 °C and (b). at 100 °C.

the white LED and 1.0 V with the green LED, then it corresponds to a transmission of 90 % and the syrup is considered as golden grade but, if the response is 4 V and 1 V using white and green LEDs respectively, so the syrup transmission is 65 % and it is considered as amber grade. The need of using the two LEDs together and the observed peak with green LED are mainly due to the light interference induced by the transparent tube which is removed by using spectrophotometer cuvette. Consequently the two LEDs must be embedded together in the system if we use a transparent tube and only green LED can be used with commercial spectrophotometer cuvette.

Finally, other tests were performed for all maple syrup grades with different °Brix and a green LED powered with 2.2V using the commercial cuvette. As it can be observed in Figure 2.14,

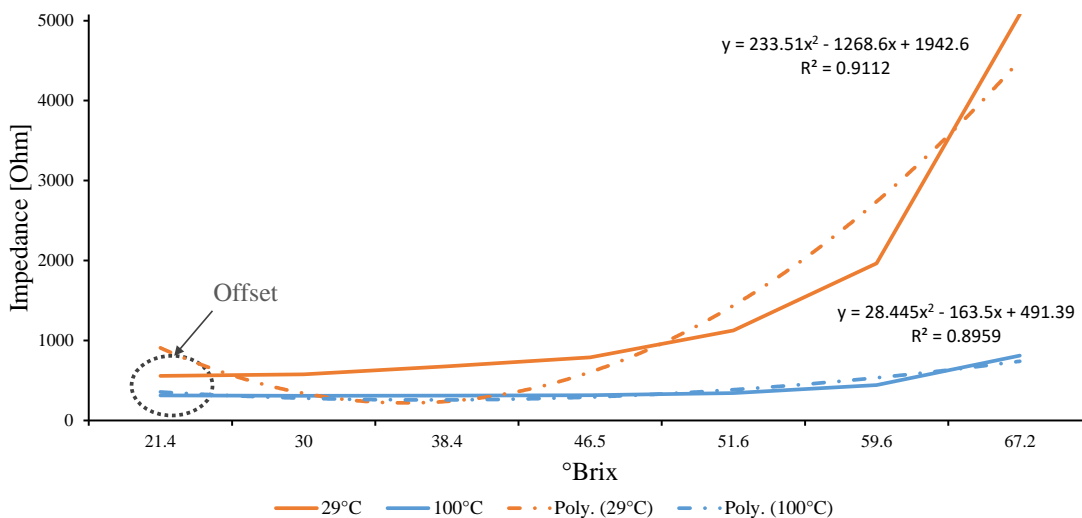


FIGURE 2.11 – Average of electrical impedance measured with the developed platform versus °Brix at two different temperatures for a frequency range of 10 kHz-20 kHz.

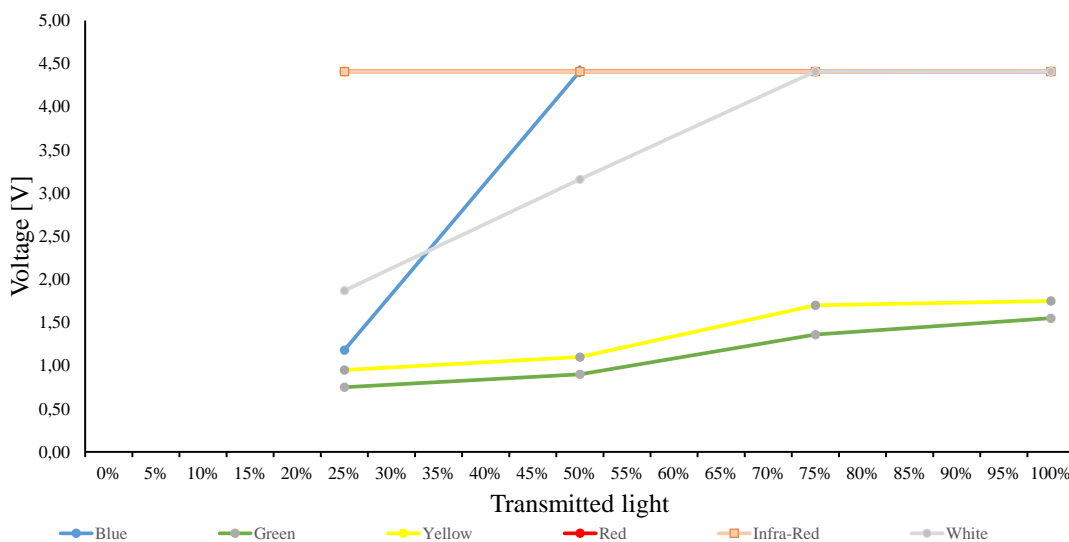


FIGURE 2.12 – Measured photodiode voltage versus transmitted light with different maple syrup grades using Blue, green, yellow, red, infrared and white LEDs powered with 2.3V.

the relation between measured voltage from the photodiode sensor and the maple syrup °Brix is linear using commercial optical cuvette which makes the °Brix detection possible even with the optical sensor basing on the fitting equation.

Using our designed Potentiostat, several electrochemical analyses were performed on different maple syrup samples with different °Brix. We analyzed the efficiency of electrochemistry ana-

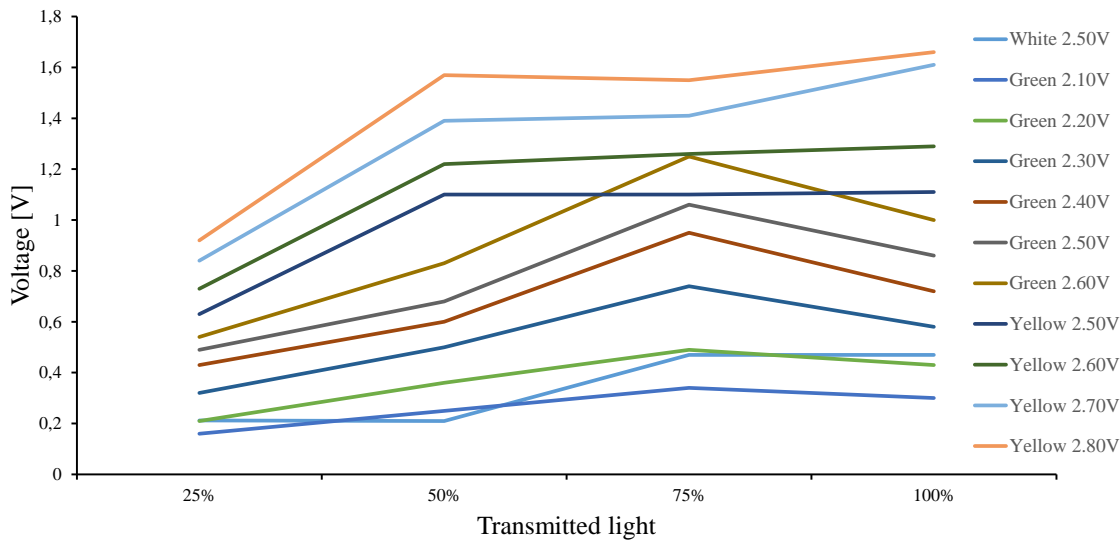


FIGURE 2.13 – Measured photodiode voltage versus transmitted light with different maple syrup grade using different voltage supplies for green, yellow and white LEDs.

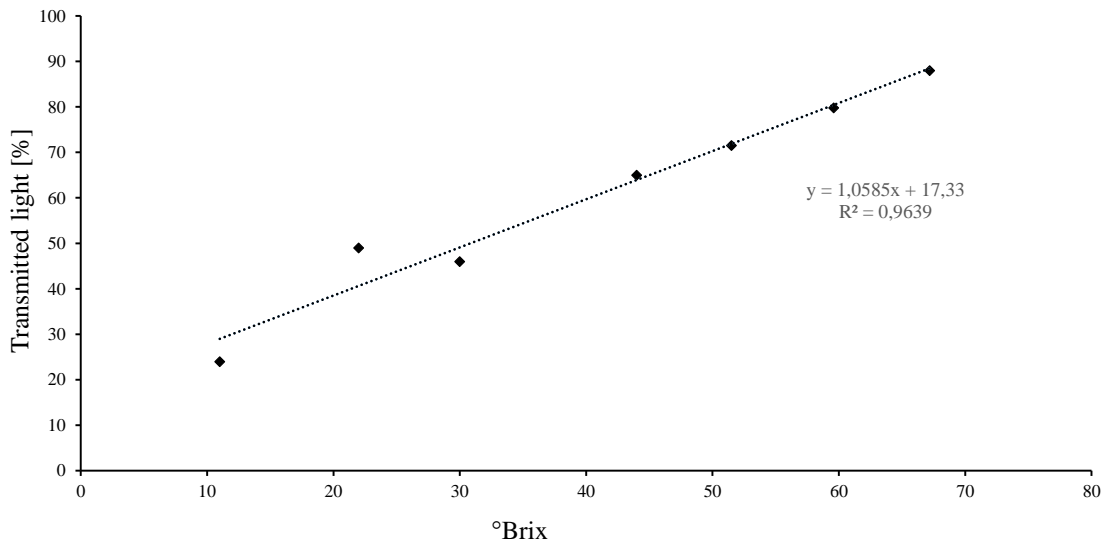


FIGURE 2.14 – Measured photodiode voltage versus °Brix using green LED powered with 2.2V.

lysis to measure °Brix using cyclic-voltammetry (CV) and chronoamperometry. 8 samples of maple syrup were prepared with different °Brix (10.5, 20.2, 30, 38.4, 44.5, 51.6, 59.6 and 66.5). 10 CV cycles from -1.5 V to 1.5 V with a scan rate of 150 mV/s have been applied and repeated 5 times in order to verify the reliability of obtained results. SPCE electrodes have been also used during all experiments. As shown in Figure 2.15, obtained curve cannot be compared to usual CV curve with Gaussian peak. From industrial perspective, obtained results do not

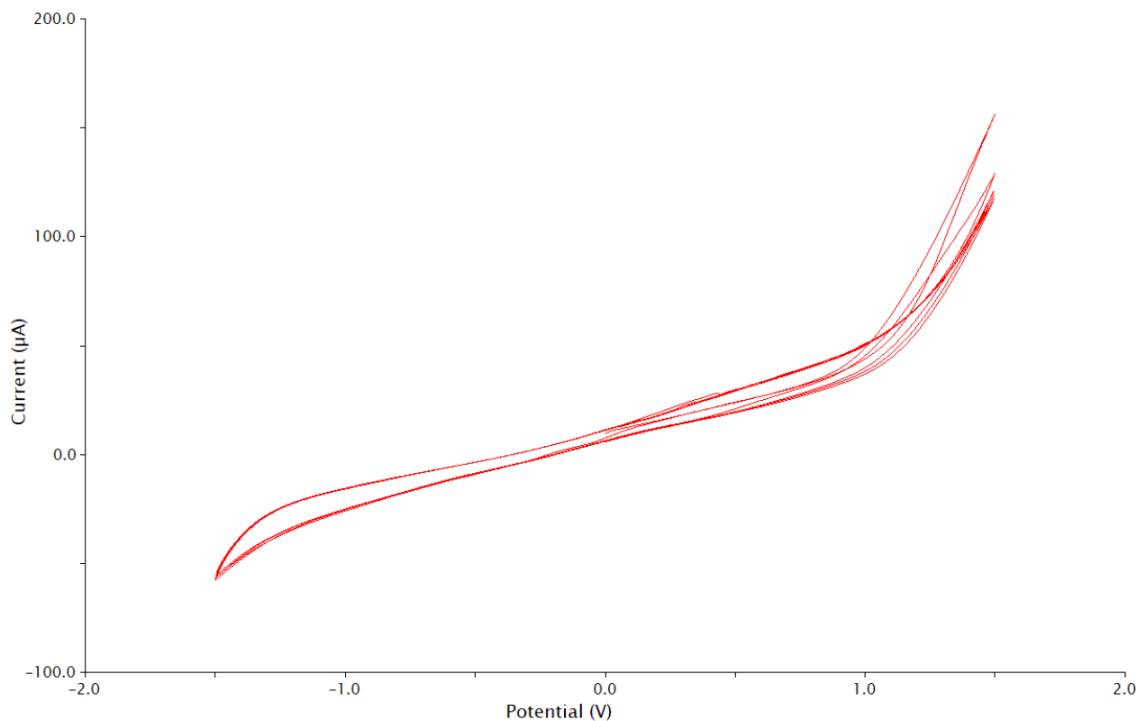


FIGURE 2.15 – Voltammogram of 66.5 °Brix maple sample.

provide useful usage of this technique because these results can be induced by other molecules as electrodes are not functionalized in addition to electrode oxidation and impurities. For each sugar concentration several CV were achieved and a data processing was performed. Then, we measured the standard deviation of voltage to verify if the measured current corresponds to the same point. Based on 40 measurements, the obtained standard deviation was 0.17%. However, using the same approach with 40 experiments we observed a large standard deviation greater than 50 % for each measured current. Thus, we cannot consider the current curves as identical for the same concentration. Then, we performed a maximum and minimum peak analysis for each voltammogram. Figure 2.16 shows the maximum detected current in CV with different °Brix of maple syrup. We observed, an inversely proportional relationship between the °Brix and the maximum current. Then, in order to confirm obtained results, two other sets of tests were performed with eight different samples with the same °Brix as the first set of samples. As we can see in Figure 2.16, the error which represents the standard deviation through the obtained results of the three sets of analysis, is considerably high which means that in the case of the second and third sets the relationship between the °Brix and the maximum currents is not necessarily linear.

Finally, a Chronoamperometry analysis of different maple syrup samples was performed. A fixed voltage was applied and current is continuously measured during 10 s. Six different voltages (-4 V, -2.5 V, -0.7 V, 0.7 V, 2.5 V and 4 V) were applied with three different °Brix

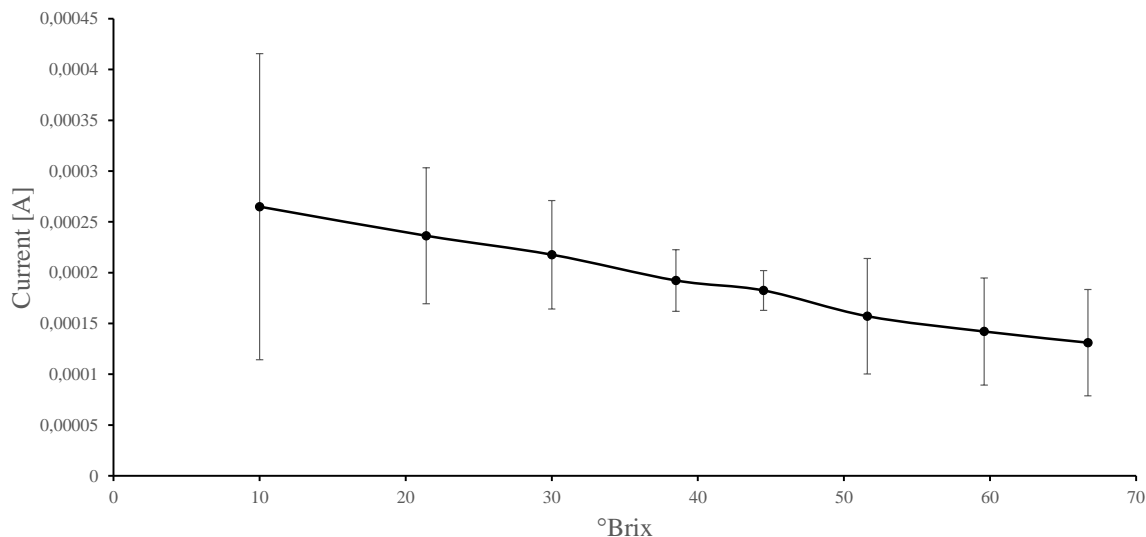


FIGURE 2.16 – Maximum current versus °Brix using cyclic-voltammetry technique. Error bare corresponds to the standard deviation through three sets of experiments.

samples (20, 42.5 and 66.7). Also we considered the effect of the temperature on obtained results (29 °C and 100 °C). Obtained results are shown in Figure 2.17.a and 2.17.b respectively for each temperature. We observed that the measured current is proportional to the °Brix for all applied voltage except in the case of -0.7 V and 0.7 V where the current variation versus the °Brix is negligible at 29 °C. Indeed this behavior was observed at 29 °C but when the temperature increases the relationship is no longer linear. This behavior is mainly induced by the degradation of the three sub-electrodes of SPCE with maple syrup. Then, in order to obtain reliable results with the electrochemical technique, the SPCE should regularly be changed or modified with more robust electrodes that has better robustness to high temperature. Consequently, these observations made electrochemical technique as described with proposed setup for limited usage in the case of a continuous maple syrup analysis in industrial process. Indeed, changing the electrodes every ten or twenty minutes is not appropriate for industrial process as it has an impact on operational cost.

2.6.1 Discussion

Four sensing techniques had been investigated in this work including optical one (for syrup grade only), cyclic voltammetry, chronoamperometry and electrical impedance techniques. Among these techniques, best results were observed with electrical impedance measurement of the maple syrup. This technique can be improved by saturating the maple syrup sample using a pH modification of the sample with Potassium Chloride (KCL) in order to saturate ions in the solution. Although, the pH monitoring improves the linearity of the relationship between the maple syrup °Brix and electrical impedance, it remains a destructive method as analyzed

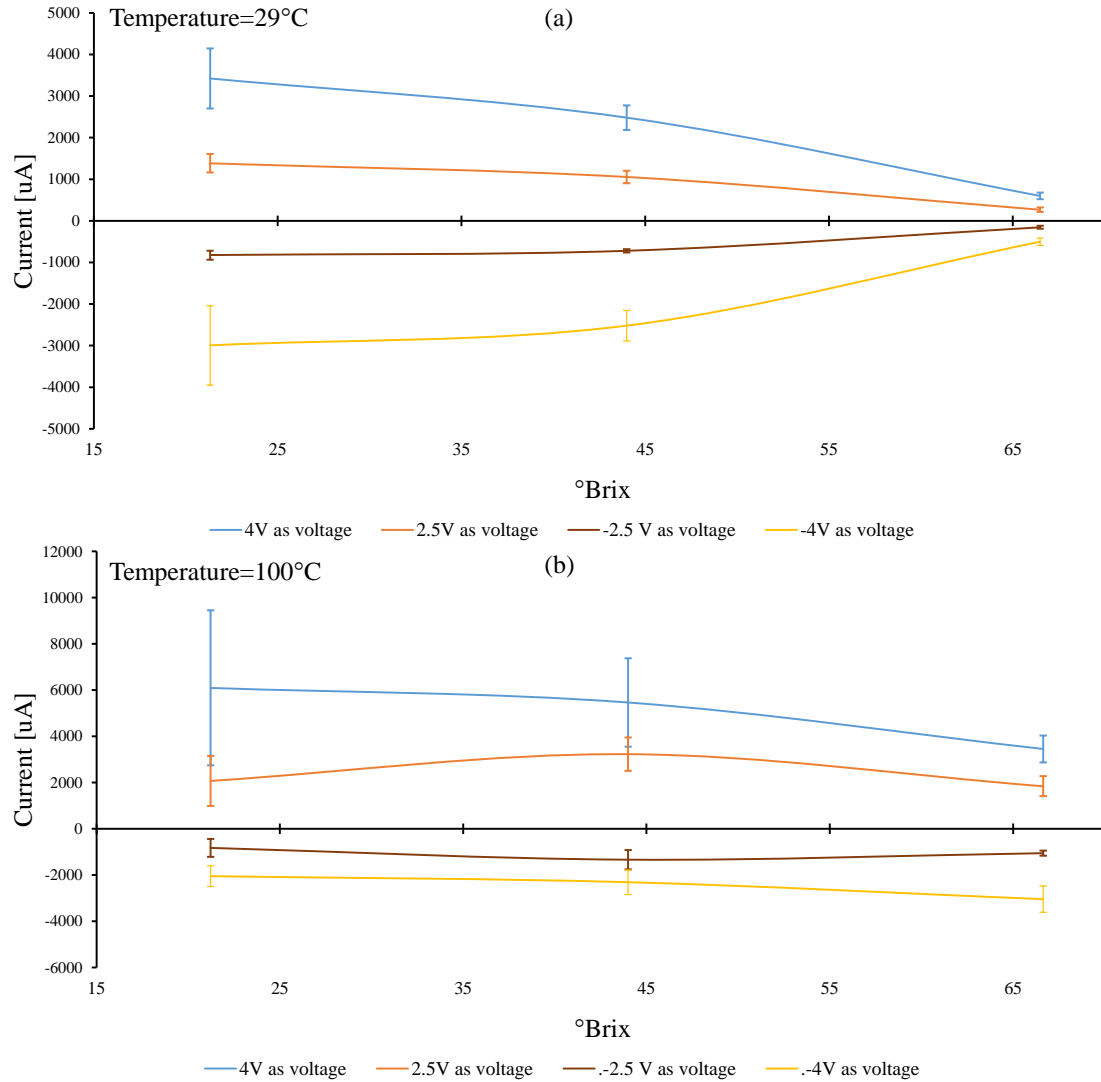


FIGURE 2.17 – Current behavior in the Chronoamperometry analysis versus °Brix at (a) 29 °C and (b) 100 °C.

sample cannot be re-injected. Consequently, this technique cannot be used for maple syrup monitoring in continuous industrial process. In the case of electrochemical sensing at 29 °C a linear relation can be obtained between measured current and °Brix, however this technique remains unstable at high temperatures in our test conditions. Also, the reputability of the results with the commercial SPCE at high temperature, remains the main disadvantages of this technique as well as limited life time of these electrodes. Finally, using optical sensor with transmission measurement did not provide a clear relation between the °Brix and color grade of maple syrup. On the other hand, optical sensor has a high efficiency in the classification of the maple syrup according to Canadian standard maple syrup grade.

2.7 Conclusion

In this paper, a new platform for continuous maple syrup analysis was developed and installed in maple syrup production line. The platform was mainly composed of three parts, the optical sensor, the electrical impedance sensor and the home made potentiostat for electrochemical sensing. Glycerol 99.5 % was used as reference for the optical reference cuvette, which ensures 100 % of light transmission. The main objective of the optical sensor is to classify maple syrup grade according to the Canadian standard. Among tested methods, obtained results show that electrical impedance measurement is the best technique for the maple syrup characterization where a clear relationship between the electrical impedance and Brix degree is observed in our case and test conditions and among techniques that we tested.

Chapitre 3

Pseudo-Continuous Flow FTIR System for Glucose, Fructose and Sucrose Identification in Mid-IR Range

3.1 Résumé

Dans cet article, nous présentons un nouveau système microfluidique basé sur la spectroscopie FTIR pour la détection du glucose, du fructose et du saccharose. Le système microfluidique proposé est basé sur un module de création d'un flux pseudo-continu couplé au microscope-FTIR. La détection et la caractérisation des échantillons de sucre ont été effectuées en enregistrant leur spectre d'absorption dans la plage de fréquences [700 cm^{-1} – 1000 cm^{-1}] de la région Mid-IR. Le système d'écoulement pseudo-continu proposé est conçu pour améliorer l'uniformité de la distribution des échantillons dans la zone d'analyse par rapport aux systèmes conventionnels. Les résultats obtenus pour différentes concentrations de sucres, montrent une très faible erreur de mesure de 4,35 % dans l'intensité du pic d'absorption, qui est dix fois inférieure à l'erreur obtenue en utilisant les mesures conventionnelles.

3.2 Abstract

In this paper, we present a new FTIR-based microfluidic system for Glucose, Fructose and Sucrose detection. The proposed microfluidic system is based on a pseudo-continuous flow coupled to a microscope-FTIR instrument. The detection and characterization of sugar samples were performed by recording their absorption spectrum in the wavelength range $700\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ of the Mid-IR region. The proposed pseudo-continuous flow system is designed to improve the uniformity of the sample distribution in the analyzed area versus conventional systems. The obtained results for different sugars concentrations, show a very low measurement error of 4.35% in the absorption peak intensity, which is ten times lower than the error obtained using

the conventional measurements.

3.3 Introduction

Knowing ingredients type and quantity in a consumable food is a highly critical information for safety and population health [205]. Among these ingredients, sugar is a very important element. However, an over consumption of sugar can lead to obesity or health problem related to diabetes [206]. Thus, in food industry, sugar types and quantities are critical for quality control [207]. Consequently, qualitative and quantitative detection of different types of sugar is highly important in the optimization of the production line in the food industry, in the diet for diabetes patients and to reduce the risk of obesity [208, 209]. In order to be able to monitor sugar concentration during the production process, several sugar detection methods coupled to a molecular separation techniques were proposed to identify and quantify sugars [210, 211, 19, 212, 27, 213]. For example, Pettersen *et al.* used an anion-exchange chromatography process to separate sugar in four different samples of wood and wood pulp hydrolyzed in sulfuric acid [210]. The separated sugar is quantitatively measured by a pulsed amperometric detector. They were able to achieve a limit of detection (LOD) of 13 *ng* for glucose and 25 *ng* for arabinose [210]. The main disadvantage of this method is related to the food industry where it needs a very expensive instruments such as chromatography column of sugars molecules and a very sensitive sensor. Also, Jiannong *et al.* used an electro-chemical detection process with a capillary electrophoresis to separate different types of sugar such as Glucose and Galactose [211]. The achieved LOD was 1 *fMol* for both Glucose and Galactose with a relative standard deviation of 5 % [211]. For this method, contamination risk is very high where a molecular oxidation can take place, which leads to a change in the molecular charge density. An optical sensing method was proposed by Roig and Thoms, to extracte sugar concentration (Glucose, Fructose, Sucrose and Lactose) from fruit juices and soft drinks using ultraviolet (UV) photo-degradation and UV spectrophotometry process (UV/UV) [19]. This extraction method was inspired from the UV/UV process developed for the measurement of some wastewater pollution parameters [214, 215]. They were able to detect sugar concentration ranging from 40 *g.l*⁻¹ to 500 *g.l*⁻¹. Unlike other methods, this technique has a low risk of contamination but the achieved LOD with this setup remains very high for sugars quantification in commercial food. Based on the same principle of optical sensing, Duarte et al. used the Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FTIR) with wavelength ranging from 900 *cm*⁻¹ to 1250 *cm*⁻¹ coupled to an Attenuated Total Reflectance (ATR) cell, in order to detect the ripening of Mango through the quantification of the sugar concentration in Mango juice [212]. The achieved LOD was 1.5 *g/L* with a prediction error of 4.9%. The achieved LOD with the ATR-FTIR method is very high as in the case of the UV/UV method [19]. Also, the experimental setup requires dedicated and expensive equipments such as a crystal for the ATR cell which is not compatible with all types of solvents. Several other researchers developed other sugar detection

techniques using FTIR spectrometer coupled to different sample handling systems such as (ATR) cell [27, 216] and Partial Least Squares (PLS) [213]. The optical detection methods remain among the best approaches for sugar detection, particularly in commercial production. Indeed, optical sensing is a contactless detection technique and thus, it enhances the quality control and reduce contamination risk. The FTIR spectrometer is a well-used equipment in a lot of chemistry and physics experiments, such as quantitative analysis of complex mixtures [217, 218], investigation of dynamic systems [219, 220], biological and biomedical analysis [221, 222, 223, 134], micro spectroscopy and hyper spectral imaging [224, 225], and in the study of many types of interfacial phenomena [226, 227].

Indeed, the FTIR spectroscopy is a powerful tool to detect solid, liquid and gas phase species through their absorption spectrum in a wide wavelength range. The operating principle of FTIR spectrometer is mainly based on (i) the illumination of the sample with a multiple wavelength light beam , (ii) the measurement of its absorption and (iii) a data processing system. The used beam light is usually generated from a broadband light source (often a black body), and transmitted through a Michelson interferometer in order to excite the sample with separate wavelength. As shown in Figure 3.1, the operating principle of this interferometer is based on a beam splitter that splits the beam of light, and two reflective mirrors. The movement of one of the reflective mirrors is monitored by a servomotor in order to control the light path-length and then creates an optical interference between the two divided light beams, which generates a specific interferogram [126]. The sample handling system depends mainly on the analyzed sample types (solid, liquid or gaseous) and their quantities. When a microscope is coupled to an FTIR spectrometer as a sample handling system, it can be used in polymer, fiber, pharmaceuticals, semiconductors, biochemistry, and chemical analysis [228]. The main advantage of the microscope resides in the fact that it can be used for the analyses of a small sample droplet and evaluate its composition and molecular distribution. In this case, the microscope requires a sample handling support (SHS) to hold the sample droplet.

Recently, we have used a microscope-FTIR setup with a standard SHS made of a total reflective mirror (TRM) to perform a quantitative and a qualitative detection of sugars in artificial solutions. However, these solutions contain an important quantity of water which is opaque in the Mid-IR region. Thus, water solvent must be replaced with other liquid or evaporated. Unfortunately, most solvents that transmit in this region of wavelengths are toxic and have a very low solubility such as methanol [229]. Though water evaporation is more suitable for sugar detection in aqueous solution. Despite the solvent evaporation, it was observed that the sugar sample is not uniformly deposited on the TRM. To address this problem, and enhance repeatability of the analysis, we designed a new SHS.

In this paper, a new microfluidic device for microscope-FTIR based sugar sensing in Mid-IR is presented. The main advantage of the designed microfluidic device is its ability to generate a uniform thin layers of sugar from a liquid sample. The proposed experimental setup used for

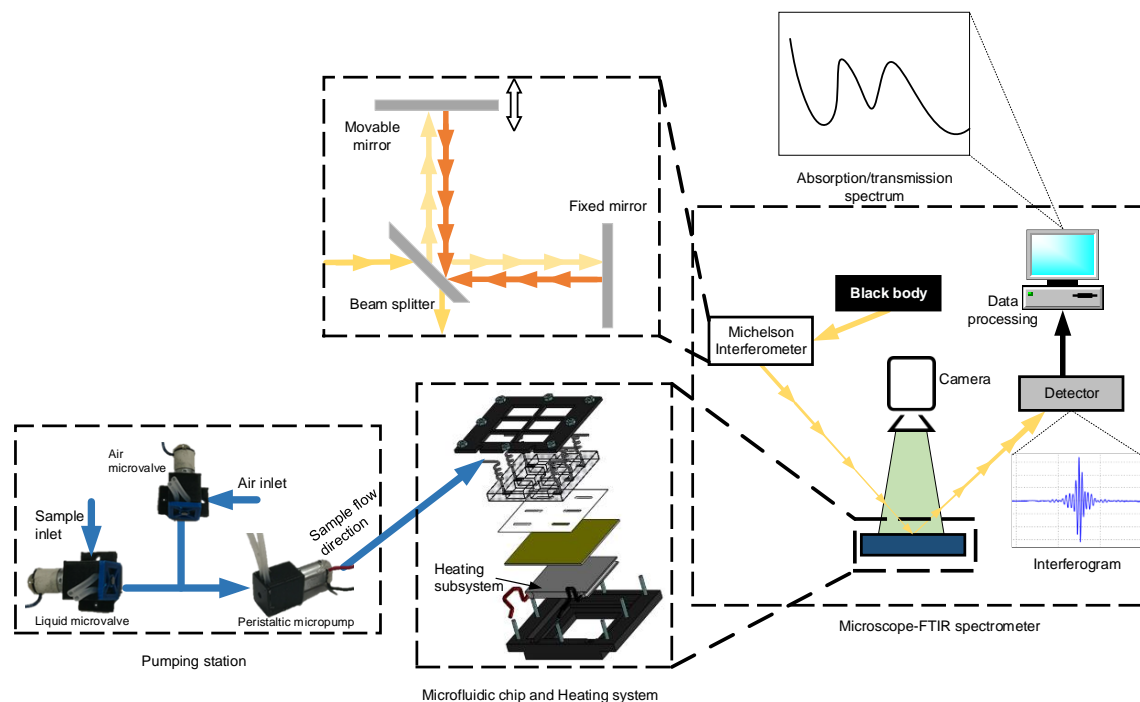


FIGURE 3.1 – Schematic representation of the working principle of the proposed technique for sugar detection coupled to the developed microfluidic chip for sampling and sample handling and temperature control.

sugar detection is shown in Figure 3.1. It consists of 3 main parts : (1) pumping subsystems (2) microscope-FTIR spectrometer, and (3) microfluidic chip with a heating system.

This paper is organized as follows, Section 3.4 describes the developed system for sugar detection and its different components, the experimental setup for sugar detection is presented in Section 3.5. Finally the results of several analyzed samples of synthetic Glucose, Fructose and Sucrose are reported and discussed in Section 3.6.

3.4 Microfluidic System Description

When we use the standard SHS for sugar detection, a droplet sample is deposited on the gold surface of the TRM using a micro-pipette. The solvent is then evaporated naturally, and consequently a non-uniform sugar layer is deposited on the TRM surface. The main disadvantages of this setup are : (i) the sugars are not deposited in the same position where the optical detector is calibrated, i.e., where the image background was acquired ; (ii) the time needed to evaporate the solvent is very long (more than 30 min) , which leads to a non-uniform distribution of sugar molecules density inside the droplet because of the gravity force, and surface tension that attracts molecules to the edges of the droplet. Figure 3.2a,b shows how sugars are deposited using the standard SHS, and the molecular distribution in the

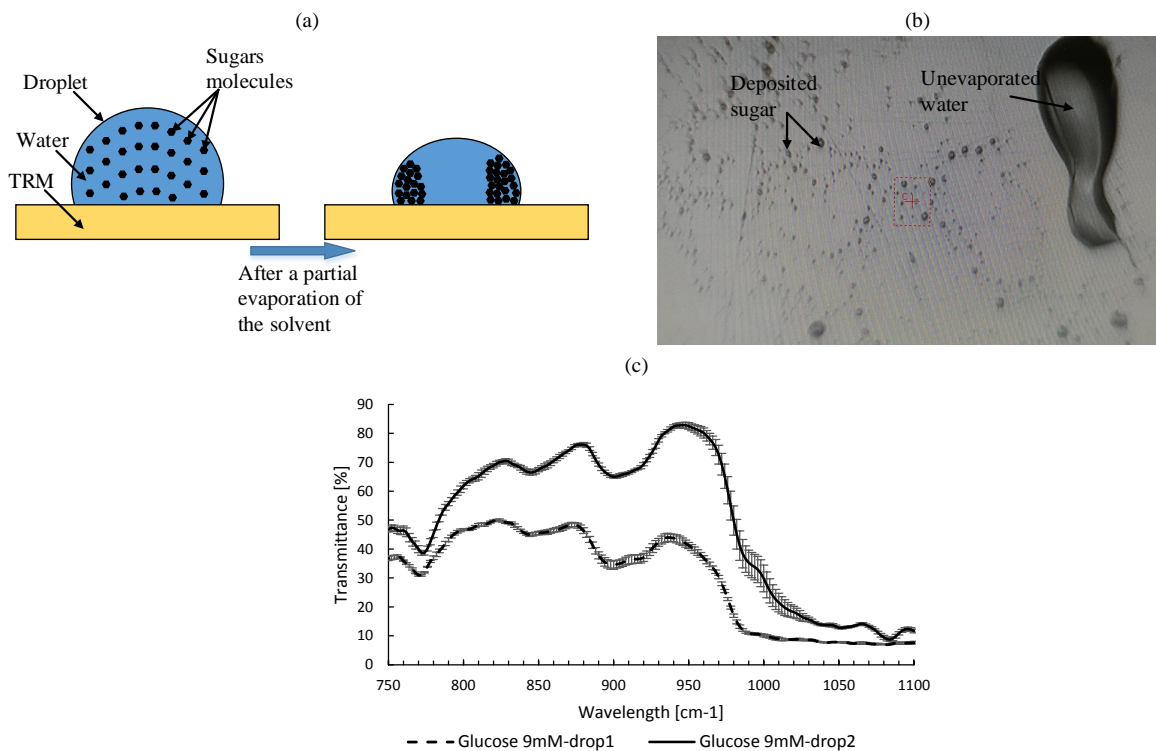


FIGURE 3.2 – (a) Schematic representation of the difference between the molecular distribution in the droplet before and during the solvent evaporation using the standard SHS. (b) Deposited sugar on a standard SHS after water evaporation. (c) Two recorded absorption spectrum of two sugar samples taken from the same sugar solution.

droplet during the solvent evaporation, respectively. In the case of a non-uniform distribution, two samples with the same concentration were analyzed with the standard TRM, and a high deviation (from 41.6% to 224.6% depending on the wavelength) is observed between the two spectra as shown in Figure 3.2c. Thus, the recorded absorption spectra are not reproducible, and the results of analysis are not reliable though.

To overcome this problem and to achieve a better and uniform sugar distribution layer, the liquid sample is injected using a pseudo-continuous flow device into the analysis area. Then, the solvent is evaporated and a thin layer of sugar is deposited on the analysis area. The functional diagram of the entire device is shown in Figure 3.3a. The developed SHS includes a subsystem to heat the analysis area, a microfluidic chip which is made with a TRM, a Polydimethylsiloxane (PDMS) chamber for liquid confinement, and a hydrophobic vinyl layer. Flow control is achieved through a designed pumping station controlled by an electronic unit.

The TRM is designed and fabricated in our laboratory by a deposition of a thin gold layer with a thickness of 150 nm on the upper surface of a 50 mm × 50 mm glass slide, using a physical evaporation technique. This gold layer ensures a highly reflective surface of the TRM. The latter was cleaned in an ultrasonic bath with acetone in order to remove any

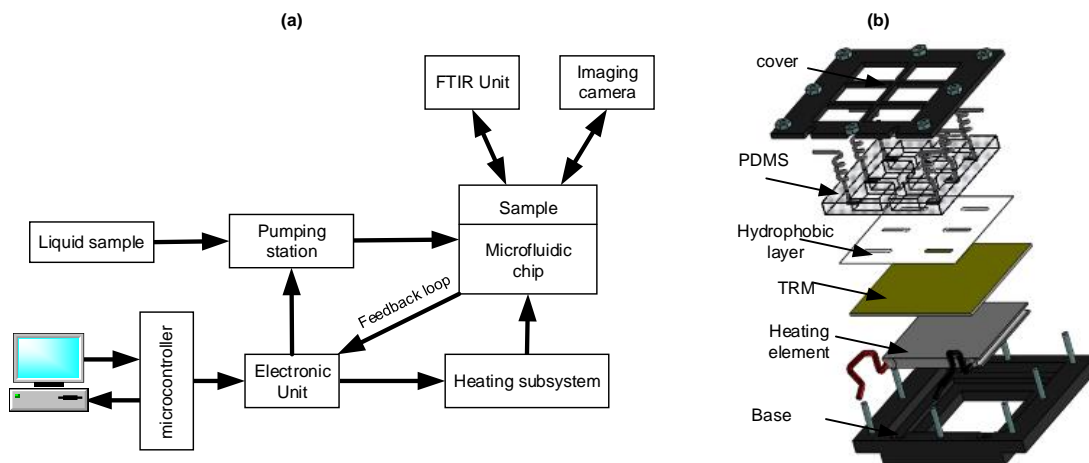


FIGURE 3.3 – (a) Functional diagram of the entire system. (b) Microfluidic chip with heating subsystem.

residual contamination on the gold surface. A separate $50\ \mu\text{m}$ vinyl layer is treated with a hydrophobic spray (Ultrahydrophobic Spray, Waterbeader, Dalton, GA, USA), and then glued on the gold surface (the upper face of the TRM). Circular spots with rectangular fluidic open micro-channels are designed on the vinyl layer to form the analysis area, and to control the flow direction, respectively. The surface treatment of the vinyl layer is performed to ensure that the injected sample remains in the analysis area, and no overflow of liquid will take place. Finally, a PDMS substrate with square chambers is mounted on the top of the vinyl hydrophobic layer to (i) separate each analysis site in order to eliminate the risk of cross contamination between nearby analysis area, (ii) to ensure microfluidic connections, and (iii) to guide the liquid and airflow through a printed micro-channels on its lower side.

The sample injection is ensured by a pumping unit which consists of a peristaltic micropump and two microvalves as shown in Figure 3.4a. To avoid overflow of the liquid during injection, the micropump flow rate was set to $0.43\ \text{mL}/\text{min}$. Indeed, with a higher flow rate, the liquid can quickly leave the open micro-channels. Microvalves were used to control the quantity of injected liquid. $120\ \mu\text{L}$ of each analyzed sample is injected in a separate hydrophilic site. The volume of injected sample is controlled through the opening duration of the liquid-microvalve (an opening of $17\ \text{s}$ is needed to generate a volume sample of $120\ \mu\text{L}$). Once the hydrophilic spot is filled, the liquid-microvalve is closed and the air-microvalve is open. Then, the micropump generates a continuous and a constant air flow rate through the micro-channel until the solvent reaches the hydrophilic spot (analysis area), where a sugar layer is deposited after solvent evaporation. The air injection into the microfluidic chip is a very important step, otherwise no sugar layer will be deposited in the analysis area due to the PDMS chamber wall attraction of the liquid sample, and the sugar will be only deposited close to the walls of the PDMS micro-channel. Figure 3.4b shows the different steps of the sample-handling process.

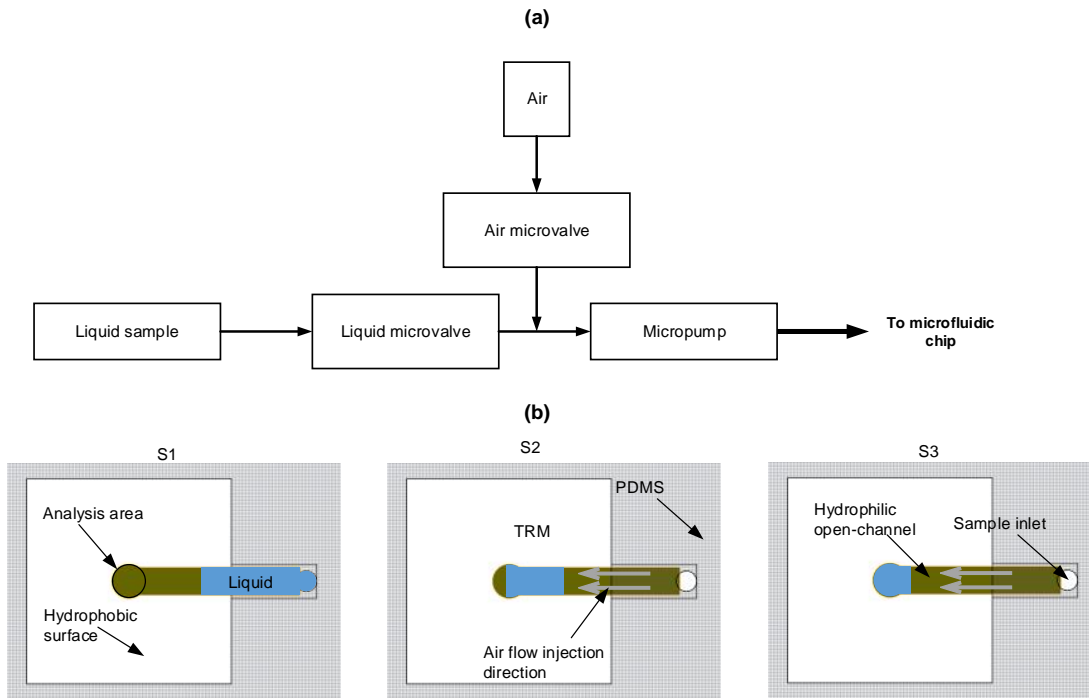


FIGURE 3.4 – (a) Pumping unit diagram. (b) Microfluidic sample handling steps : (S1) is the initial step where the liquid is injected ; (S2) is the second step where the liquid is sampled by air injection ; and (S3) is the last step where air is continuously injected to keep the liquid far from the PDMS chamber walls during the solvent evaporation.

The solvent evaporation is ensured by a heating subsystem made with a 40 mm x 40 mm x 3.9 mm Peltier module (TEC1-12706, Hebeiltd, Shanghai, China) which was attached to the back side of the TRM using a thermal paste (ARCTIC, MX-4, Hong Kong, China) that guarantee the uniform propagation of the heat from the Peltier module to the TRM surface. The power consumption of the heating subsystem is 5 W which is sufficient to reach 80 °C on the TRM upper side.

The micropump, the microvalves and the Peltier modules are controlled by a unique electronic unit. It is essentially composed of a temperature sensor (LM35, Texas Instruments, Dallas, TX, USA) placed on the upper side of TRM for the feedback loop between the heating subsystem and the electronic control unit. A MOSFET transistor (VN2222, Microchip Technology, Chandler, AR, USA), and a relay (G5LA-1A4 DC5, Omron Electronics, Shiokoji Horikawa, Shimogyo-ku, Kyoto, Japan) are needed to turn ON/OFF the heating subsystem and monitor the pumping unit. They are also embedded in the electronic unit. A micro-controller (ATmega, ATMEL, San Jose, CA, USA), with a serial interface (RS232) to send/receive data to/from computers, is used to control the electronic unit, to monitor the developed device and to acquire the user configuration such as temperature and sample volume. In Figure 3.5 we show the entire experimental set up for sugar identification/quantification with the microscope

FTIR spectrometer coupled to the new designed microfluidic chip.

The TRM and the PDMS subtract are reused after a cleaning process. This process consists of the use of an ultrasonic bath with water and a beaker filled with ethanol. Then, the TRM and the PDMS subtracts are emerged for 30 min inside the bath. This cleaning method, shown in Figure 3.6, is used to remove all the residue of the sugars from the gold surface and PDMS chamber walls. In addition, the microfluidic tubing is cleaned by two successive injections of ethanol and deionized water respectively.

3.5 Experimental Procedure

In this section we describe our experimental procedure to detect and quantify sugars using our new SHS. Glucose (SIGMA-G8270, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA), Fructose (SIGMA-F2543, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA) and Sucrose (SIGMA-S7903, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA) sugars were used without any purification. Liquid solutions were prepared with different concentrations (1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM and 20 mM) for each sugar type using deionized water as a solvent. 120 μL of sugar sample is injected into the analysis area by the peristaltic micropump through the micro-channel. Then, the TRM surface

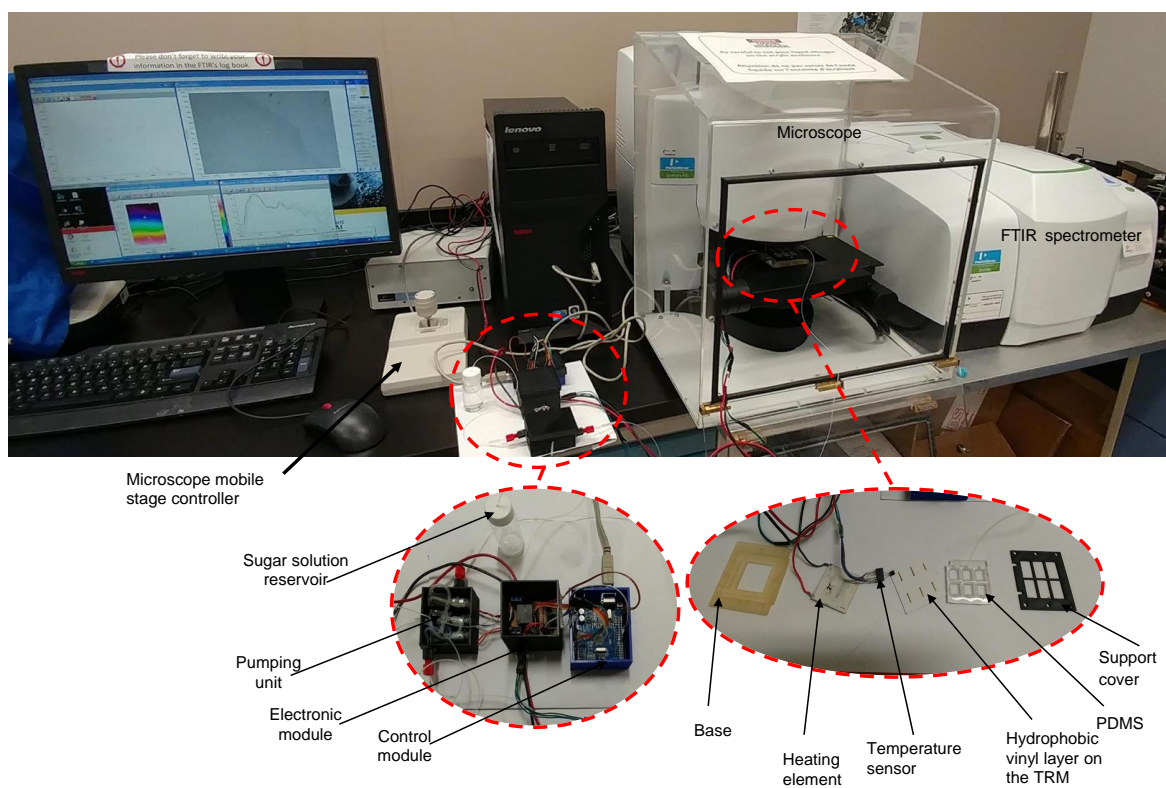


FIGURE 3.5 – Experimental setup for sugar identification and quantification based on a microscope-FTIR spectrometer with the new designed microfluidic device.

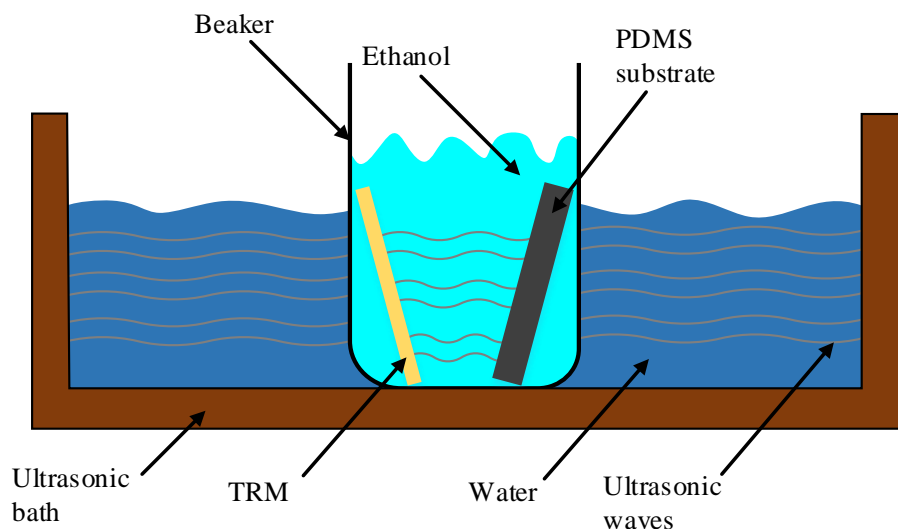


FIGURE 3.6 – Cleaning setup of the TRM and the PDMS substrate.

is heated with the Peltier module during 3 min to reach 80 °C. When the solvent is completely evaporated, a thin layer of sugar is deposited on the hydrophilic spot. Finally, this thin layer is cooled down during 5 min to reach 35 °C. The sugar identification and quantification are achieved based on their absorption spectra recorded using microscope-FTIR spectrometer (Spotlight 400 FT-IR Imaging System, Perkinelmer, Waltham, MI, USA) in the wavelengths range from 750 cm^{-1} to 1000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} and 32 scans average. First, a fixed Analysis Rectangle Zone (ARZ) ($43 \mu\text{m} \times 31.2 \mu\text{m}$) of the sugar layer is set by the users as shown in Figure 3.7a. Within the ARZ, the microscope scans 70 different sub-zones for each absorption wavelength. The displacement between different analyzed sub-zones is ensured by the mobile stage of the microscope with a resolution of 6.25 μm . Obtained results are reported in a 2D graph in Figure 3.7b,c. The 2D graph reflects the quality of the deposited sugar distribution in the ARZ. Prior to sample injection, the background absorption spectrum is recorded. It represents the measured intensity of absorbed light by the bare TRM gold surface that needs to be subtracted from all sugar spectra.

The final absorption spectrum of each sugar sample is an average over 4 spectra recorded at four different sub-zones of the ARZ. The sample analysis is repeated 3 times for each concentration in order to verify the repeatability of the results.

3.6 Results and Discussion

3.6.1 System Optimization

The major source of noise in our experiment comes from the possible interaction of the Mid-IR beam light with the surrounding materials (the vinyl layer and the PDMS chamber walls) before it reaches the deposited sugar. To minimize this interaction, the PDMS chamber and

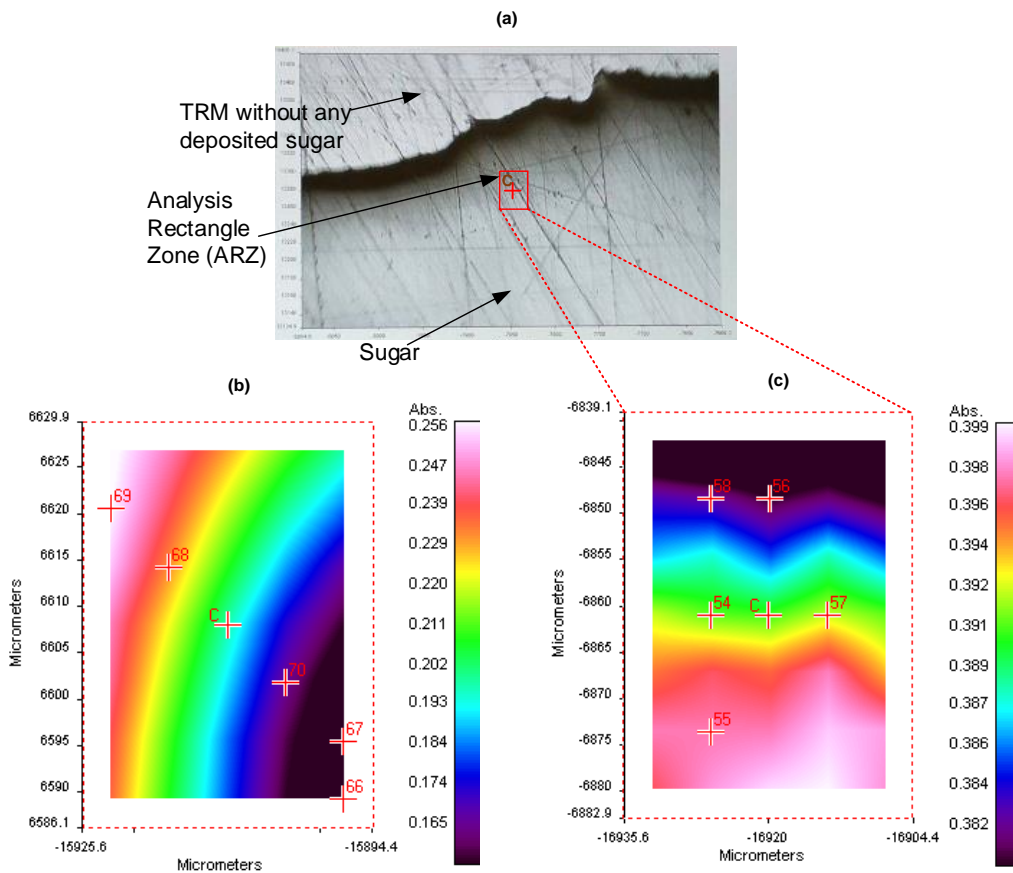


FIGURE 3.7 – (a) Sugar layer deposited on the hydrophilic surface of the TRM. The 2D graphs of sugar absorption obtained in the ARZ using (b) the classical TRM , and (c) the new microfluidic device. The variation of the absorption intensity is shown in the right column for each 2D graph.

the hydrophilic spot must be large enough so that the beam reflection occurs only on the TRM without any interaction with neither the PDMS chamber walls nor the spot edges. Therefore, an optimization of the architecture of the microfluidic system is required to reduce the noise effect. Several spots of the hydrophobic vinyl layer with different diameters (0.5 mm, 1 mm, 2 mm and 3 mm) were designed. The obtained results show that for a spot diameter less than 2 mm the absorption spectrum of sugar is indistinguishable from noise, i.e., Glucose peaks are not clearly identified, for example. Using the optimized spot size (2 mm) of the vinyl layer, 32 different PDMS chambers with different heights (4 mm, 6 mm, 8 mm and 10 mm) and width (5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 10 mm, 11 mm, 13 mm and 15 mm) were fabricated and tested as shown in Figure 3.8. In this figure, it can be seen that the dimensions are interdependent. Indeed, an increase in the chamber height must be compensated by an increase in its width in order to eliminate the interaction between the beam of light and the PDMS chamber walls. As shown in Figure 3.8, depending on the height-width of PDMS chamber, three zones are identified : (1) An opaque zone where sugar peaks cannot be identified ; (2) a bright zone

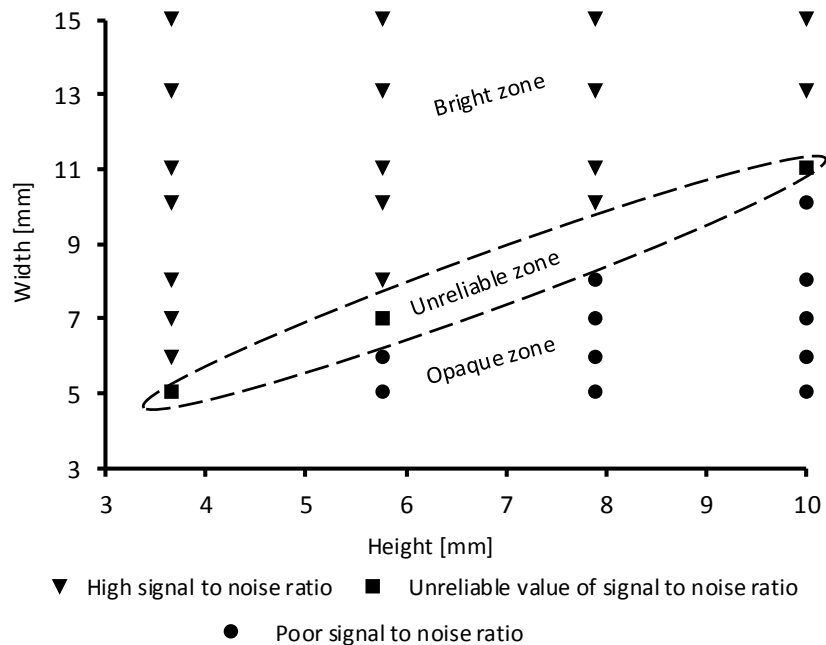


FIGURE 3.8 – Tested height-width combination of the PDMS chambers. Three zones are identified : Bright, opaque and unreliable zones.

where sugar can be well identified and quantified; finally (3) an unreliable zone where the recorded absorption spectrum of sugar is not reproducible within the same ARZ for the same concentration of sugar. Based on this study, the minimum dimension of the PDMS chamber corresponds to 6 mm width and 4 mm height.

In the case of our experiment, the dimensions of the microfluidic device were fixed to 2 mm for hydrophilic spot diameter and 12 mm \times 4 mm for the width \times the height of the PDMS chamber.

Sugar distribution profiles were acquired using the standard SHS and the designed microfluidic chip mounted separately on the microscope-FTIR setup. Based on the results reported in Figure 3.7b, a variation of 43.23% of the absorption intensity is measured within the ARZ using the standard SHS. This high variation is due to the non-uniform profile of the sugar distribution. But, as it can be seen in Figure 3.7c, the variation of the absorption intensity using our designed system is 10 times smaller (4.35%) than the standard one, which proves that the designed microfluidic chip provides a better uniformity of the distribution of the deposited sugar.

3.6.2 Qualitative Detection

The absorption spectra of Glucose, Fructose and Sucrose are recorded for different concentrations, and reported in Figure 3.9 as a transmitted signal (transmittance %). The obtained

TABLE 3.1 – Absorption peak signatures (fingerprint) of Glucose, Fructose, and Sucrose, the line-width of each characteristic peak and sugars LOD of microscope-FTIR spectroscopy coupled to our designed microfluidic chip.

Sugars Type	Peak Position (cm ⁻¹)	Reported Peaks Positions ** (cm ⁻¹)	Position Error (cm ⁻¹)	L-W (cm ⁻¹)	LOD (mM)
Glucose	774 (P_{G1})	776	3	22	3
	834 (P_{G2})	836	4	Weak	
	910 (P_{G3})	915	6	40	
Fructose	784 (P_{F1})	780	2	27	3
	818 (P_{F2})	818	2	25	
	870 (P_{F3})	873	3	32	
	924 (P_{F4})	923	4	Weak and Dif-fuse	
	978 (P_{F5})	977	2	35	
Sucrose	832 (P_{S1})	834	7	Blend *	1
	868 (P_{S2})	869	7	Blend *	
	922 (P_{S3})	924	3	38	
	992 (P_{S4})	994	6	Blend *	

* Absorption peak is so large causing an overlap between close peaks.

** Reported values in [229, 230].

absorption spectra for each sugar are in a good agreement with the literature [229, 230]. In Figure 3.9a, Glucose fingerprint is composed of three absorption peaks located at 774 cm⁻¹ (P_{G1}), 834 cm⁻¹ (P_{G2}) and 910 cm⁻¹ (P_{G3}). In the case of the Fructose, as it is shown in Figure 3.9b, the obtained absorption spectrum contains five different peaks detected at 784 cm⁻¹ (P_{F1}), 818 cm⁻¹ (P_{F2}), 870 cm⁻¹ (P_{F3}), 924 cm⁻¹ (P_{F4}) and 978 cm⁻¹ (P_{F5}). For the Sucrose, the absorption spectrum shown in Figure 3.9c has four peaks, measured at 832 cm⁻¹ (P_{S1}), 868 cm⁻¹ (P_{S2}), 922 cm⁻¹ (P_{S3}) and 992 cm⁻¹ (P_{S4}). However, the peak at 832 cm⁻¹ was not observed in literature [229]. Therefore, it could be related to an impurity or other interfering molecule in our Sucrose sample. Thus, this peak will not be used for Sucrose identification/quantification.

Based on the unsaturated absorption spectrum reported in Figure 3.9, we have measured for each absorption peak the corresponding line-width (L-W), which is defined as the full width at half maximum. Obtained results are summarized in Table 3.1.

Based on our experiments, we have investigated the LOD for each sugar. This LOD represents the minimum sugar concentration that can be detected with our proposed detection system. Below this LOD threshold, the deposited sugar layer on the analysis hydrophilic spot after evaporation is not sufficient enough to provide an absorption spectrum for a sugar identification and quantification. The LOD obtained in this work is 3 mM for both, Glucose and Fructose and 1 mM for Sucrose.

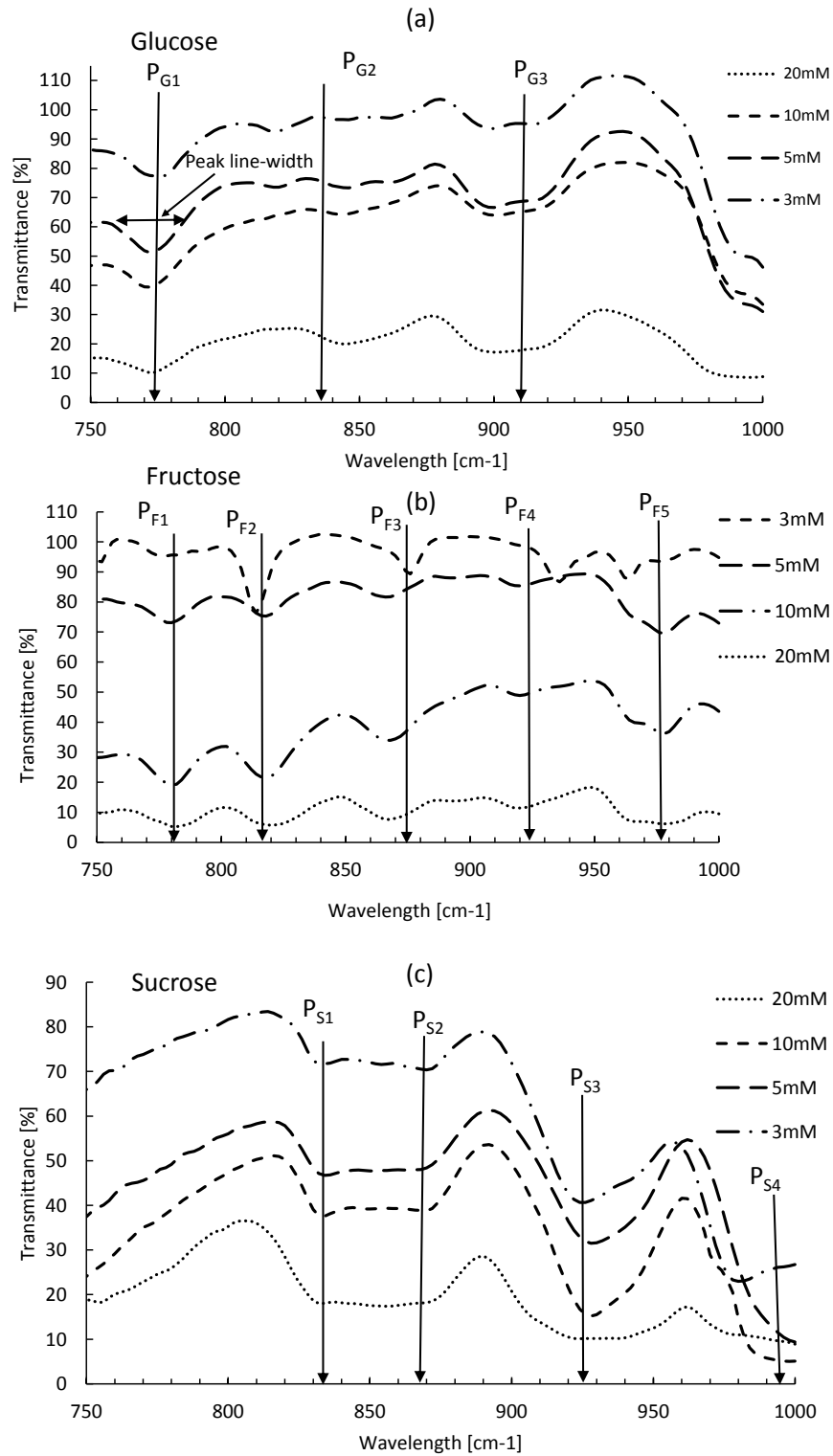


FIGURE 3.9 – Transmission spectra for different sugar types at different concentrations. (a) Glucose spectra; (b) Fructose spectra; (c) Sucrose spectra.

3.6.3 System Calibration and Quantitative Analysis

An empirical method was developed to calibrate the new developed system and perform quantitative detection of different sugars. It is based on the relation between the peak absorption intensity and the sugar concentration. Several curves were plotted for each sugar molecule, reporting the sugar concentration as a function of the absorption intensity for each detected peak. Quadratic and linear equations are used to fit the data. The best fit is obtained for the highest R^2 . For all sugars, the results of quadratic and linear fitting parameters are reported in Tables 3.2 and 3.3, respectively. The empirical calibration equations are selected based on two criteria : (1) the absorption peak must be well isolated, not saturated, with the narrowest line-width ; (2) the R^2 coefficient must be the highest one among the others (ideally close to 1). For all sugar concentrations, the reported absorption intensity is the average value over the absorption intensities of three tested samples. Though for each reported intensity value, an error bar is drawn on the plotted curve, which corresponds to the standard deviation (σ).

Glucose Calibration Equation

As shown in Figure 3.10, for most Glucose absorption peaks, both linear and quadratic equations fit well the variation trends with a high R^2 coefficients. While the linear fit is expected to give a better prediction of the variation of the concentration as a function of the absorption intensity compared to the quadratic fit, the results of analysis listed in Tables 3.2 and 3.3, show that the quadratic fit is better than the linear fit based on the R^2 coefficients. A possible explanation of this result could be related to the uniformity of the sugar layers formed on the TRM surface, which could be locally inhomogeneous though. Consequently, the quadratic parameters are used to determine the calibration equation. If we consider only the second criteria, Glucose concentration can be extracted from any one of its four representative peaks. Although the peak located at 834 cm^{-1} has the highest R^2 coefficient (see Table 3.3), its line-width is very broad though for all concentrations lower than 20 mM . Consequently, it cannot be used for Glucose quantification based on the first criteria. From this study, the absorption peak located at 774 cm^{-1} (L-W = 22 cm^{-1} and $R^2 = 0.9864$) is the one that fulfills the two criteria conditions, and thus it is selected as the most relevant peak.

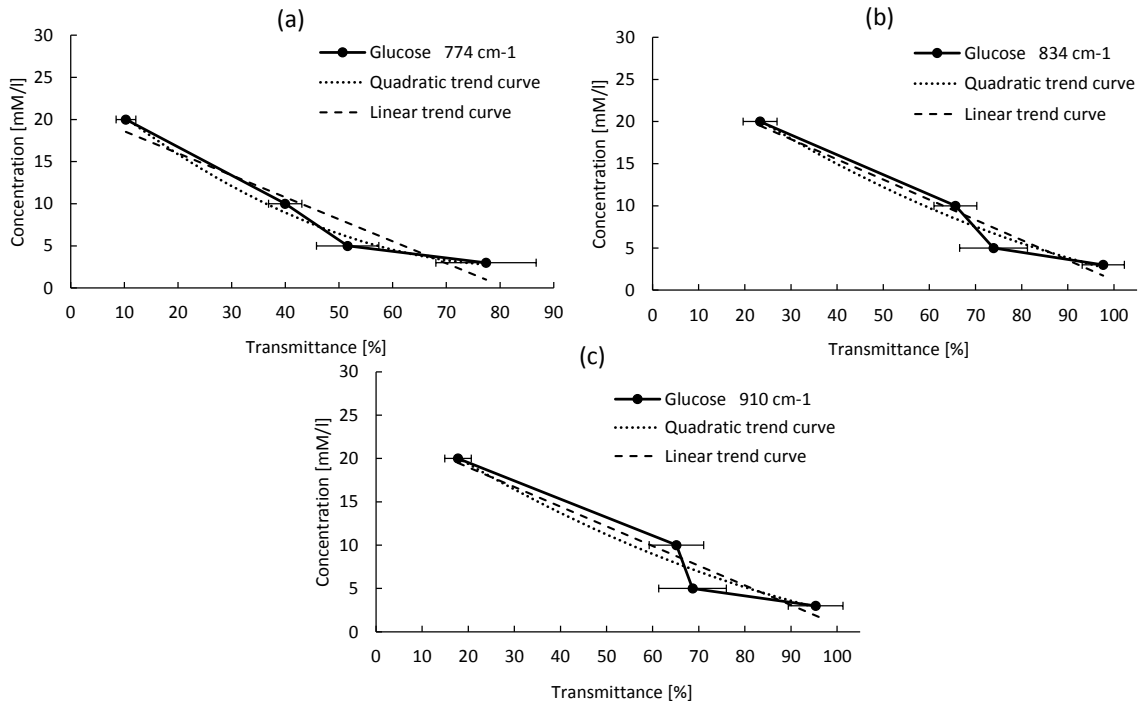


FIGURE 3.10 – Glucose absorption intensity versus its concentration for different peaks, for the absorption peaks at (a) 774 cm^{-1} , (b) 834 cm^{-1} , (c) 910 cm^{-1} .

Fructose Calibration Equation

For the five absorption peaks of Fructose, the quadratic and linear fits are shown in Figure 3.11. From this figure, the variation trends are well predicted with the first and second order equations for only the peak located at 818 cm^{-1} (P_{F2}), versus the other peaks. However, like in the case of Glucose analysis, based on the R^2 coefficient values listed in Tables 3.2 and 3.3, the quadratic equation has a better prediction of the concentration variation as a function of the absorption intensity for the peak located at 818 cm^{-1} in comparison to the linear fit. Based on the selection criteria of representative peaks, this peak is the one that fulfills these conditions because it has the narrowest L-W = 25 cm^{-1} , and a very high $R^2 = 0.9495$ coefficient.

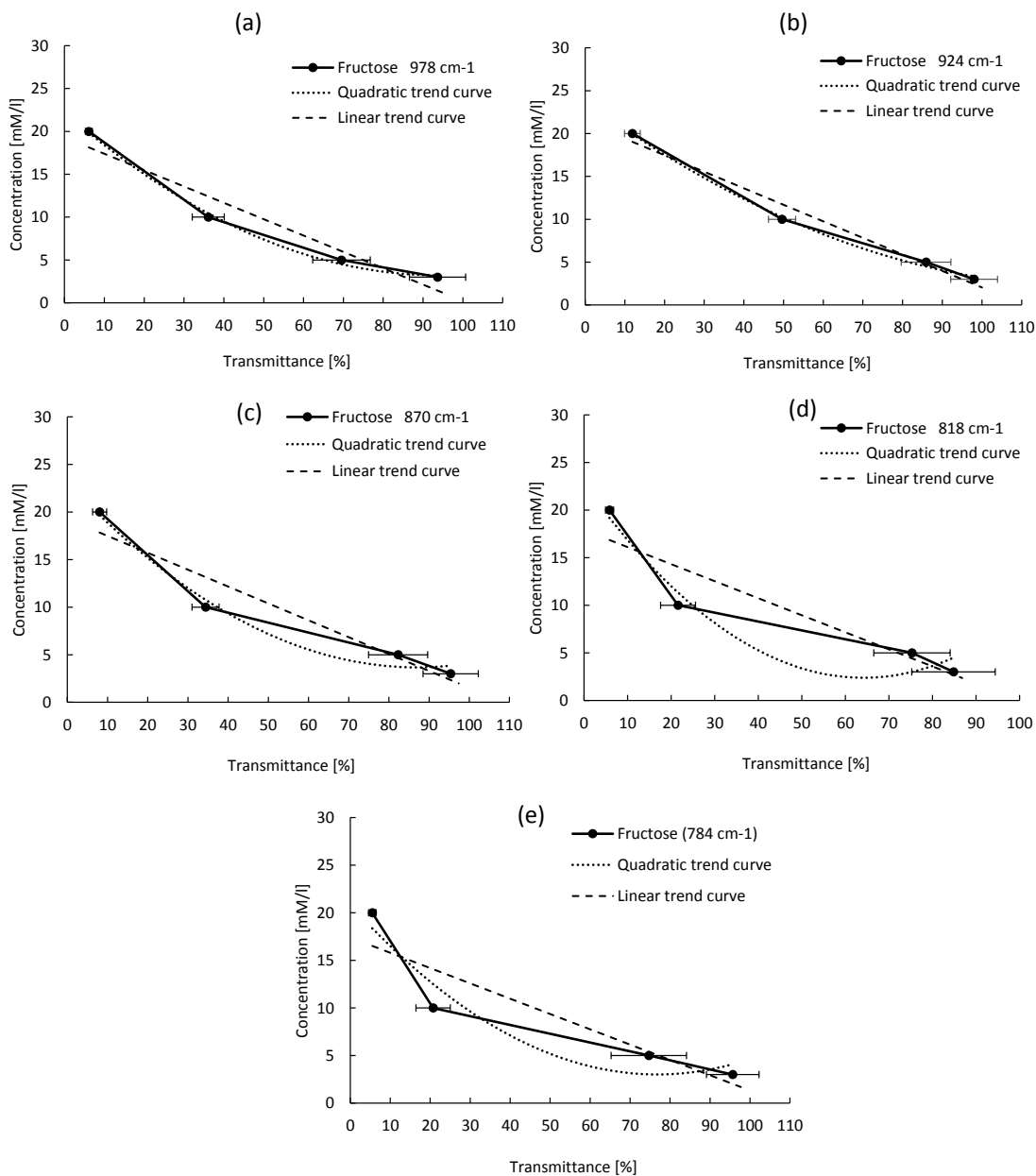


FIGURE 3.11 – Fructose absorption intensity as a function of its concentration for different peaks, for the absorption peaks at (a) 978 cm⁻¹, (b) 924 cm⁻¹, (c) 870 cm⁻¹, (d) 818 cm⁻¹, (e) 784 cm⁻¹.

Sucrose Calibration Equation

Finally, for Sucrose, we found that the quadratic equation has a better fitting of the variation trends, like in the case of Glucose and Fructose. Obtained results are reported in Figure 3.12. From this analysis and based on the same criteria described in Section 3.6.3, the peak located at 922 cm⁻¹ (P_{S3}) is chosen to quantify Sucrose. This peak has the higher R^2 coefficient (0.9796) and a narrower L-W (38 cm⁻¹) compared to other peaks shown in Figure 3.12.

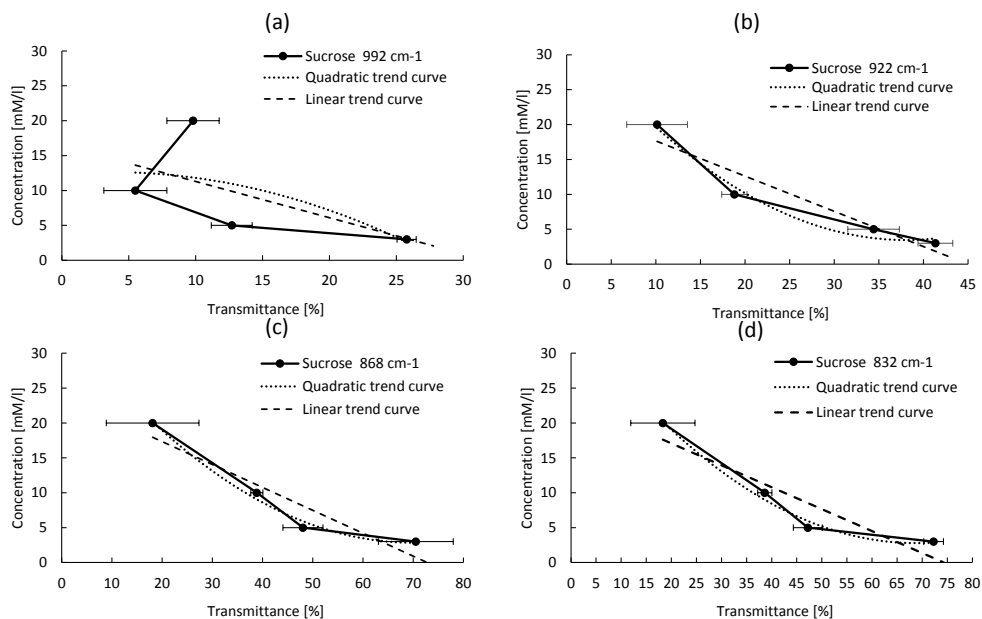


FIGURE 3.12 – Sucrose absorption intensity versus its concentration for different peaks, for the absorption peaks at (a) 992 cm^{-1} , (b) 922 cm^{-1} , (c) 868 cm^{-1} , (d) 832 cm^{-1} .

After calibrating the detection setup, and in order to validate sugar quantification with the proposed system, Glucose, Fructose and Sucrose sugar solutions with unknown concentration were analyzed. Their absorption spectrum was recorded as described above, and the concentration is calculated from the absorption intensities of their characteristic peaks using the empirical equations, and results are listed in Table 3.2. From this table, two Glucose sugar concentrations were calculated at 6.64 mM and 14.80 mM , while the initial concentration was 7 mM and 15 mM , which corresponds to an identification error of 5.1% and 1.3% , respectively. In the case of Fructose, the identification errors of two sugar concentrations were calculated at 1.41% and 1.68% , while the identification errors of two Sucrose concentrations were calculated at 7.9% and 3.3% . The quantification of sugar concentrations using the linear fit has led to a higher identification error as shown in Table 3.3, which confirms that the quadratic analysis provides promising results using our system.

TABLE 3.2 – Absorption peaks characteristics and quantification results of unknown solution concentration based on quadratic equation.

Sugars Type	Peaks Positions (cm^{-1})	Empirical Function	R^2	Measured Trans- mission Inten- sity (%)	Calculated Concen- tration (mM)	Real Concen- tration (mM)	Quantification Error (%)
Glucose	774 (P_{G1})	$[C] = 0.003T^2 - 0.537T + 25.353$	0.9864	49.300	6.644	7	5.1
				22.690	14.808	15	1.3
	834 (P_{G2})	$[C] = 0.001T^2 - 0.388T + 28.470$	0.9686	77.960	6.076	7	13.2
Glucose	910 (P_{G3})	$[C] = 0.001T^2 - 0.351T + 25.940$	0.9462	40.945	14.738	15	1.7
				78.216	5.200	7	25.7
				24.416	18.021	15	20.1
Fructose	784 (P_{F1})	$[C] = 0.003T^2 - 0.463T + 20.833$	0.9187	35.199	8.221	7	17.4
				15.100	14.512	15	3.2
	818 (P_{F2})	$[C] = 0.005T^2 - 0.633T + 22.704$	0.9495	33.093	7.099	7	1.41
Fructose	870 (P_{F3})	$[C] = 0.002T^2 - 0.4457T + 23.065$	0.9804	20.458	15.034	7	11.4
				40.426	9.296	15	38
	924 (P_{F4})	$[C] = 0.001T^2 - 0.337T + 23.76$	0.9974	45.789	11.031	7	57.6
				23.81	16.461	15	9.741
	978 (P_{F5})	$[C] = 0.002T^2 - 0.404T + 22.237$	0.9971	31.523	11.572	7	65.3
				2.881	21.088	15	40.6
Sucrose	832 (P_{S1})	$[C] = 0.006T^2 - 0.941T + 35.134$	0.9886	39.063	8.732	7	24.7
				35.090	10.466	15	30.2
	868 (P_{S2})	$[C] = 0.006T^2 - 0.904T + 34.431$	0.9897	41.083	8.234	7	17.6
Sucrose				33.482	11.426	15	23.8
	922 (P_{S3})	$[C] = 0.020T^2 - 1.566T + 33.262$	0.9796	23.976	7.555	7	7.9
				14.902	14.498	15	3.3
	992 (P_{S4})	$[C] = -0.020T^2 + 0.148T + 12.366$	0.3727	7.765	12.285	7	75.5
				5.623	12.554	15	16.3

TABLE 3.3 – Absorption peaks characteristics and quantification results of unknown solution concentration based on linear equation.

Sugars Type	Peaks Positions (cm^{-1})	Empirical Function	R^2	Measured Transmission (%)	Calculated Concentration (mM)	Real Concentration (mM)	Quantification Error (%)
Glucose	774 (P_{G1})	$[C] = -0.2614T + 21.212$	0.9175	49.3	8.325	7	18.9
	834 (P_{G2})	$[C] = -0.2391T + 25.07$	0.9534	22.69	15.281	15	1.9
	910 (P_{G3})	$[C] = -0.2273T + 23.532$	0.9321	77.96	6.429	7	8.2
Fructose	784 (P_{F1})	$[C] = -0.160T + 17.408$	0.827	40.945	15.28	15	1.9
	818 (P_{F2})	$[C] = -0.179T + 17.889$	0.8461	78.216	5.753	7	17.8
	870 (P_{F3})	$[C] = -0.177T + 19.26$	0.912	24.416	17.982	15	19.9
	924 (P_{F4})	$[C] = -0.192T + 21.337$	0.974	35.199	11.744	7	67.7
	978 (P_{F5})	$[C] = -0.190T + 19.296$	0.925	15.1	14.978	15	0.14
Sucrose	832 (P_{S1})	$[C] = -0.3141T + 23.354$	0.8544	33.93	11.965	7	70.9
	868 (P_{S2})	$[C] = -0.3283T + 23.906$	0.8824	13.81	15.547	15	3.6
	922 (P_{S3})	$[C] = -0.5049T + 22.716$	0.898	20.458	15.629	7	123.2
	992 (P_{S4})	$[C] = -0.5192T + 16.479$	0.3569	40.426	12.084	15	19.4
				45.789	12.504	7	78.6
				23.81	16.744	15	11.6
				31.523	13.281	7	89.7
				2.881	18.746	15	24.9
				39.063	11.084	7	58.3
				35.09	12.33	15	17.8
				41.083	10.418	7	48.8
				33.482	12.914	15	13.9
				23.976	10.610	7	51.6
				14.902	15.192	15	1.3
				7.765	12.447	7	77.8
				5.623	13.559	15	9.6

Discussion

Microscope-FTIR spectrometer is a well established qualitative measurement technique [228]. However, using the standard microscope-FTIR for measurements without our SHS did not allow a reliable quantitative measurement. This is mainly due to the non-uniformity of the collected data when a manual liquid handling approach is used (pipette). Indeed, as shown in Figure 3.7, the non-uniformity of the analyzed samples is improved from 43.23% to 4.35% with our proposed SHS. Technically speaking, it is not possible to control the liquid distribution uniformity manually. Indeed, with our SHS, we control the liquid sample shape and volume because the designed hydrophobic surface pushes the molecules to be confined in the sampling region only. Also the microfluidic system ensures a very accurate volume control as we are using peristaltic micropump with optimized motor for accurate microfluidic control. The final objective is to reach a linear approximation between the absorption intensity and the concentration at a well defined absorption peak of sugar to establish a standard curve in order to estimate sugars concentration. However, the linear approximation does not allow precise estimation of the concentration as shown in Table 3.3 compared to quadratic approximation. For example, using our quadratic approximation approach, the maximal error in Glucose is 5.1% at 774 cm^{-1} wavelength while it is 18.9% with linear approximation.

Consequently, our work is mainly focused on the automation of the system and automated sugar identification. Also, our proposed system addressed sample non-uniformity issue to quantify the sugar concentration. It is worth noting that the achieved LOD in this study is mainly related to the microscope-FTIR itself which is a commercial system. Therefore, in this work our main interest is to ensure a reliability of the results as the approach is dedicated for food industry. One of the main challenges in this industry is how to provide a reliable analysis technique. Thus, the uniformity of the deposited thin layer of sugar is very critical in this case of study.

Finally, the system at this stage assumes that the liquid solution has been pretreated so that it contains only one type of sugar, thus, presented results are limited to homogeneous solution.

3.7 Conclusions

In this paper, a microscope-FTIR spectrometer was used for Glucose, Fructose and Sucrose detection in Mid-IR using a new microfluidic system for sample handling. The system is mainly composed of a liquid sampling and sample handling device with a heating subsystem to evaporate the solvent of the liquid sample. A hydrophobic layer and a PDMS chamber were also used to ensure a uniform sample distribution of deposited sugar sample on the analysis area after water evaporation. The main objective of our developed system is to enhance the sugar detection repeatability using the microscope-FTIR and consequently, to identify and quantify sugar types in aqueous solution. With the new microfluidic system, we have

demonstrated that the variation on the absorption intensity of sugar molecules in the layers did not exceed 5%, while it goes further than 30% with a conventional setup. This small variation is directly related to the uniformity of the molecular distribution in the thin sugar layers. This uniformity was achieved by two approaches : (1) a controlled pseudo-continuous flow of the injected sample injected into the analysis area ; and (2) a uniform evaporation of the solvent to form an homogeneous sugar layers. We also developed an empirical method to calibrate our experimental set up, and to estimate the concentration of different sugars. This method is based on a quadratic fit of the variation of the absorption intensity as a function of the concentration for Glucose, Fructose, and Sucrose. We observed that the quadratic fit reproduces the variation trends for the three sugars in a better way. Using our system, we were able to quantify an unknown sugar concentration with a maximum error of 5.1% for Glucose, 1.68% for Fructose, and 7.9% for Sucrose.

Chapitre 4

Microscope-FTIR Spectrometry Based Sensor for Neurotransmitters Detection

4.1 Résumé

Dans ce travail, nous présentons une nouvelle approche de détection des échantillons aqueux basée sur le spectromètre microscope-FTIR et appliquée aux neurotransmetteurs. Notre contribution dans ce travail consiste en un nouveau système de manipulation d'échantillons pour le microscope-spectromètre FTIR. Le nouveau système est basé sur un miroir réfléchissant total, une couche hydrophobe chauffée pour l'élimination/l'évaporation du solvant et pour le confinement de l'échantillon et un système microfluidique qui gère l'injection d'échantillon. De plus, une autre partie de notre contribution consiste à proposer un nouvel algorithme pour extraire la composition moléculaire de la solution avec des ratios d'estimation élevés et basé sur l'analyse des pics détectés sur les spectres IR. Les données acquises à partir du spectromètre microscope-FTIR ont été analysées par un algorithme nouvellement développé pour identifier chaque neurotransmetteur dans des solutions homogènes et hétérogènes avec une sélectivité élevée. Nous avons utilisé six molécules de neurotransmetteurs (dopamine hydrochloride, L-ascorbic acid, acetylcholine chloride, γ -aminobutyric, glycine and L-glutamic acid). Les résultats obtenus en utilisant l'algorithme développé ont montré qu'en utilisant le nouveau système, les six neurotransmetteurs peuvent être identifiés dans des solutions homogènes et hétérogènes avec un taux d'estimation de la présence moléculaire de 88,8% -100% pour la dopamine hydrochloride, 80% -100% pour le L- acide ascorbique, 75% -100% pour l'acetylcholine chloride, 75% -100% pour la L-glutamic acid, 77,7% -100% pour la γ -aminobutyrique et 75% -100% pour la glycine.

4.2 Abstract

In this work, we present a new sensing approach for aqueous samples based on the microscope-FTIR spectrometer and applied for neurotransmitters. Our contribution in this work consists of a new sample handling system for the microscope-FTIR spectrometer based on a total reflective mirror, a heated hydrophobic layer for solvent removal/evaporation and sample confinement and a microfluidic system that handles sample injection unlike standard sample handling system which was based only on a total reflective mirror. In addition, another part of our contribution consists of proposing a new algorithm to extract molecular composition of the solution with high estimation ratios and based on the analysis of detected peaks on IR spectra. The data acquired from the microscope-FTIR spectrometer was analyzed by a newly developed algorithm to identify each neurotransmitter in homogeneous and non-homogeneous solutions with high selectivity. We used six neurotransmitter molecules (Dopamine hydrochloride, L-Ascorbic acid, Acetylcholine chloride, γ -Aminobutyric, Glycine and L-Glutamic acid). The results obtained based on the algorithm developed showed that, using the new system, the six neurotransmitters can be identified in homogeneous and mixture solutions with an estimation ratio range of 88.8%-100% for Dopamine hydrochloride, 80%-100% for L-Ascorbic acid, 75%-100% for Acetylcholine chloride, 75%-100% for L-Glutamic, 77.7%-100% for γ -Aminobutyric and 75%-100% for Glycine.

4.3 Introduction

One of the fundamental neuron functions of the human nervous system consists in the transfer of neurotransmitters from the presynaptic terminal into the synaptic gap to activate postsynaptic neuron receptors [231, 232]. Indeed, the composition of the molecular exchanges of neurons such as neurotransmitters is needed for a better understanding of some brain functions and neurodegenerative diseases to improve the quality of life of patients suffering from these diseases [231, 232]. Therefore, one objective of the proposed system consists of monitoring the presence of these molecules [231, 232]. The latter requires the development of a sampling system for molecular analysis with a dedicated data processing algorithms for faster, more reliable and easier molecular composition extraction [231, 232]. Several detection methods and techniques can be used for neurotransmitter identification or/and quantification. These techniques can be classified into four categories : (1) nuclear medicine, (2) electrochemical sensing, (3) analytical chemistry techniques and (4) optical sensors [113]. Nuclear medicine techniques can be mainly used to diagnose brain function and structure [233, 234, 235, 236], while electrochemical sensing techniques can be used for molecular detection, including molecular identification and quantification [237, 238, 239]. These techniques are characterized by their limited selectivity and limited electrode life time if no specific functionalization layer is added ; however, they have high sensitivity and reliability. [240]. Also, high performance liquid chromatography (HPLC) is a well-established analytical chemistry technique that consists of

separating the molecular composition of a sample [241, 242]. Despite its very high selectivity, its sensitivity depends on the coupled sensor used to detect separated molecules. Also, it is a costly technique, requires a complex setup and needs liquid pre-treatment [243, 244]. Chemiluminescence is based on the detection of light produced from the reaction between the target molecule and enzyme [245, 34, 246]. In several cases, this technique can be used to detect only one molecule at a time depending on enzyme used [247, 248]. Spectroscopy is another optical technique that consists of applying a monochromatic or polychromatic light beam on the sample to analyze reflected, refracted or transmitted light [249, 250]. Each spectroscopy technique, such as UltraViolet-Visible (UV-Vis), Raman and Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FTIR) spectroscopy [249, 250], has its own light beam parameter (angle, attenuation intensity among others) and wavelength/wavenumber range such as gamma-rays, X-rays, ultraviolet, visible or infra-red. In the case of UV-Vis spectroscopy, the sample is excited by several monochromatic light beams together, with wavelength ranging from 100 *nm* to 800 *nm* where the attenuation of the reflected/transmitted light beam is measured by a photo sensor. The light beam attenuation is mainly induced by the molecular electronic transition at each wavelength/wavenumber [99]. Consequently, the concentration of molecules detected can be extracted from the light beam attenuation at a specific wavelength using the Beer-Lambert Law [251]; however, limited selectivity remains the main limitation of this technique where functionalization is needed to improve molecule identification [115]. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) is another spectroscopy method that consists in exciting the sample with a sequence of polychromatic light beams that includes a combination of multiple frequencies in the range of [700 cm^{-1} -1400 cm^{-1}] [252, 253, 250]. Once the sample is excited, the attenuation of the reflected/transmitted light beam is measured. Unlike the UV-Vis spectroscopy, this attenuation is induced by the molecular vibrations mode [254, 26]. As each molecule has its own molecular bond vibrational modes, the sample molecular composition can be identified by analyzing the Infra-red-spectrum obtained [9]. Many setups of the FTIR spectrometer can be used such as microscope-FTIR and Attenuated Total Reflectance FTIR (ATR-FTIR) [253]. The FTIR spectrometer is known for its high molecular selectivity, sensitivity and reliability [9]; however, the main limitation of an ATR-FTIR setup is its high cost and the cleaning process between each experiment to avoid sample contamination. Microscope-FTIR can be based on Total Reflective Mirror (TRM) or Total Transmission Support (TTS). One of the main technical disadvantages of both TRM and TTS is their limited usage with aqueous solutions because water has a high infra-red (IR) radiation absorption [9]. In addition, microscope-FTIR is very sensitive to environmental conditions [9].

In this paper, we propose a new approach for neurotransmitter detection in aqueous sample based on a microscope-FTIR spectrometer. Then, as shown in Fig. 4.1, we propose a new microfluidic chip as a sample handling support and a new fluidic module for sample injection. The detection approach consists of injecting a small volume of samples in the developed chip using the proposed microfluidic module and protocol. Then, the solvent is removed by

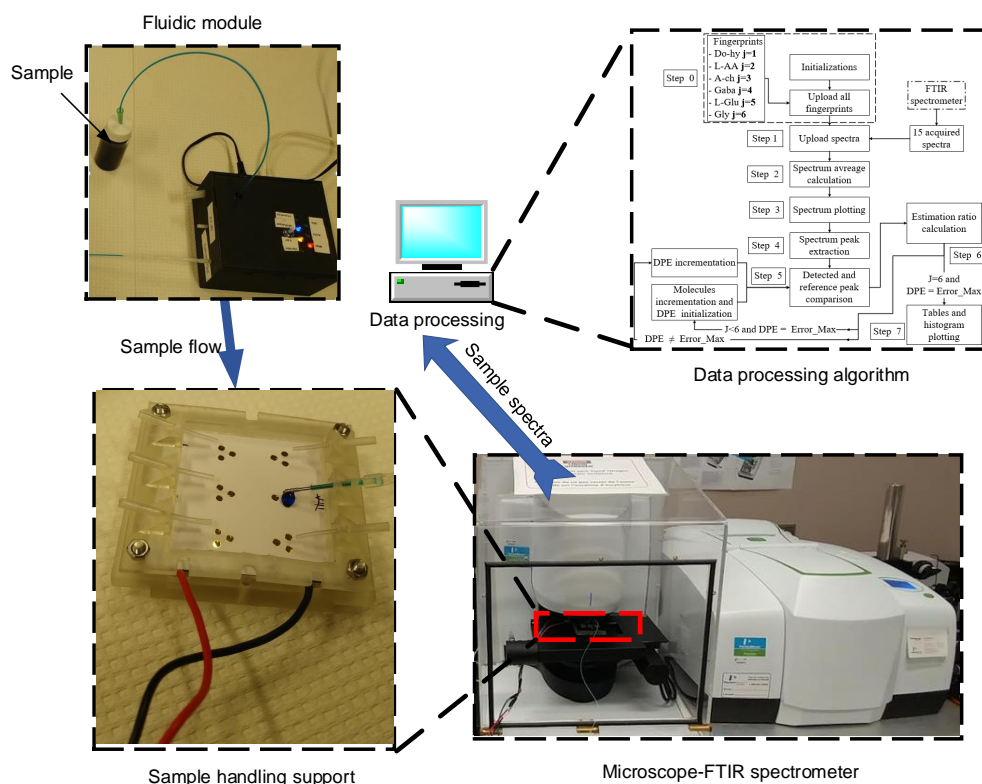


FIGURE 4.1 – Proposed approach and setup for neurotransmitter detection in aqueous solution based on microscope-FTIR spectrometer.

the microfluidic chip which is placed into the microscope-FTIR to perform a spectrometry analysis. Finally, generated data by this instrument as IR-spectra, were uploaded into a new developed post-processing algorithm, for molecular composition extraction based on molecule fingerprints. Finally, an algorithm to identify each neurotransmitter is presented. Eight-one different samples were prepared and analyzed using the system, protocol and algorithm developed (including 45 mixtures and 36 homogeneous solutions for 6 different neurotransmitters).

This paper is organized as follows, Section 4.4 describes the system and microfluidic handling protocol developed while Section 4.5 reports on our experimental protocol. Then, a description of the algorithm developed is reported in Section 4.6. Finally, experimental results of several neurotransmitter samples analyzed in homogeneous and mixture solution are presented and discussed in Section 4.7.

4.4 System Description

4.4.1 Hardware description

This work is based on the same detection approach previously reported in [9]. Indeed, here, we used an improved version of the Sample Handling Support (SHS) previously developed for sugar molecule detection in homogenous solution [9]. In this new design, we improved the analysis area configuration which is designed on the hydrophobic layer and we removed the Polydimethylsiloxane (PDMS) substrate. In this work, we used the microscope-FTIR spectrometer based on the reflective mode. Thus, in the case of aqueous sample analyses, the light beam reflected is highly attenuated by water. Consequently, the maximum standard deviation obtained using the standard setup of the microscope-FTIR spectrometer was considerably high ($\sigma_{max} > 32$), which made experimental results unreliable [9]. Indeed, the standard setup of the microscope-FTIR spectrometer for liquid sample analysis is based on a Total Reflective Mirror (TRM) as SHS. In order to reduce radiation attenuation with this setup, water was removed by natural evaporation [9]. Once the solvent was evaporated, a molecular layer was deposited on the top surface of the TRM. Then, radiation attenuation was only induced by molecular composition of the sample [9]. The main limitation of the evaporation phase was the long duration of the evaporation process and the non-uniformity of the layer distribution deposited on the used TRM [9].

Thus, we propose a new system to accelerate evaporation and improve the layer distribution deposited. The system proposed is an improved version of the standard SHS based on a 50 mm x 50 mm TRM. In this work, the TRM was fabricated at our laboratory by depositing of a 150 nm of a gold layer on a 50 mm x 50 mm glass slide. The gold layer ensures high reflection of the light beam on the upper face of the glass slide. Also, the TRM proposed was easy to clean in an ultrasonic bath. As illustrated in Fig. 4.2, the rapid evaporation was achieved by a heating system glued to the lower side of the TRM. The heating system was a commercial 40 mm x 40 mm x 3.9 mm Peltier module (TEC1-12706, Hebeiltd, Shanghai, China). As shown in Fig. 4.2, a 50 μ m vinyl layer was glued to the upper face of the TRM. This layer was treated with a hydrophobic spray (Ultrahydrophobic Spray, Waterbeader, Dalton, GA, USA) to form a hydrophobic surface. Then, 18 circular spots with a diameter of 1.5 mm each were designed on the hydrophobic vinyl layer using an automated cutting machine (Cricut Maker, Cricut, South Jordan, Utah, USA). Finally, marked areas by the cutting machine were manually removed to uncover the analysis spots. Also, a temperature sensor (LM35, Texas Instruments, Dallas, TX, USA) was embedded in the SHS for real time temperature monitoring of the TRM upper face.

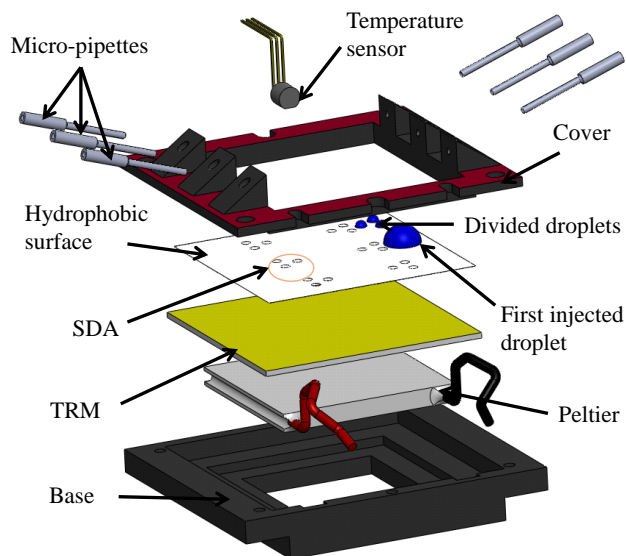


FIGURE 4.2 – Developed SHS. SDA : sample deposition area, TRM :Total Reflective Mirror.

4.4.2 Sample handling protocol

When the sample was deposited on the hydrophilic spot, surface forces between the sample and hydrophobic edges pushed the liquid to remain on the hydrophilic spot. Each sample was split on the three hydrophilic spots, which (together) formed the sample deposition area (SDA). Indeed, for each sample analyzed, we used three different spots. Spectroscopy analyses were performed three times for each spot of the SDA in order to verify the reliability of the results obtained. The final results consist of the average of all spectrum obtained for each analysis and in each SDA. As shown in Fig. 4.2, each SHS developed had six SDA. Several SDAs were incorporated to analyze six different samples with the same SHS, which reduced analysis cost and time. As can be seen in Fig. 4.3, a molecular layer was deposited only on the hydrophilic area and not on the hydrophobic surface.

Indeed, the molecular composition of the sample in this case, does not cover the entire deposition area. This behavior is induced mainly by the surface tension that attracts molecules in the droplet to the spot edges during the evaporation process. In addition, due to the low concentration of the sample compared to the spot dimensions, the deposited layer cannot cover all the spot area even if we neglect the surface tension effect.

As shown in Fig. 4.2, on the top of the new SHS six micro-pipettes were placed for the droplet sample deposition on each SDA. They were connected to a designed microfluidic module that controls the sample injection. The microfluidic module consists of two homemade microvalves (MV) (liquid-MV and air-MV), a homemade micropump (MP), an air-inlet, liquid inlet and outlet ports. The sample handling protocol was divided into two main steps : (1) sample in-

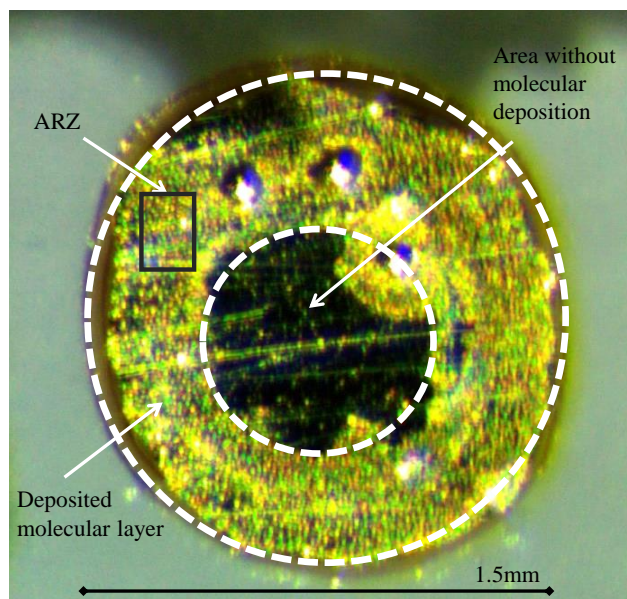


FIGURE 4.3 – Image of deposited molecular layer on a spot after solvent evaporation (optical zoom x10).

jection and (2) air-flow injection. First, the liquid-MV was opened and air-MV was closed to ensure sample injection through a 2 mm diameter plastic tubes. Then, MP was activated until targeted sample volume was reached. Then, MVs positions were reversed to create an air-flow that drives the sample to micro-pipette and then to the analysis area. When the sample droplet was deposited on the SDA, the MP was deactivated and the heating module was enabled. The desired temperature ($\approx 50\text{ }^{\circ}\text{C}$) was reached after 15 min while room temperature was $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The latter was regulated by the heating system until a molecular thin layer was deposited on the analysis area. Once the later was deposited, it was naturally cooled down during 10 min to reach $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. The two MV, MP and heating systems were monitored by a microcontroller unit (ATMEGA328, Microchip Technology, Chandler, Arizona, USA) connected to a computer interface. Thus, aqueous sample analysis using the microscope-FTIR spectrometer was improved because of (1) rapid and controlled solvent evaporation (less than 5 minutes), (2) confinement of deposited molecular layer in hydrophilic spots, (3) accurate control of sample injection using microfluidic system monitored by a microcontroller and (4) the use of multi-analysis spots for each sample to enhance system reliability. However, in previous work [9], hydrophilic area consists of six circular spots with rectangular fluidic open micro-channels. These channels play the role of a fluidic guide for the injected sample. Also, previous design [9] can be used to analyze only two different samples. Thus, in order to reduce analysis time and cost, the new SHS can handle up to six different samples. Finally, Polydimethylsiloxane (PDMS) subtract was used in previous work [9] to reduce the risk of cross contamination between nearby analysis area. With the new SHS design, PDMS has been replaced with embedded pipette in the structure of the SHS in order to reduce the fluidic manipulation. Indeed, the liquid was sampled

TABLE 4.1 – Spectrometric analysis parameters

Parameter	Value
Resolution	2 cm^{-1}
analyzed area dimensions	$6.25\ \mu\text{m} \times 6.25\ \mu\text{m}$
Frequency range	$[4000\text{ cm}^{-1}, 750\text{ cm}^{-1}]$
Interferometer speed	2.2 cm/s

from the target zone and carried out until the analysis area with dedicated embedded pipette. Consequently, by using this approach, we reduce the cross contamination between samples.

4.5 Experimental Protocol

In this section, we describe the experimental protocol for data acquisition using the new SHS with the microscope-FTIR spectrometer (Spotlight 400 FT-IR Imaging System, Perkinelmer, Waltham, MI, USA) and six different neurotransmitters : Dopamine hydrochloride (Do-hy, SIGMA-H8502, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA), L-Ascorbic acid (L-AA, SIGMA-A5960, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA), Acetylcholine chloride (A-ch, SIGMA-A6625, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA), γ -Aminobutyric (GABA, SIGMA-A2129, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA), L-Glutamic acid (L-Glu, SIGMA-49449, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA) and Glycine (Gly, SIGMA-G7125, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA). Six homogeneous solutions with a concentration of 4 mM , 1 mM , $500\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$, $50\ \mu\text{M}$ and $10\ \mu\text{M}$ were prepared with deionized water. The following mixtures were also prepared : Do-hy with A-ch, Do-hy with GABA, Do-hy with L-Glu, Do-hy with Gly, Do-hy with L-AA, L-AA with GABA, L-AA with L-Glu, L-AA with Gly, L-AA with A-ch, A-ch with GABA, A-ch with Gly, A-ch with L-Glu, L-Glu with Gly, L-Glu with GABA and GABA with Gly. For each mixture, three combinations of concentration were prepared. For example, Do-hy and L-AA molecules were mixed together in three different solutions with different concentration ratio ; (1) Do-hy at $500\ \mu\text{M}$ with L-AA at $100\ \mu\text{M}$, (2) Do-hy at $500\ \mu\text{M}$ with L-AA at $500\ \mu\text{M}$ and (3) Do-hy at $100\ \mu\text{M}$ with L-AA at $500\ \mu\text{M}$. Each sample was immediately analyzed after being prepared (less than 10 min between preparation time and injection time) to avoid sample oxidation. For each experiment, $120\ \mu\text{L}$ from the sample was deposited on the SDA using the microfluidic module. Then, the heating module was activated to evaporate the solvent. The heating process was performed outside the microscope to avoid the accumulation of water vapor on the internal mirrors of the spectrometer. In addition, during the spectrometric analysis, the nitrogen gas was continuously injected into the analysis environment of the spectrometer to reduce the noise induced by water vapor or other molecules. The parameters of each spectrometric analysis are shown in Table 4.1.

Prior to the sample injection, the background absorption spectrum was recorded and auto-

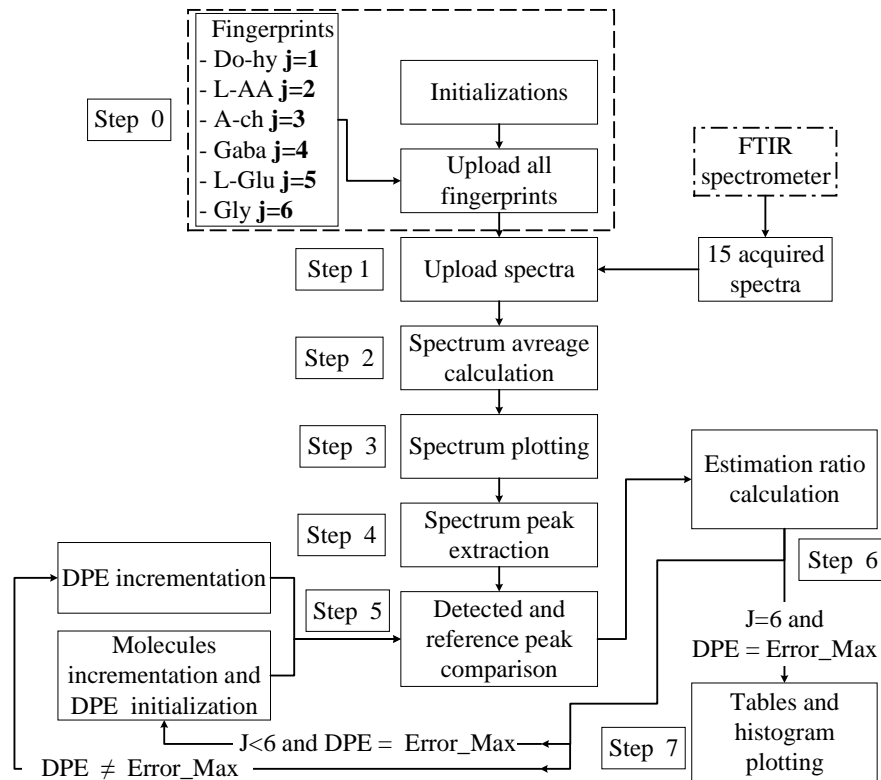


FIGURE 4.4 – Proposed algorithm.

atically subtracted from all sample spectra. The Analysis Rectangle Zone (ARZ) was set manually, which defines the area where the background and sample spectrum were recorded. Thus, the data obtained from the microscope-FTIR spectrometer contains the absorption fluctuation depending on the spatial coordinates in the ARZ. For each spot, five spectra were acquired at the four corners and the center of the IR-image of the ARZ. An average spectrum of these five points was calculated. As each sample was dropped on three different spots, we acquired three different spectra to evaluate the reliability of results obtained using the standard deviation of the final spectrum, which was the average over 15 spectra.

4.6 Data Processing

Fig.4.4 shows the algorithm developed for automatic data analysis to extract sample composition with the highest achievable accuracy. Prior to data uploading (step 1), fingerprints of each molecule were uploaded from the literature [255, 256, 257, 258, 259, 260]. Each molecule fingerprint contains several reference peaks. If we consider all reference peaks reported in literature in the frequency range of $[4000\text{ cm}^{-1}, 750\text{ cm}^{-1}]$, then we can extract 33 reference peaks for Do-hy [255], L-AA [256] and A-ch [257], 30 reference peaks for GABA [258] and L-Glu [259] and 22 reference peaks for Gly [260]. A Detection Peak Error (DPE) was used

when comparing detected and reference peaks. The DPE consists of the maximum acceptable difference between the detected and reference peaks to consider the one detected as the molecule identification peak. For example, we consider a molecule α which has a reference peak at $X[cm^{-1}]$ and a sample spectrum which contains a peak at $Y[cm^{-1}]$. For $DPE = 1 cm^{-1}$, if $|X - Y| \leq 1 cm^{-1}$ then, the peak at $Y[cm^{-1}]$ is considered as part of the molecule identity and consequently the probability that molecule α exists in the sample, increases. If not, the detected peak was ignored for this DPE. Using a high DPE may assign a detected peak to several molecules at simultaneously. When the algorithm was executed, steps five and six were repeated for different DPEs, starting from $DPE=0$ to $DPE= error_max$ where $error_max$ is the maximum DPE set by users. When the DPE is 0, it corresponds to the ideal case where the detected peak position detected is the same as the reference one. Once all peaks detected from the sample studied were compared to all the reference ones of each molecule and all DPEs were analyzed, a sample histogram was plotted. The histogram obtained refers to the sample composition in terms of the presence estimation ratio. This estimation ratio was calculated based on Equation 4.1 :

$$P = \frac{D_P}{N_{RP}} * 100 \quad (4.1)$$

where P is the presence estimation ratio of the molecules in the solution, D_P is the number of detected peaks associated to a reference peak from the molecule fingerprint and N_{RP} is the number of peaks in the fingerprint database. As shown in the histogram of a $50 \mu M$ - (Gly) sample in Fig. 4.5, each sample histogram contains several groups where each group represents a specific molecule and each color refers to a specific DPE. The algorithm considers many DPEs to find the smallest DPE, which provides a more accurate sample composition. Ideally, estimation should be 100% for each molecule available in the sample.

Six tables (Table 4.4, Table 4.5, Table 4.6, Table 4.7, Table 4.8 and Table 4.9) were also generated by the algorithm developed for the six neurotransmitters. The first column represents the fingerprints from literature of the target molecules while the other columns refer to the sample analyzed. Each line of the tables contains the lowest DPEs where a detected peak was matched with a reference one.

4.7 Results and discussion

4.7.1 Comparison between standard SHS and newly Developed SHS results

In this section, we will compare the results obtained using a standard SHS with the ones based on our developed SHS. We used a $100 \mu M$ Do-hy solution for our subsequent analysis because the methodology remains the same for the other solutions. As reported in Fig. 4.6.a,

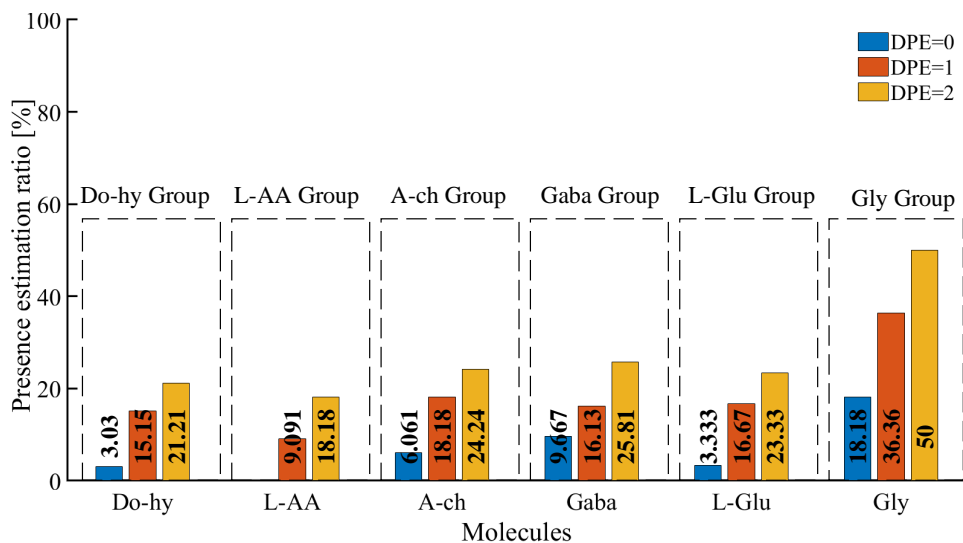


FIGURE 4.5 – Histogram of a 50 μM -(Gly) sample using literature fingerprint.

the absorption distribution of the sample over the analyzed area (ARZ) was non-uniform. We observed a fluctuation of 25% over the entire ARZ. Fig. 4.7.a and Fig. 4.7.b show the five spectra recorded at five different positions in the ARZ and their average spectrum using the standard SHS and the new one, respectively. We were able to assign detected peaks in the spectrum obtained to only a few reference peaks of Do-hy. Indeed, only three detected peaks were associated to a reference one from the Do-hy fingerprint that contains 33 reference peaks. Despite the fact that the five spectra in Fig. 4.7.a refer to the same Do-hy sample, we observed a high standard deviation over all wavelength transmissions (the maximum variation observed over all detected peaks in Fig. 4.6.b was $\sigma_{max} \geq 33$).

Then, we used our newly developed SHS to analyze the same previous sample. Fig. 4.7.b shows the five spectra recorded at five different positions in the ARZ and their average spectrum. The results obtained for the 100 μM Do-hy sample show that absorption distribution had better spatial uniformity, as reported in Fig. 4.6.b. Indeed, the variation of the absorption over the analyzed area did not exceed 0.1% in this case and $\sigma_{max} < 0.04$, which is a significant improvement.

4.7.2 Data analysis

New fingerprint database extraction

Using the newly developed SHS, 81 prepared samples were analyzed. For each sample, 15 spectra were acquired, as mentioned in Section 4.5, to be post-processed with our algorithm.

Fig. 4.8 shows an example of the molecular composition of A-Ch sample and a mixture of the L-AA and L-Glu sample based on fingerprints from literature. We observed that we were

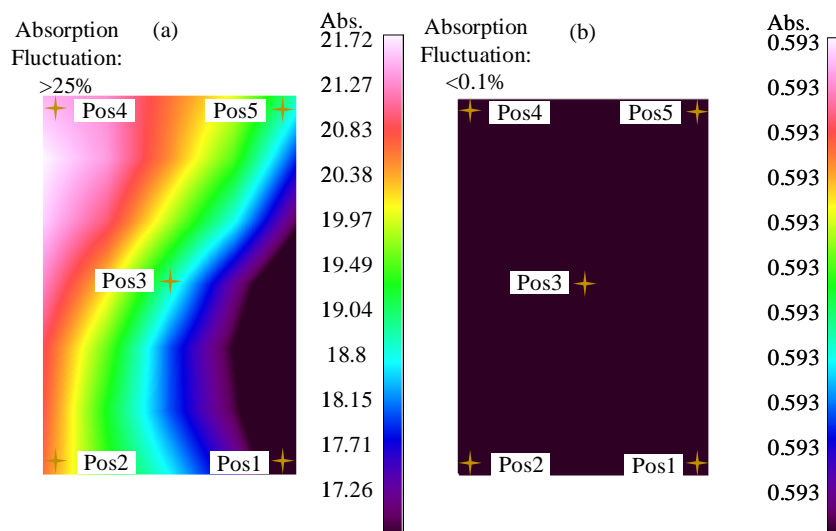


FIGURE 4.6 – (a) Infra-Red image of the ARZ for a $100 \mu M$ Do-hy sample using (a) the standard SHS and (b) the new developed SHS.

able to detect Do-hy, L-AA, A-Ch, GABA, L-Glu and Gly with an estimation ratio varying between 5% and 55% in the case of the homogeneous sample (A-Ch) and between 5% and 70% for the heterogeneous samples (L-AA and L-Glu); however, Do-hy, L-AA, GABA, L-Glu and Gly were not in the homogeneous solution of A-Ch. This example shows the importance of a discrimination approach to improve molecular selectivity, which is the objective of the algorithm we developed.

More particularly, Fig. 4.8.a shows that when the DPE is two, with a homogeneous solution of $50 \mu M$ -(A-ch) the presence of Do-hy, L-AA, A-ch, GABA, L-Glu and Gly molecules in the solution has an estimation ratio of 15.15%, 15.15%, 36.36%, 19.35%, 13.33% and 31.82%, respectively. In the case of a heterogeneous solution with $100 \mu M$ (L-AA) and $500 \mu M$ (L-Glu), as shown in Fig. 4.8.b, with a DPE of two, the presence estimation ratio of Do-hy, L-AA, A-ch, GABA, L-Glu and Gly molecules in the solution was 18.18%, 33.33%, 21.21%, 22.58%, 66.67% and 18.18%, respectively; however, we can observe that when the solution is homogeneous (A-Ch), the presence estimation ratio of L-AA is close to the one of A-ch, which is a major drawback. We observed the same behavior with $100 \mu M$ -(L-AA) and $500 \mu M$ -(L-Glu) mixture sample as shown Fig. 4.8.b where the estimation ratio of Gaba was high and close to this of L-AA molecule while we did not add the Gaba molecule to this mixture. The latter is a significant limitation for molecular identification in a mixture. Thus, the results obtained can not be reliable enough to extract solution composition. We observed the same limitation in the 81 samples.

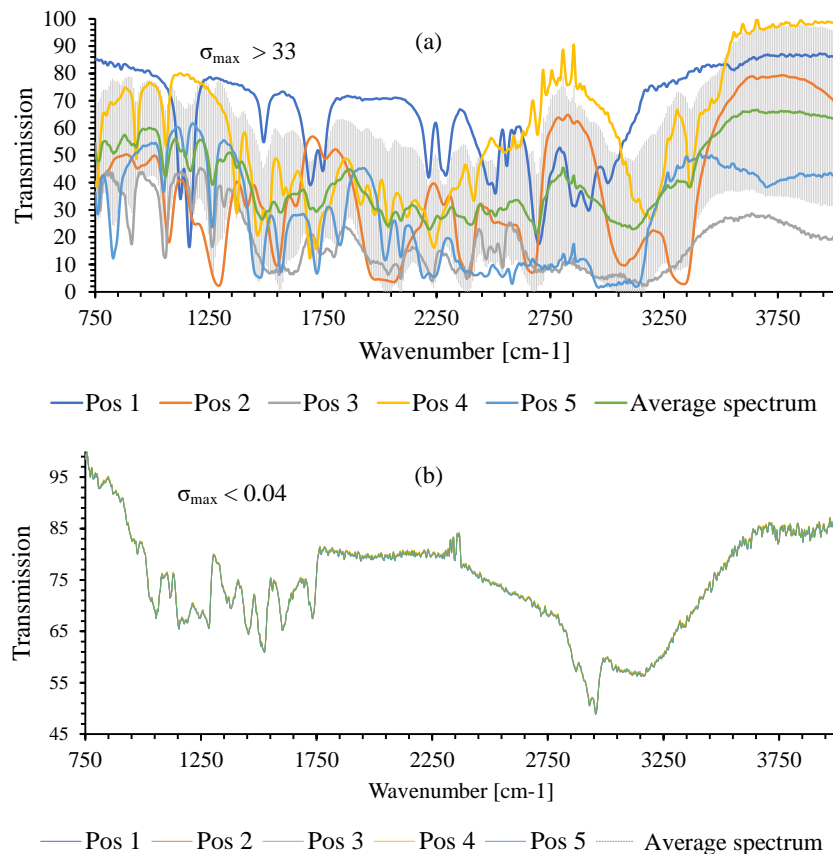


FIGURE 4.7 – Transmission spectra of a $100 \mu M$ Do-hy sample (a) using the standard SHS where gray vertical bars are obtained standard deviation and (b) using the new developed SHS.

Then, in order to address previous limitations, we proposed a new methodology based on an improved molecular identification using a Unique Reference Peak Group (URPG) for each molecule. Thus, each molecule has its own URPG to differentiate it from the others. A reference peak must meet two criteria to be considered relevant for a molecule : (1) being unique for the molecule ; i.e., not observed in any spectrum other than those of samples that contain the target molecule and (2) the difference between the peak of the target molecule and the one from other molecules must be higher than $error_max$. Consequently, the number of peaks at each URPG was considerably reduced as detailed in the following paragraphs.

As reported in Section 4.5, for each molecule, we selected six concentrations ($4 mM$, $1 mM$, $500 \mu M$, $100 \mu M$, $50 \mu M$ and $10 \mu M$) to evaluate the detection selectivity of our methodology. Indeed, for concentrations below $10 \mu M$, the results obtained were not reliable with high standard deviation > 30 . For concentrations higher than $4 mM$, the results obtained were as reliable as $4 mM$. In addition, as reported in Section 4.5, we made three different heterogeneous

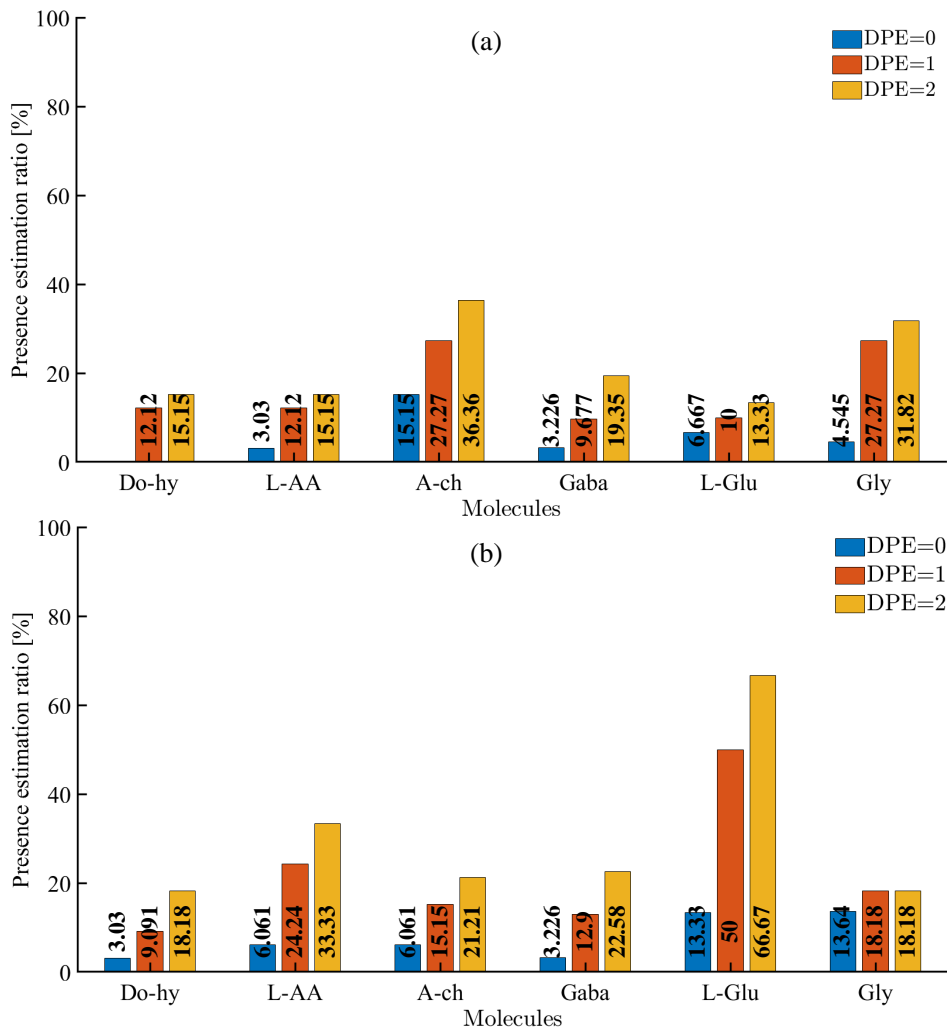


FIGURE 4.8 – (a). Histogram of a 50 μM -(A-ch) sample and (b). 100 μM -(L-AA) and 500 μM -(L-Glu) mixture sample based on literature fingerprints.

solutions with two molecules A and B to validate our discrimination method ; i.e., molecule A (500 μM or 100 μM) mixed with B (500 μM or 100 μM). Molecules A and B can be one of the studied molecules (Do-hy, L-AA, A-ch, GABA, L-Glu and Gly). Then, we chose 4 mM , 1 mM , 500 μM homogeneous solutions to create our database (URPG).

Tables 4.4 to 4.9 show the minimum DPE where a detected peak for Do-hy, L-AA, A-ch, GABA, L-Glu and Gly molecules can be assigned to a reference peak for the target molecule. These tables are considered our reference database. The next step is to discriminate peaks that do not meet criteria (1) in these tables. In addition, from the latter we removed all peaks that did not meet criteria (2). For example, peaks at 960 cm^{-1} and 963 cm^{-1} for Do-hy and A-ch, respectively were not considered in the new reference database (URPG). Indeed, for a DPE= 3 or higher, these two peaks refer to both Do-hy and A-ch molecules.

TABLE 4.2 – Removed peaks from literature fingerprints based on criteria (2).

Removed peaks (cm^{-1})	Targets molecules	Removed peaks (cm^{-1})	Targets molecules
3425/3424	A-ch/Gly	1444/1441	Gly/A-ch
3010/3008	A-ch/Gly	1436/1436	A-ch/L-Glu
2957/2955 /1956	GABA/Do-hy /A-ch	1428/1427	GABA/A-ch
2940/2937	Do-hy/GABA	1413/1411	Gly/L-Glu
2741/2739	L-Glu/L-AA	1389/1386	L-AA/GABA
2616/2613	GABA/Gly	1367/1364	A-ch/L-AA
1642/1641	L-Glu/GABA	1341/1339	Do-hy/GABA
1600/1599	Do-hy/GABA	1322/1320	L-AA/Do-hy
1582/1579	L-Glu/Do-hy	1311/1309 /1310	L-Glu/GABA /A-ch
1519/1517	Do-hy/L-Glu	1288/1286	A-ch/Do-hy
1510/1508	GABA/Gly	1286/1283	Do-hy/GABA
1499/1497 /1496	Do-hy/L-AA /A-ch	1233/1233	L-Glu/A-ch
1474/1471	GABA/Do-hy	1222/1220	L-AA/L-Glu
1468/1467 /1471	L-AA/Do-hy /Do-hy	1162/1161	L-Glu/Do-hy
1451/1450	A-ch/GABA	1127/1125	L-Glu/GABA
1115/1113 /1113	Do-hy/L-AA /Gly	963/960	Do-hy/A-ch
1081/1081	A-ch/Do-hy	913/912	L-Glu/Gly
1077/1077	L-Glu/L-AA	871/868 /871	L-AA/L-Glu/ A-ch
1068/1066	L-AA/A-ch	824/821	A-ch/L-AA
1047/1046	A-ch/L-AA	791/790	Do-hy/GABA
1037/1034	A-ch/Gly	758/757	L-Glu/L-AA
1016/1014	A-ch/Do-hy		

As shown in Table 4.2, using the same criterion, several other peaks were not considered. Finally, the new database contains, 9 reference peaks over 33 for Do-hy, 10 over 33 for L-AA, 8 over 33 for A-ch, 8 over 30 for L-Glu, 9 over 30 for the GABA and 8 over 22 for Gly.

Molecular identification using URPG

Therefore, relevant reference peaks were selected for each molecule from each table (Tables 4.4 to 4.9). As shown in these tables, non-considered peaks were detected in some samples that do not contain target molecules. Indeed, these tables highlight the need of using a new fingerprint database that does not contain non-descriptive reference peaks in order to improve molecular selective detection. Non-colored lines contain removed peaks as they can be detected in several samples with different molecular composition. Blank boxes with a dash (–) refer to

non-detected peak in the analyzed sample using the maximum DPE (error_max). In Table 4.3, for each analyzed sample, we reported maximum standard deviation and estimation ratio of each molecule based on both literature and URPG. These tables show different analysis results using the developed algorithm. Indeed, obtained spectrometry data were processed using the developed algorithm, first, based on fingerprints from literature and then based on the URPG database. By comparing the results generated using these two data processing approaches, we observed that for each analyzed molecule the estimation ratio was increased up to 100%, by using the URPG when this molecule exists in the sample. Also, with the URPG database, estimation ratio decreased and reached 0% when the target molecule does not exist in the analyzed sample. Finally, in order to evaluate detection repeatability and reliability, maximum standard deviation of the 81 analyzed samples were reported in Table 4.3. We define the estimation ratio as the probability of the presence of a molecule in the solution as defined in equation 4.1. The presence of each molecule was investigated in 81 solutions. Based on the new reference database (URPG) of each molecule, we were able to identify sample compositions with an estimation ratio range of 88.8%-100% for Do-hy, 80%-100% for L-AA, 75%-100% for A-Ch, 75%-100% for L-Glu, 77.7%-100% for GABA and 75%-100% for Gly. For example, results obtained for 50 μM of (A-Ch), which are illustrated in Fig 4.9.a, show that the sample contained only A-Ch molecules with an estimation ratio of 87.5% when the DPE was 1 and 2 and 50% when the DPE was 0. In the case of the 100 μM -(L-AA) sample and 500 μM -(L-Glu) sample, the results reported in Fig 4.9.b show that the estimation ratio was 90% when the DPE was 2, 70% when the DPE was 1 and 20% when the DPE was 0 for L-AA while it was 100% when the DPE was 2, 75% when the DPE was 1 and 25% when the DPE was 0 for L-Glu.

Once the DPE was higher than 2, the results obtained were unreliable as the algorithm detects molecules that are not present in the solution. For example, the analysis results of a 4 mM (L-AA), illustrated in Fig. 4.10, show that for a DPE between 0 and 2, the algorithm detected only L-AA, but starting from 3, the results show that the sample may contain Do-hy, L-AA, A-ch, GABA and L-Glu with an estimation ratio of 22.22%, 100%, 12.5%, 33.33% and 25% respectively. Indeed, when the DEP is higher than 3, peaks of different the molecules may overlap. For example, a peak was detected at 1042 cm^{-1} with the 4 mM (L-AA) sample, which may be associated with the 1037 cm^{-1} reference peak of the A-ch molecule when the DPE was 5, while it is associated to the 1042 cm^{-1} reference peak of the L-AA molecule when the DPE was 0.

As designed, one of the distinguishable properties of the proposed system versus others is the fact that all sample analysis were achieved off the body at room temperature and not body temperature (37 °C). Thus, we have more flexibility in terms of sample handling. Indeed, timing is critical because some neurotransmitters such as dopamine start oxidizing when they are in contact with oxygen. Thus, we reduce the contact period between neurotransmitters

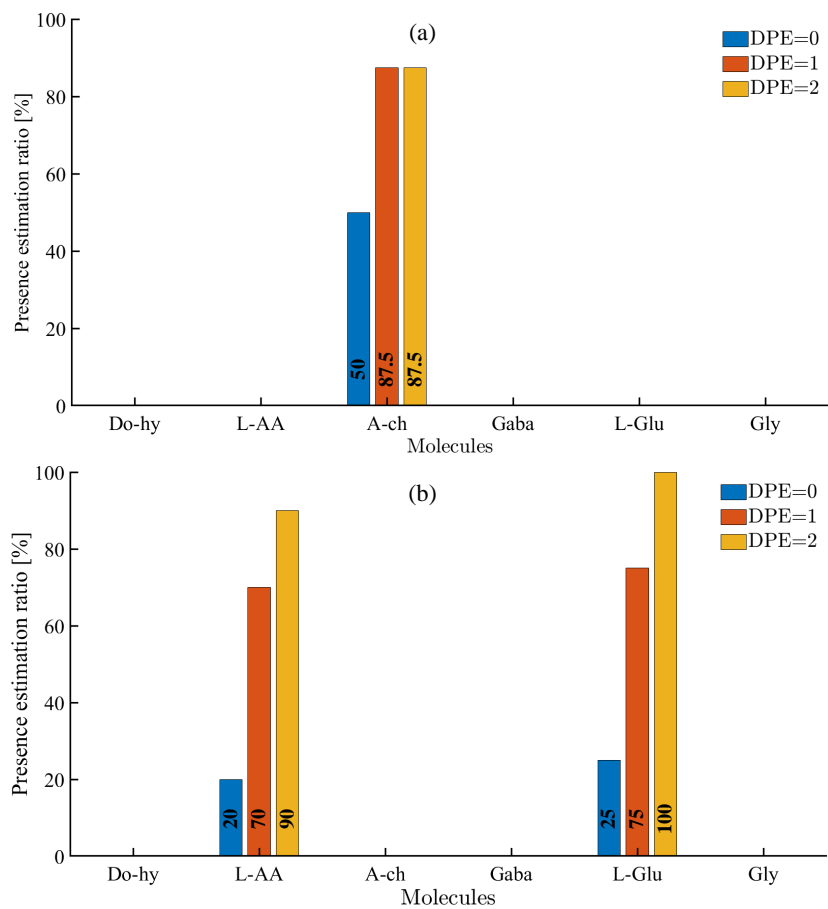


FIGURE 4.9 – Obtained histogram based on URPG for (a).50 μM -(A-Ch) sample and (b). 100 μM -(L-AA) and 500 μM -(L-Glu) mixture sample.

and air and in addition we inject nitrogen to reduce air contamination. From the other side, we know the composition of our samples as they are prepared at our laboratory. Following our sample handling approach, we analyzed again sample composition and obtained data in the tables are coherent with the composition of the samples that we prepared. Thus, based on this observation and protocol, we can claim that the sample handling process did not have a distinguishable impact on the sample composition.

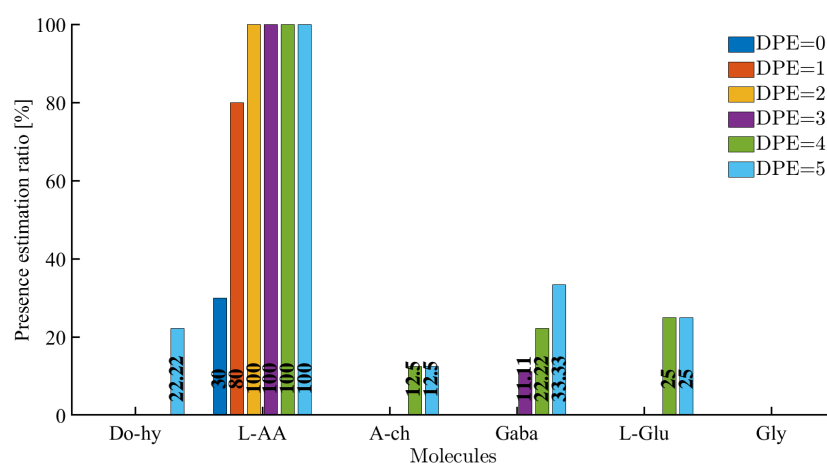


FIGURE 4.10 – Histogram of a 4 *mM*-(L-AA) sample with error_max=5 and using the modified fingerprints database.

TABLE 4.3 – Given presence estimation ratio by the developed script, with literature fingerprints group and the URPG of each molecule on the 81 analyzed sample using the new SHS, microfluidic module and protocol.

Sample Composition	Concentration mM	$\sigma_{max} \cdot 10^2$	Do-hy		L-AA		A-ch		GABA		L-Glu		Gly	
			O	N	O	N	O	N	O	N	O	N	O	N
Do-hy	4	23.1	63.6	100	18.2	0	21.2	0	19.4	0	13.3	0	13.6	0
	1	19.6	75.7	100	18.2	0	18.2	0	25.8	0	13.3	0	27.3	0
	0.5	1.83	66.7	100	24.1	0	18.2	0	25.8	0	16.7	0	27.3	0
	0.1	3.77	48.5	100	24.2	0	18.2	0	25.8	0	20.1	0	31.8	0
	0.05	3.39	69.7	88.9	18.2	0	18.2	0	29.1	0	20.1	0	18.1	0
	0.01	11.5	48.5	88.9	18.2	0	27.3	0	22.6	0	30.1	0	40.9	0
L-AA	4	32.6	18.2	0	72.7	100	18.2	0	12.9	0	16.7	0	9.09	0
	1	5.61	21.2	0	63.6	100	33.3	0	38.7	0	13.3	0	18.1	0
	0.5	5.47	18.2	0	48.5	100	18.2	0	19.4	0	13.3	0	22.7	0
	0.1	0.8	21.2	0	48.5	100	18.2	0	25.8	0	30.0	0	22.7	0
	0.05	2.55	27.3	0	51.5	100	27.3	0	35.5	0	33.3	0	27.3	0
	0.01	2.01	18.2	0	48.5	90.0	21.2	0	19.4	0	16.7	0	27.3	0
A-ch	4	16.1	15.2	0	15.2	0	42.4	100	22.6	0	20.1	0	13.6	0
	1	6.03	15.2	0	15.2	0	33.3	100	19.4	0	13.3	0	18.1	0
	0.5	30.6	15.2	0	21.2	0	42.4	100	12.9	0	6.7	0	22.7	0
	0.1	9.77	21.2	0	12.1	0	48.5	100	35.5	0	30.0	0	27.3	0
	0.05	7.83	15.2	0	15.2	0	36.4	87.5	19.4	0	13.3	0	31.8	0
	0.01	4.65	21.2	0	12.1	0	36.4	75.0	22.6	0	6.7	0	16.6	0

O : original fingerprints group of literature. N : new selected fingerprints group.

Table 4.3 Continued from previous page

Sample Composition	Concentration mM	$\sigma_{max} \cdot 10^2$	Do-hy		L-AA		A-ch		GABA		L-Glu		Gly	
			O	N	O	N	O	N	O	N	O	N	O	N
L-Glu	4	24.1	12.1	0	18.2	0	21.2	0	16.1	0	60.1	100	31.8	0
	1	16.1	27.3	0	30.3	0	30.3	0	25.8	0	56.6	100	40.9	0
	0.5	28.1	27.3	0	33.3	0	18.0	0	29.1	0	60.1	100	40.9	0
	0.1	2.4	27.3	0	27.3	0	15.1	0	22.6	0	56.7	100	18.1	0
	0.05	6.95	18.2	0	24.2	0	30.3	0	38.7	0	73.3	87.5	45.4	0
	0.01	8.57	30.3	0	21.2	0	27.3	0	22.6	0	60.1	87.5	31.8	0
GABA	4	36.9	9.1	0	15.2	0	30.3	0	67.7	100	20.1	0	27.3	0
	1	11.8	9.1	0	15.2	0	27.3	0	67.7	100	20.1	0	27.3	0
	0.5	0.39	15.2	0	27.3	0	33.3	0	61.3	100	26.7	0	27.3	0
	0.1	0.43	18.2	0	30.3	0	36.4	0	58.1	100	46.7	0	40.9	0
	0.05	6.74	21.2	0	33.3	0	36.4	0	51.6	88.9	30.1	0	31.8	0
	0.01	0.43	24.2	0	27.3	0	39.4	0	70.9	77.8	33.3	0	36.3	0
Gly	4	8.33	12.1	0	6.06	0	24.2	0	16.1	0	30.1	0	59.1	100
	1	3.87	30.3	0	21.2	0	24.4	0	29.1	0	16.7	0	81.8	100
	0.5	49.6	18.2	0	6.06	0	24.4	0	22.6	0	30.1	0	50.1	100
	0.1	14.4	12.1	0	24.3	0	21.2	0	32.3	0	13.3	0	68.1	100
	0.05	23.5	21.2	0	18.2	0	24.2	0	25.8	0	23.3	0	50.1	87.5
	0.01	0.42	27.2	0	12.1	0	21.2	0	22.6	0	16.7	0	45.4	75

O : original fingerprints group of literature. N : new selected fingerprints group.

Table 4.3 Continued from previous page

Sample Composition	Concentration mM	$\sigma_{max} \cdot 10^2$	Do-hy		L-AA		A-ch		GABA		L-Glu		Gly	
			O	N	O	N	O	N	O	N	O	N	O	N
Do-hy	0.1	13.9	48.5	100	9.09	0	39.4	87.5	29.1	0	3.33	0	18.1	0
	0.5	17.3	42.4	100	12.1	0	48.5	100	35.5	0	20.1	0	18.1	0
	0.5	9.13	45.5	100	18.1	0	54.5	100	29.1	0	20.1	0	18.1	0
Do-hy	0.1	6.57	42.4	88.9	24.3	0	21.2	0	45.16	77.8	16.7	0	36.3	0
	0.5	15.5	66.6	100	24.3	0	36.4	0	54.9	88.9	16.7	0	22.7	0
	0.5	4.34	72.7	100	6.06	0	21.2	0	54.9	88.9	3.33	0	4.54	0
Do-hy	0.1	0.5	48.5	88.9	3.03	0	27.3	0	12.9	0	60.1	100	18.1	0
	0.5	11.3	54.5	100	0	0	15.1	0	22.6	0	63.3	100	18.1	0
	0.5	0.59	69.7	100	6.06	0	27.3	0	19.4	0	36.6	87.5	9.09	0
Do-hy	0.1	7.98	57.8	88.9	15.2	0	24.2	0	22.6	0	6.66	0	63.6	100
	0.5	5.28	42.4	100	12.1	0	15.2	0	12.9	0	16.7	0	90.9	100
	0.5	0.25	54.5	100	27.3	0	21.2	0	25.9	0	20.1	0	54.5	100
Do-hy	0.1	0.5	45.5	100	66.7	100	21.2	0	29.1	0	26.7	0	31.8	0
	0.5	12.7	51.5	100	54.5	100	33.3	0	29.1	0	26.7	0	22.7	0
	0.5	7.42	57.6	100	48.5	80.0	27.3	0	32.3	0	26.7	0	9.09	0
L-AA	0.1	23.3	21.2	0	51.5	90.0	30.3	0	61.3	100	16.7	0	22.7	0
	0.5	27.4	30.3	0	42.4	90.0	45.2	0	53.3	88.9	16.7	0	18.1	0
	0.5	25.5	21.2	0	42.4	100	54.8	0	63.3	88.9	23.3	0	18.1	0

O : original fingerprints group of literature. N : new selected fingerprints group.

Table 4.3 Continued from previous page

Sample Composition	Concentration mM		$\sigma_{max} \cdot 10^2$	Do-hy		L-AA		A-ch		GABA		L-Glu		Gly	
	0.1	0.5		O	N	O	N	O	N	O	N	O	N	O	N
L-AA	0.1	0.5	30.2	18.2	0	33.3	90.0	21.2	0	22.6	0	66.7	100	18.1	0
	0.5	0.5	9.86	27.3	0	33.3	90.0	12.1	0	19.4	0	46.7	100	18.1	0
	0.5	0.1	1.18	21.2	0	48.5	100	21.2	0	25.8	0	43.3	87.5	13.6	0
L-AA	0.1	0.5	0.06	12.1	0	45.5	90.0	15.2	0	16.1	0	23.3	0	59.1	100
	0.5	0.5	4.87	24.2	0	63.6	90.0	27.3	0	19.4	0	30.1	0	54.5	87.5
	0.5	0.1	11.1	27.3	0	48.4	90.0	33.3	0	32.3	0	33.3	0	54.4	87.5
L-AA	0.1	0.5	1.74	12.1	0	51.5	90.0	45.5	100	29.1	0	23.3	0	13.6	0
	0.5	0.5	0.45	15.2	0	45.5	90.0	36.4	87.5	25.8	0	20.1	0	18.1	0
	0.5	0.1	1.17	27.3	0	63.6	100	57.6	87.5	41.9	0	33.3	0	36.4	0
GABA	0.1	0.5	36.1	12.1	0	15.1	0	39.4	87.5	64.5	100	23.3	0	40.9	0
	0.5	0.5	4.65	9.1	0	12.1	0	48.5	100	54.8	100	20.1	0	31.8	0
	0.5	0.1	4.87	15.2	0	21.2	0	39.4	87.5	54.8	88.9	10.1	0	4.54	0
Gly	0.1	0.5	33.3	24.2	0	15.1	0	36.4	87.5	19.4	0	6.66	0	50.1	75
	0.5	0.5	13.4	15.1	0	12.1	0	54.5	100	35.5	0	20.1	0	50.1	87.5
	0.5	0.1	1.47	24.2	0	9.09	0	48.5	75.0	25.8	0	23.3	0	63.6	100

O : original fingerprints group of literature. N : new selected fingerprints group.

Table 4.3 Continued from previous page

Sample Composition	Concentration mM	$\sigma_{max} \cdot 10^2$	Do-hy		L-AA		A-ch		GABA		L-Glu		Gly	
			O	N	O	N	O	N	O	N	O	N	O	N
L-Glu	0.1	26.1	15.1	0	15.2	0	45.5	87.5	25.8	0	43.3	87.5	27.3	0
	0.5	13.4	18.2	0	18.2	0	33.3	87.5	45.1	0	40.1	87.5	18.1	0
	0.5	0.29	9.1	0	18.2	0	42.4	87.5	16.1	0	66.6	87.5	9.09	0
L-Glu	0.1	10.3	15.2	0	15.1	0	18.2	0	25.8	0	53.3	87.5	45.4	87.5
	0.5	10.5	24.2	0	9.09	0	15.2	0	19.4	0	53.3	87.5	54.5	87.5
	0.5	12.9	15.2	0	15.1	0	24.2	0	12.9	0	56.7	87.5	45.4	75
L-Glu	0.1	17.6	21.2	0	15.1	0	27.3	0	41.9	88.9	50.1	75	22.7	0
	0.5	3.04	24.2	0	9.09	0	21.2	0	51.6	77.8	46.1	87.5	22.7	0
	0.5	32.9	27.3	0	12.1	0	27.3	0	61.3	100	40.1	100	31.8	0
Gab	0.1	25.3	9.1	0	12.1	0	15.1	0	45.1	88.9	16.7	0	45.4	87.5
	0.5	5.06	9.1	0	6.1	0	18.2	0	74.2	100	16.7	0	50.1	87.5
	0.5	27.9	24.2	0	15.2	0	24.2	0	80.6	100	26.7	0	45.4	75

O : original fingerprints group of literature. N : new selected fingerprints group.

4.8 Conclusion

In this work, we used the microscope-FTIR spectrometer to analyze homogeneous and mixture solutions. Due to the microscope-FTIR spectrometer limitation related to aqueous solutions, we developed a new SHS and a microfluidic module to improve the results obtained. The setup developed was based on solvent evaporation. In addition, a data processing algorithm was developed for efficient molecule identification.

First, we compared the results obtained for a 100 μM Do-hy sample using the standard SHS and the newly developed one. The results of the new SHS show that the absorption distribution variation of the molecular layer deposited on the ARZ did not exceed 0.1%, while it was higher than 25% with the standard SHS. In addition, the spectra obtained with the new SHS had a lower standard deviation than the standard SHS; however, the maximum standard deviation obtained (σ_{max}) was 0.5, over 81 samples analyzed, using new setup while $\sigma_{max} > 33$, for the 100 μM Do-hy sample, using the standard one. Indeed, the high uniformity molecular distribution obtained and the low standard deviation demonstrate that using the new SHS made the microscope-FTIR suitable for aqueous solution analysis with high reliability.

Finally, using a newly developed algorithm and the new URPG database, six neurotransmitters were identified in homogeneous and mixture samples with an estimation ratio of 88.8%-100% for Do-hy, 80%-100% for L-AA, 75%-100% for A-Ch, 75%-100% for L-Glu, 77.7%-100% for GABA and 75%-100% for Gly.

4.9 Results Annexe

TABLE 4.4 – Matched fingerprints peaks with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for Do-hy molecule.

Do-hy Peaks	Do-hy 4 mM	Do-hy 1 mM	Do-hy 500 μ M	L-AA 4 mM	L-AA 1 mM	L-AA 500 μ M	Do-hy 4 mM	A-ch 1 mM	A-ch 500 μ M
3371	-	-	-	-	-	1	-	-	-
3350	-	-	-	-	-	-	0	0	0
3239	1	1	1	-	-	-	-	-	-
3143	1	1	1	-	-	-	-	-	-
3065	1	1	1	-	-	-	-	-	-
3055	-	-	-	-	1	-	-	-	1
1612	-	2	-	-	-	-	-	-	-
1260	0	2	0	-	-	-	-	-	-
1206	0	0	0	-	-	0	-	-	-
1190	2	0	0	-	-	-	-	-	-
1176	0	0	0	-	-	-	-	-	-
943	-	-	-	-	1	-	-	-	-
936	0	0	2	-	-	-	-	-	-
931	-	-	-	1	1	1	-	-	-
876	2	0	0	-	-	-	-	-	-
814	2	0	0	-	-	-	-	-	-
752	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 4.4 Continued from previous table

Do-hy Peaks	L-Glu 4 mM	L-Glu 1 mM	L-Glu 500 μ M	GABA 4 mM	GABA 1 mM	GABA 500 μ M	Gly 4 mM	Gly 1 mM	Gly 500 μ M
3371	-	-	1	-	1	-	-	-	1
3350	-	-	-	-	-	-	2	0	-
3239	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3143	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3065	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3055	-	-	-	-	-	-	1	1	1
1612	2	2	2	-	-	-	-	2	-
1260	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1206	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1190	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1176	-	-	-	-	-	-	-	-	-
943	-	-	-	-	-	1	-	-	-
936	-	-	-	-	-	-	-	-	-
931	1	1	1	1	-	1	-	-	-
876	-	-	-	-	-	-	-	-	-
814	-	-	-	-	-	-	-	-	-
752	-	-	-	2	-	-	-	-	2

TABLE 4.5 – Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for L-AA molecule.

L-AA Peaks	Do-hy 4 mM	Do-hy 1 mM	Do-hy 500 μ M	L-AA 4 mM	L-AA 1 mM	L-AA 500 μ M	Do-hy 4 mM	A-ch 1 mM	A-ch 500 μ M
3626	-	-	-	2	2	2	-	-	-
3410	-	-	-	0	0	0	-	-	-
3315	-	-	-	1	1	1	-	-	-
3216	-	-	2	2	2	-	-	-	-
3030	-	-	-	0	2	2	-	-	-
2917	-	-	-	1	-	-	-	-	-
2907	-	1	1	-	1	1	-	-	1
2760	-	-	-	0	2	2	-	-	-
2729	-	-	-	1	1	-	-	1	1
1764	-	-	-	2	0	0	-	-	-
1675	1	1	1	-	-	1	1	-	-
1463	-	-	-	1	1	1	-	-	-
1277	1	-	-	-	-	-	-	-	-
1248	-	-	-	0	-	-	-	-	2
1199	-	-	-	1	1	1	-	-	-
1142	-	-	-	-	0	-	2	-	-
1121	-	-	-	1	1	1	-	-	-
1027	-	-	-	1	1	1	-	-	-
990	0	2	2	0	-	-	-	-	-

Table 4.5 Continued from previous table

L-AA Peaks	L-Glu 4 mM	L-Glu 1 mM	L-Glu 500 μ M	GABA 4 mM	GABA 1 mM	GABA 500 μ M	Gly 4 mM	Gly 1 mM	Gly 500 μ M
3626	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3410	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3315	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3216	2	-	2	2	2	2	-	-	-
3030	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2917	-	-	1	-	-	-	-	-	-
2907	1	1	1	-	-	-	-	-	-
2760	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2729	-	-	-	1	-	-	-	-	-
1764	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1675	1	-	-	-	-	-	-	-	-
1463	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1277	-	-	-	-	-	1	-	-	-
1248	-	2	2	2	-	0	-	-	-
1199	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1142	-	-	-	-	2	-	-	-	-
1121	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1027	-	-	-	-	-	-	-	-	-
990	-	0	2	2	2	2	0	-	0

TABLE 4.6 – Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for A-ch molecule.

A-ch Peaks	Do-hy 4 mM	Do-hy 1 mM	Do-hy 500 μ M	L-AA 4 mM	L-AA 1 mM	L-AA 500 μ M	Do-hy 4 mM	A-ch 1 mM	A-ch 500 μ M
3467	-	-	-	-	1	-	-	-	-
3261	-	-	-	-	-	-	1	1	1
2982	2	-	-	-	-	2	2	-	-
1747	-	-	-	-	-	-	1	1	1
1702	-	-	-	-	-	-	2	2	2
1484	-	-	-	-	-	-	0	2	2
1478	-	-	-	-	-	-	2	0	0
1406	-	-	-	-	0	-	-	-	-
1380	-	0	-	-	-	-	2	-	-
1137	-	-	-	-	-	-	1	1	1
954	-	-	-	-	-	-	0	2	2
917	-	-	-	-	-	-	1	1	1

Table 4.6 Continued from previous table

A-ch Peaks	L-Glu 4 mM	L-Glu 1 mM	L-Glu 500 μ M	GABA 4 mM	GABA 1 mM	GABA 500 μ M	Gly 4 mM	Gly 1 mM	Gly 500 μ M
3467	-	-	-	-	-	-	-	1	-
3261	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2982	2	2	2	2	-	2	-	-	-
1747	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1702	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1484	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1478	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1406	2	-	-	2	-	2	-	0	-
1380	-	-	-	-	2	-	-	-	-
1137	-	-	-	-	-	-	-	-	-
954	-	-	-	-	-	-	-	-	-
917	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLE 4.7 – Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for L-Glu molecule.

L-Glu Peaks	Do-hy 4 mM	Do-hy 1 mM	Do-hy 500 μ M	L-AA 4 mM	L-AA 1 mM	L-AA 500 μ M	Do-hy 4 mM	A-ch 1 mM	A-ch 500 μ M
3069	-	-	-	-	-	-	-	-	1
3049	-	1	1	1	-	-	-	-	-
2963	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2658	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2485	-	-	1	1	-	1	1	-	-
2078	2	0	0	0	2	0	-	-	-
1616	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1421	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1352	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1256	-	-	-	-	2	-	-	-	-
1215	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1057	1	1	1	-	-	-	-	1	-
968	-	-	-	-	-	-	-	-	-
947	-	-	-	-	-	-	-	-	-
807	-	-	-	-	-	-	1	-	-

Table 4.7 Continued from previous table

L-Glu Peaks	L-Glu 4 mM	L-Glu 1 mM	L-Glu 500 μ M	GABA 4 mM	GABA 1 mM	GABA 500 μ M	Gly 4 mM	Gly 1 mM	Gly 500 μ M
3069	-	-	-	-	-	-	1	-	-
3049	1	1	1	-	1	1	-	-	1
2963	1	1	1	-	-	-	-	-	-
2658	2	0	2	-	-	-	-	-	-
2485	-	1	-	-	-	-	-	1	-
2078	0	-	-	0	0	0	0	-	-
1616	2	2	2	-	-	-	-	-	-
1421	1	1	1	-	-	-	-	-	-
1352	2	0	2	-	-	-	-	-	-
1256	-	2	2	-	-	2	-	-	-
1215	1	1	1	-	-	-	-	-	-
1057	1	1	1	-	1	-	-	1	-
968	0	0	2	-	-	-	-	-	-
947	1	1	1	-	-	-	-	-	-
807	1	1	1	1	1	1	-	-	1

TABLE 4.8 – Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for GABA molecule.

GABA Peaks	Do-hy 4 mM	Do-hy 1 mM	Do-hy 500 μ M	L-AA 4 mM	L-AA 1 mM	L-AA 500 μ M	Do-hy 4 mM	A-ch 1 mM	A-ch 500 μ M
3019	-	-	-	1	1	-	-	-	-
2903	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2874	2	2	-	-	-	-	-	0	-
2864	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2783	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2766	-	2	-	0	0	-	2	2	2
2735	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2681	1	-	1	-	1	1	1	-	-
2187	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1652	2	2	2	-	2	-	0	-	-
1402	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1171	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1061	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1008	-	-	2	-	-	-	2	-	-
996	-	-	-	-	-	-	-	-	-
779	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 4.8 Continued from previous table

GABA Peaks	L-Glu 4 mM	L-Glu 1 mM	L-Glu 500 μ M	GABA 4 mM	GABA 1 mM	GABA 500 μ M	Gly 4 mM	Gly 1 mM	Gly 500 μ M
3019	1	-	1	-	-	-	-	-	-
2903	-	-	-	1	1	1	-	-	-
2874	-	0	-	2	2	-	2	2	0
2864	-	-	-	2	2	2	-	-	-
2783	-	-	-	1	1	1	-	-	-
2766	-	-	2	-	2	-	-	2	-
2735	-	-	-	1	1	1	-	-	-
2681	1	1	1	-	-	1	-	1	-
2187	-	-	-	1	1	1	-	-	-
1652	-	-	-	-	0	0	2	2	2
1402	-	-	-	2	0	2	-	-	-
1171	-	-	-	-	1	-	-	-	-
1061	-	-	-	1	1	1	-	-	-
1008	-	-	-	0	2	-	-	-	-
996	-	-	-	0	2	2	-	-	-
779	-	-	-	1	1	1	-	-	-

TABLE 4.9 – Matched fingerprints with detected peaks in 18 different samples with its first DPE for Gly molecule.

Gly Peaks	Do-hy 4 mM	Do-hy 1 mM	Do-hy 500 μ M	L-AA 4 mM	L-AA 1 mM	L-AA 500 μ M	Do-hy 4 mM	A-ch 1 mM	A-ch 500 μ M
3166	2	2	2	-	2	2	0	0	0
2972	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2898	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2826	-	-	-	-	2	0	-	-	-
2713	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2269	1	1	1	1	-	-	1	-	-
2125	-	-	-	-	-	-	-	1	1
1605	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1592	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1523	-	-	-	-	-	1	1	1	1
1334	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1133	-	-	-	-	-	-	-	-	-
893	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 4.9 Continued from previous table

Gly Peaks	L-Glu 4 mM	L-Glu 1 mM	L-Glu 500 μ M	GABA 4 mM	GABA 1 mM	GABA 500 μ M	Gly 4 mM	Gly 1 mM	Gly 500 μ M
3166	-	2	2	-	-	2	0	-	-
2972	-	-	-	-	-	-	0	0	0
2898	-	-	-	-	-	-	0	0	2
2826	-	2	-	-	0	2	-	2	-
2713	-	-	-	-	-	-	1	1	1
2269	1	1	1	1	-	-	1	-	-
2125	-	-	1	-	-	-	-	1	-
1605	-	-	-	-	-	-	1	1	1
1592	-	-	-	-	-	-	2	2	0
1523	-	1	-	-	-	-	-	-	1
1334	-	-	-	-	-	-	0	2	0
1133	-	-	-	-	-	-	1	1	1
893	-	-	-	-	-	-	1	1	1

Conclusion

L'objectif de ce projet est de concevoir un outil d'identification moléculaire à haute sélectivité pour différents types de molécules comme les neurotransmetteurs et les sucres dans des solutions aqueuses. En particulier, les travaux de cette thèse ont permis de :

1. Tester plusieurs méthodes d'analyse chimique pour la détection des sucres dans des échantillons biologiques.
2. Adapter le spectromètre microscope-FTIR pour l'analyse de diverses molécules dans des solutions aqueuses.
3. Identifier et quantifier des molécules de sucres dans des solutions aqueuses avec une technique optique.
4. Identifier des neurotransmetteurs dans des solutions aqueuses, homogènes et hétérogènes.
5. Simplifier le processus de traitement des données, fournies par l'instrument utilisé, par le développement d'un algorithme pour la détection des neurotransmetteurs.

Ce travail a mené à la publication de quatre communications scientifiques dans des conférences internationales, de trois articles de revues et d'un chapitre de livre.

Le chapitre 1 est une revue de la littérature des techniques d'analyse chimique les plus courantes pour l'identification et la quantification de différents types de molécules. Plusieurs techniques ont été présentées dans ce chapitre dont la chromatographie, l'électrophorèse capillaire, la spectroscopie UV / Vis, la spectroscopie FTIR, la spectroscopie Raman, la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire et les techniques de détection électrochimiques. Une grande partie de ce chapitre est alloué pour la spectroscopie FTIR où la théorie de cette méthode, son instrumentation et ses applications ont été abordés.

Dans le chapitre 2, nous avons présenté la conception d'une nouvelle plateforme multicapteurs pour la détection en continu du sucre (saccharose) dans des échantillons biologiques. Dans ce chapitre, nous avons évalué les performances de plusieurs méthodes de détection pour l'identification et la quantification du saccharose dans des solutions biologiques, y compris la spectroscopie UV/Vis, la différence d'impédance électrique et l'électrochimie. Dans le chapitre 3, nous avons rapporté le développement du premier système de maintien et de manipulation des échantillons pour permettre au spectromètre microscope FTIR d'analyser des solutions

aqueuses. Le système proposé est principalement composé d'un dispositif de prélèvement et de manipulation de l'échantillon, avec un module de chauffage pour évaporer le solvant de l'échantillon. Une couche hydrophobe et une chambre en PDMS ont également été intégrées dans le système proposé afin d'assurer une répartition uniforme de l'échantillon déposé sur la zone d'analyse après l'évaporation du solvant.

L'objectif principal du système développé est l'amélioration de la répétabilité de la détection des sucres à l'aide du spectromètre microscope FTIR et par conséquent, l'identification et la quantification des sucres en solution aqueuse. Avec le nouveau système, une variation d'intensité d'absorption inférieure à 5% a été obtenue pour le glucose, le fructose et le saccharose, par rapport à une variation de plus de 30% en utilisant la configuration standard de l'instrument. Cette uniformité a été obtenue par :

- Une injection pseudo-continue contrôlée de l'échantillon.
- Une évaporation contrôlée du solvant pour former des couches de sucres homogènes déposées sur la zone d'analyse.

Finalement, une méthode empirique pour calibrer notre système et pour estimer la concentration de différents sucres a été développée. Cette méthode est basée sur un ajustement quadratique de la variation de l'intensité d'absorption en fonction de la concentration du glucose, du fructose et du saccharose. Les trois molécules de sucres analysées ont pu être identifiées et quantifiées avec une erreur maximale de 5,1 % pour le glucose, 1,68 % pour le fructose et 7,9 % pour le saccharose.

Dans le chapitre 4, nous avons présenté une version améliorée du système de maintien et de manipulation des échantillons pour le spectromètre microscope FTIR. L'amélioration du système se résume par la réduction de la limite de détection en modifiant la forme, le type et le nombre de zones d'analyse placées sur la surface hydrophobe du miroir réfléchissant. De plus, une deuxième version du système microfluidique pour l'injection d'échantillons a été présentée dans ce chapitre. Nous avons également présenté dans ce chapitre le développement d'un algorithme de traitement de données pour une identification moléculaire plus simple et efficace.

Les résultats de l'analyse de six neurotransmetteurs dans 81 échantillons, 36 homogènes et 45 hétérogènes, ont été aussi présentés dans ce chapitre. Les résultats d'analyse d'un échantillon, contenant 100 μM de la molécule de dopamine, ont été comparés en utilisant (1) le système développé et (2) la configuration standard du spectromètre microscope-FTIR. Les résultats obtenus en utilisant le nouveau système montrent que la variation de l'absorption dans la couche moléculaire déposée sur la zone d'analyse ne dépasse pas 0,1%, alors qu'elle allait au-delà de 25 % en utilisant la configuration standard de l'instrument. De plus, les spectres obtenus avec la nouvelle configuration présentent un écart type inférieur à celui de la configuration standard. En effet, l'écart type maximum obtenu (σ_{max}) en utilisant le nouveau système est égal à

0,46, sur 81 échantillons analysés, alors qu'il est supérieur à 33 pour un échantillon contenant $100 \mu M$ de la molécule de dopamine, en utilisant la configuration standard. Ainsi, la grande uniformité de la distribution moléculaire ainsi que le faible écart type obtenu démontrent que l'utilisation du nouveau système rend le spectromètre microscope FTIR adapté à l'analyse de solutions aqueuses avec une grande fiabilité.

Ensuite, les spectres obtenus pour les 81 échantillons ont été analysés en utilisant l'algorithme développé. Grâce à une analyse des signatures optiques de molécules sur une plage de $[4000 \text{ cm}^{-1} \text{ } 750 \text{ cm}^{-1}]$, une nouvelle base de données contenant les signatures optiques les plus descriptives de six neurotransmetteurs a été créée. À l'aide du nouvel algorithme et des nouveaux groupes de signatures optiques, les six neurotransmetteurs ont été identifiés, avec une estimation de la présence de molécules cibles comprise entre 75,9% et 100 % dans 36 échantillons homogènes et 45 hétérogènes.

En résumé, les résultats présentés dans les chapitres 3 et 4 montrent que les objectifs de cette recherche ont été atteints. En effet, l'objectif principal de ce travail est de concevoir un système qui peut détecter différentes molécules dans des solutions aqueuses. Cependant, le système proposé offre une nouvelle alternative d'analyse chimique des échantillons aqueux. Les avantages de cette alternative par rapport aux techniques existantes consistent dans les points suivants :

- Analyser différents types de molécules pour diverses applications tels que médicale, pharmaceutique ou alimentaire, sans avoir besoin de changer partiellement ou en entier l'appareillage d'analyse ou sa configuration comme les phases stationnaires de la chromatographie, le prisme ou l'angle d'incidences des radiations dans le cas de l'ATR-FTIR, par exemples.
- Des analyses simples sans avoir recours à des préparations complexes comme dans le cas de la chromatographie.
- Des analyses à faible risque de contamination lors de l'analyse de plusieurs échantillons différents.

Toutefois, les performances obtenues telles que limites de détection, erreurs de quantification et précisions d'identification moléculaire peuvent être améliorées dans les travaux futurs à travers d'autres optimisations du module fluide, du procédé de préparation/manipulation de l'échantillon et de l'analyse des données comme suit :

- Ajouter des traitements de lissage des spectres et une déconvolution des pics.
- Tester d'autres formes de zones d'analyses et de traitement de surface pour la couche hydrophobe développée.
- Étudier l'effet de la température sur les spectres obtenues.
- Étudier l'effet du volume injecté de l'échantillon sur la précision de l'identification et l'erreur de quantification.

Toute cette recherche a été faite en entier dans les laboratoires de l'université Laval. Les interfaces de contrôle de la plateforme, présentée dans le chapitre 2, le système microfluidique, présenté dans les chapitres 3 et 4 et l'algorithme d'identification moléculaire ont été développés avec le logiciel Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, États-Unis) sous la licence de l'université. La plupart des composants électroniques ont été achetés chez DigiKey incluant l'enclosure en aluminium de la plateforme présentée au chapitre 2. La conception mécanique a été effectuée avec SolidWorks (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France) et les simulations mécaniques, fluidiques et microfluidiques ont été effectuées avec Comsol (COMSOL Inc, Grenoble, France) sous la licence de CMC. La conception des cartes électroniques imprimées est effectuée avec Altium Designer (Altium, San Diego, Californie, États-Unis) et ils sont fabriqués chez PCBway. Finalement, la fabrication des prototypes est effectuée par impression 3D. Une imprimante (Form2 de Formlabs) à base de stéréolithographie et une imprimante à extrusion (Crealty CR10) sont utilisées pour fabriquer toutes les pièces des systèmes. Le filament en PLA pour l'imprimante à extrusion est acheté chez 3d printing canada (Ontario, Canada) et les résines pour l'imprimante stéréolithographie sont achetées chez Formlabs (Somerville, Massachusetts, États-Unis). Toutes les substances chimiques ont été achetées chez Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MT, USA). Les solutions synthétiques sont préparées comme suit : pour une concentration donnée, la masse et le volume ont été calculés pour faire une solution mère, avec de l'eau déminéralisée, puis on a procédé à des dilutions avec le même solvant pour avoir des concentrations inférieures. Finalement, le spectromètre microscope FTIR utilisé est le Spotlight 400 FT-IR Imaging System, (Perkinelmer, Waltham, MI, USA), il utilise un détecteur à base de tellurure de mercure et de cadmium (MCT), la lame séparatrice est faite en KBR et une fonction carrée est utilisée pour l'apodisation de l'interférogramme. Cet instrument est utilisé avec une résolution maximale de 2 cm^{-1} pour les neurotransmetteurs et 4 cm^{-1} pour les sucres, une zone d'analyse de $6.25\text{ }\mu\text{m} \times 6.25\text{ }\mu\text{m}$, une vitesse d'interféromètre de 2.2 cm/s et une plage d'analyse de 4000 cm^{-1} à 750 cm^{-1} pour les neurotransmetteurs et 1000 cm^{-1} à 750 cm^{-1} pour les sucres.

À ce stade du projet, l'étape suivante consiste à tester d'autres types de molécules avec le système développé. Tout d'abord, il est nécessaire de déterminer, pour chaque molécule cible, la base de données contenant leurs signatures optiques IR (URPG) les plus descriptives. Par la suite, nous pouvons optimiser l'algorithme de post-traitement en ajoutant la fonctionnalité d'analyse des signatures optiques pour extraire automatiquement l'URPG de chaque molécule cible, en plus de l'analyse spectrale. Enfin, l'intégration de cet algorithme dans le logiciel principal du spectromètre microscope FTIR est nécessaire pour faciliter l'identification moléculaire et réduire le nombre de manipulations.

Autres Publications

1. **Landari, H.**, Boukadoum, M., Messaddeq, Y., & Miled, A. Optical Detection Techniques for Bio-Analysis. *Handbook of Biochips : Integrated Circuits and Systems for Biology and Medicine*. (En production, Accepté le 07 Juin 2021)
2. **Landari, H.**, Roudjane, M., Messaddeq, Y., & Miled, A. (2019, June). Pseudo-Continuous Flow System for Dopamine and Ascorbic Acid Detection Based on FTIR-Spectrometry. In *2019 17th IEEE International New Circuits and Systems Conference (NEWCAS)* (pp. 1-4). *IEEE*.
3. **Landari, H.**, Jobin-Rioux, A., Desjardins, L. C., Messaddeq, Y., Boisselier, É., & Miled, A. (2019, October). Spectrophotometry Method for Sucrose Detection through Glucose Quantification in Maple Syrup. In *2019 IEEE SENSORS* (pp. 1-4). *IEEE*.
4. **Landari, H.**, Roudjane, M., Messaddeq, Y., & Miled, A. (2020, February). Microspectrometry FTIR based glucose and fructose biosensor with pseudo-continuous flow. In *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XVIII* (Vol. 11235, p. 1123509). International Society for Optics and Photonics.
5. **Landari, H.**, Messaddeq, Y., & Miled, A. (2021, March). Diffusion-based probe for low liquid sampling rate for biomedical application. In *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XIX* (Vol. 11637, p. 116370F). *International Society for Optics and Photonics*.
6. **Landari, H.**, Jobin-Rioux, A., Desjardins, L. C., Messaddeq, Y., Boisselier, É., & Miled, A. (2019, October). Spectrophotometry Method for Sucrose Detection through Glucose Quantification in Maple Syrup. In *2019 IEEE SENSORS* (pp. 1-4). *IEEE*.
7. Miled, A., **Landari, H.**, Boukadoum, M., & Messaddeq, Y. Sensing and Sampling Probes for Bio-applications. *Handbook of Biochips : Integrated Circuits and Systems for Biology and Medicine*. (En production, Accepté le 07 Juin 2021)
8. Brochu, N., **Landari, H.**, Messaddeq, Y., & Miled, A. (2020, February). Simulation and experimental results of a microfluidic dipole designed for brain experiments. In *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XVIII* (Vol. 11235, p. 112350C). *International Society for Optics and Photonics*.

Bibliographie

- [1] Jana Lietsche, Jan Gorka, Stefanie Hardt, Michael Karas, and Jochen Klein. Self-built microdialysis probes with improved recoveries of atp and neuropeptides. *Journal of neuroscience methods*, 237 :1–8, 2014.
- [2] Woong Hee Lee, Thitaphat Ngernsutivorakul, Omar S Mabrouk, Jenny-Marie T Wong, Colleen E Dugan, Samuel S Pappas, Hyeun Joong Yoon, and Robert T Kennedy. Micro-fabrication and in vivo performance of a microdialysis probe with embedded membrane. *Analytical chemistry*, 88(2) :1230–1237, 2016.
- [3] Microdialysis. Probes & guides. <https://microdialysis.com/products/probes-guides.html>, September 2018.
- [4] William C Ballance, Ellen C Qin, Hee Jung Chung, Martha U Gillette, and Hyunjoon Kong. Reactive oxygen species-responsive drug delivery systems for the treatment of neurodegenerative diseases. *Biomaterials*, 217 :119292, 2019.
- [5] Jialing Zhang, John Rector, John Q Lin, Jonathan H Young, Marta Sans, Nitesh Katta, Noah Giese, Wendong Yu, Chandandeep Nagi, James Suliburk, et al. Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system. *Science translational medicine*, 9(406), 2017.
- [6] O Zuloaga, P Navarro, E Bizkarguenaga, A Iparraguirre, A Vallejo, M Olivares, and A Prieto. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge : a review. *Analytica chimica acta*, 736 :7–29, 2012.
- [7] S Neethirajan, C Karunakaran, DS Jayas, and NDG White. Detection techniques for stored-product insects in grain. *Food Control*, 18(2) :157–162, 2007.
- [8] Hamza Landari, Jean-Christophe Blais, Younes Messaddeq, and Amine Miled. Multi-modal sensing platform for continuous analysis of maple syrup in production process. *IEEE Sensors Journal*, 2020.
- [9] Hamza Landari, Mourad Roudjane, Younès Messaddeq, and Amine Miled. Pseudo-continuous flow ftir system for glucose, fructose and sucrose identification in mid-ir range. *Micromachines*, 9(10) :517, 2018.

- [10] *Conventional Transmission Spectrometry*, chapter 11, pages 251–260. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [11] Hamza Landari, Mourad Roudjane, Younès Messaddeq, and Amine Miled. Microspectrometry-ftir based glucose and fructose biosensor with pseudo-continuous flow. In *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XVIII*, volume 11235, page 1123509. International Society for Optics and Photonics, 2020.
- [12] Helmut Günzler and Alex Williams. Handbook of analytical techniques. *Evolution*, 1 :1–2, 2001.
- [13] Dan Huang, Qing-Song Jiang, Jun-Qing Yang, Ting Cui, Nian-Ru Wang, Ting-Ting Du, and Xin-Hui Jiang. Simultaneous determination of nine analytes related to the pathogenesis of diabetic encephalopathy in diabetic rat cortex and hippocampus by hplc-fld. *Biomedical Chromatography*, page e4338, 2018.
- [14] OMS. Bonnes pratiques relatives au choix et à l’achat des tests de diagnostic rapide du paludisme. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75237>, Aout 2021.
- [15] Costas A Varotsos, Vladimir F Krapivin, and Ferdinant A Mkrtchyan. New optical tools for water quality diagnostics. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(8) :1–12, 2019.
- [16] Patricia J Simner, Reeti Khare, and Nancy L Wengenack. Rapidly growing mycobacteria. In *Molecular medical microbiology*, pages 1679–1690. Elsevier, 2015.
- [17] Yumin Leng, Kun Xie, Liqun Ye, Genquan Li, Zhiwen Lu, and Junbao He. Gold-nanoparticle-based colorimetric array for detection of dopamine in urine and serum. *Talanta*, 139 :89–95, 2015.
- [18] Shimwe Dominique Niyonambaza, Anna Koudrina, Maria C DeRosa, Mounir Boukadoum, Amine Miled, and Elodie Boisselier. Aptamer-modified ultrastable gold nanoparticles for dopamine detection. *IEEE Sensors Journal*, 21(3) :2517–2525, 2020.
- [19] B Roig and O Thomas. Rapid estimation of global sugars by uv photodegradation and uv spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 477(2) :325–329, 2003.
- [20] Elsaadani Moez, Durand Noel, Sorli Brice, Guibert Benjamin, Atelier Pascaline, and Montet Didier. Aptamer assisted ultrafiltration cleanup with high performance liquid chromatography-fluorescence detector for the determination of ota in green coffee. *Food chemistry*, 310 :125851, 2020.
- [21] Giuseppe Egidio De Benedetto, Daniela Fico, Antonio Pennetta, Cosimino Malitesta, Giuseppe Nicolardi, Dario Domenico Lofrumento, Francesco De Nuccio, and Velia La Pesa. A rapid and simple method for the determination of 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by hplc with fluorimetric detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 98 :266–270, 2014.

- [22] Poovan Shanmugavelan, Su Yeon Kim, Jung Bong Kim, Heon Woong Kim, Soo Muk Cho, Se Na Kim, So Young Kim, Young Sook Cho, and Haeng Ran Kim. Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by hplc-elsd. *Carbohydrate Research*, 380 :112–117, 2013.
- [23] Adam T Woolley, Kaiqin Lao, Alexander N Glazer, and Richard A Mathies. Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection. *Analytical Chemistry*, 70(4) :684–688, 1998.
- [24] Ying-Hua Deng, Hong Wang, and Hua-Shan Zhang. Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of separation science*, 31(16-17) :3088–3097, 2008.
- [25] Salvador Rosello, Luis Galiana-Balaguer, José Manuel Herrero-Martínez, Angel Maquieira, and Fernando Nuez. Simultaneous quantification of the main organic acids and carbohydrates involved in tomato flavour using capillary zone electrophoresis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(10) :1101–1106, 2002.
- [26] Hamza Landari, Mourad Roudjane, Younes Messaddeq, and Amine Miled. Pseudo-continuous flow system for dopamine and ascorbic acid detection based on ftir-spectrometry. In *2019 17th IEEE International New Circuits and Systems Conference (NEWCAS)*, pages 1–4. IEEE, 2019.
- [27] Ofélia Anjos, Maria Graça Campos, Pablo Contreras Ruiz, and Paulo Antunes. Application of ftir-atr spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food chemistry*, 169 :218–223, 2015.
- [28] John D Ciubuc, Kevin E Bennet, Chao Qiu, Matthew Alonzo, William G Durrer, and Felicia S Manciu. Raman computational and experimental studies of dopamine detection. *Biosensors*, 7(4) :43, 2017.
- [29] Felicia S Manciu, Marian Manciu, John D Ciubuc, Emma M Sundin, Katia Ochoa, Michael Eastman, William G Durrer, Jose Guerrero, Brayant Lopez, Mahendra Subedi, et al. Simultaneous detection of dopamine and serotonin—a comparative experimental and theoretical study of neurotransmitter interactions. *Biosensors*, 9(1) :3, 2019.
- [30] S Firdous, M Nawaz, M Ahmed, S Anwar, A Rehman, R Rashid, and A Mahmood. Measurement of diabetic sugar concentration in human blood using raman spectroscopy. *Laser physics*, 22(6) :1090–1094, 2012.
- [31] Xiao Wei, Zhendong Zhang, and Zhenhong Wang. A simple dopamine detection method based on fluorescence analysis and dopamine polymerization. *Microchemical Journal*, 145 :55–58, 2019.

- [32] Kallol Bera, Anand Kant Das, Ananya Rakshit, Bidyut Sarkar, Anoop Rawat, Barun Kumar Maity, and Sudipta Maiti. Fluorogenic detection of monoamine neurotransmitters in live cells. *ACS chemical neuroscience*, 9(3) :469–474, 2017.
- [33] Andreea L Chibac, Violeta Melinte, Tinca Buruiana, and Emil C Buruiana. Fluorescent polymeric sensors containing boronic acid derivatives for sugars and dopamine detection. sensing characteristics enhancement by au nps. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 253 :987–998, 2017.
- [34] Tania M Godoy-Reyes, Antoni Llopis-Lorente, Ana M Costero, Félix Sancenón, Pablo Gaviña, and Ramón Martínez-Máñez. Selective and sensitive colorimetric detection of the neurotransmitter serotonin based on the aggregation of bifunctionalised gold nanoparticles. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 258 :829–835, 2018.
- [35] Zhengbo Chen, Chenmeng Zhang, Tianhui Zhou, and He Ma. Gold nanoparticle based colorimetric probe for dopamine detection based on the interaction between dopamine and melamine. *Microchimica Acta*, 182(5-6) :1003–1008, 2015.
- [36] Annalisa Scroccarello, Flavio Della Pelle, Lilia Neri, Paola Pittia, and Dario Compagnone. Silver and gold nanoparticles based colorimetric assays for the determination of sugars and polyphenols in apples. *Food research international*, 119 :359–368, 2019.
- [37] Rui Zhang, Gen-Di Jin, Da Chen, and Xiao-Ya Hu. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using poly (acid chrome blue k) modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 138(1) :174–181, 2009.
- [38] Zixu Huang, Lijun Zhang, Pengfei Cao, Nan Wang, and Meng Lin. Electrochemical sensing of dopamine using a ni-based metal-organic framework modified electrode. *Ionics*, 27(3) :1339–1345, 2021.
- [39] Fredy Kurniawan, Vessela Tsakova, and Vladimir M Mirsky. Gold nanoparticles in nonenzymatic electrochemical detection of sugars. *Electroanalysis : An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 18(19-20) :1937–1942, 2006.
- [40] Paweł Krzyczmonik, Ewelina Socha, and Sławomira Skrzypek. Electrochemical detection of glucose in beverage samples using poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)-modified electrodes with immobilized glucose oxidase. *Electrocatalysis*, 9(3) :380–387, 2018.
- [41] Michal Stupak, Ian Goodall, Monika Tomaniova, Jana Pulkrabova, and Jana Hajslova. A novel approach to assess the quality and authenticity of scotch whisky based on gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2018.

- [42] Javier González-Sálamo, Miguel Ángel González-Curbelo, Bárbara Socas-Rodríguez, Javier Hernández-Borges, and Miguel Ángel Rodríguez-Delgado. Determination of phthalic acid esters in water samples by hollow fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 201 :254–261, 2018.
- [43] Jolanta Flieger, Małgorzata Tatarczak-Michalewska, Anna Groszek, Eliza Blicharska, and Ryszard Kocjan. Adsorption kinetics at silica gel/ionic liquid solution interface. *Molecules*, 20(12) :22058–22068, 2015.
- [44] Alexandre Goyon, Alain Beck, Olivier Colas, Koen Sandra, Davy Guillarme, and Szabolcs Fekete. Evaluation of size exclusion chromatography columns packed with sub-3 μm particles for the analysis of biopharmaceutical proteins. *Journal of Chromatography A*, 1498 :80–89, 2017.
- [45] Eric Lesellier and Caroline West. The many faces of packed column supercritical fluid chromatography—a critical review. *Journal of Chromatography A*, 1382 :2–46, 2015.
- [46] LS Ettre. Nomenclature for chromatography (iupac recommendations 1993). *Pure and Applied Chemistry*, 65(4) :819–872, 1993.
- [47] Liu Yang, Yu-Long Liu, Cheng-Guo Liu, Ying Fu, and Fei Ye. A cationic metal-organic framework for dye adsorption and separation based on column-chromatography. *Journal of Molecular Liquids*, 300 :112311, 2020.
- [48] James M Miller. *Chromatography : concepts and contrasts*. John Wiley & Sons, 2005.
- [49] David S Hage. Chromatography. In *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*, pages 1–32. Elsevier, 2018.
- [50] Gilles Camus Ali Ladram. La chromatographie. <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-chromatographie>, Aout 2021.
- [51] Jack Cazes and Raymond PW Scott. *Chromatography theory*, volume 88. CRC press, 2002.
- [52] Muhammad Sajid Hamid Akash and Kanwal Rehman. High performance liquid chromatography. In *Essentials of Pharmaceutical Analysis*, pages 175–184. Springer, 2020.
- [53] Colin F Poole and Salwa K Poole. *Chromatography today*. Elsevier, 2012.
- [54] David S Hage and James D Carr. *Analytical chemistry and quantitative analysis*. Prentice Hall Boston, 2011.
- [55] Akinde F Kadjo, Purnendu K Dasgupta, and Charles Phillip Shelor. Optimum cell pathlength or volume for absorbance detection in liquid chromatography : transforming longer cell results to virtual shorter cells. *Analytical chemistry*, 92(9) :6391–6400, 2020.

- [56] Phyllis E Hayes, John HT Luong, Elizabeth S Gilchrist, Alyah Buzid, and Jeremy D Glennon. Profiling of phenolic flavorings using core-shell reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection at a boron-doped diamond electrode. *Journal of Chromatography A*, 1612 :460649, 2020.
- [57] Donatella Coviello, Raffaella Pascale, Rosanna Ciriello, Anna Maria Salvi, Antonio Guerrieri, Michela Contursi, Laura Scrano, Sabino A Bufo, Tommaso RI Cataldi, and Giuliana Bianco. Validation of an analytical method for nitrite and nitrate determination in meat foods for infants by ion chromatography with conductivity detection. *Foods*, 9(9) :1238, 2020.
- [58] Lakshmi Narasimha Rao Katakam and Thirupathi Dongala. A novel rp-hplc refractive index detector method development and validation for determination of trace-level alcohols (un-sulfated) in sodium lauryl sulfate raw material. *Biomedical Chromatography*, 34(7) :e4827, 2020.
- [59] Alexandra S Maia, Paula Paíga, Cristina Delerue-Matos, Paula ML Castro, and Maria Elizabeth Tiritan. Quantification of fluoroquinolones in wastewaters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Pollution*, 259 :113927, 2020.
- [60] Shogo Kumagai, Yusuke Takahashi, Tomohito Kameda, Yuko Saito, and Toshiaki Yoshioka. Quantification of cellulose pyrolyzates via a tube reactor and a pyrolyzer-gas chromatograph/flame ionization detector-based system. *ACS omega*, 6(18) :12022–12026, 2021.
- [61] Andrew M Poulton, Rebecca C Poulten, Alice Baldaccini, Anaëlle Gabet, Rebecca Mott, Kevin E Treacher, Emily Roddy, and Paul Ferguson. Towards improved characterisation of complex polyethylene glycol excipients using supercritical fluid chromatography-evaporative light scattering detection-mass spectrometry and comparison with size exclusion chromatography-triple detection array. *Journal of Chromatography A*, 1638 :461839, 2021.
- [62] Klaus Schilling and Ulrike Holzgrabe. Recent applications of the charged aerosol detector for liquid chromatography in drug quality control. *Journal of Chromatography A*, 1619 :460911, 2020.
- [63] Jacob Kay, Rekha Thomas, Jason Gruenhagen, and CJ Venkatramani. Simultaneous quantitation of water and residual solvents in pharmaceuticals by rapid headspace gas chromatography with thermal conductivity detection (gc-tcd). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 194 :113796, 2021.
- [64] Robert White. *Chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy and its applications*. CRC press, 2020.

- [65] Yuangui Yang, Yanli Zhao, Zhitian Zuo, Ji Zhang, Yao Shi, and Yuanzhong Wang. Investigation of a medical plant for hepatic diseases with secoiridoids using hplc and ft-ir spectroscopy for a case of gentiana rigescens. *Molecules*, 25(5) :1219, 2020.
- [66] James P Landers. *Handbook of capillary electrophoresis*. CRC press, 1996.
- [67] Yan Xu. Tutorial : capillary electrophoresis. *The chemical educator*, 1(2) :1–14, 1996.
- [68] Beckman Coulter. Introduction to capillary electrophoresis. <https://sciex.com/content/dam/SCIEX/pdf/customer-docs/user-guide/IntroductiontoCapillaryElectrophoresisVol1-I.pdf>, Aout 2021.
- [69] David Harvey. Electrophoresis. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_\(Harvey\)/12%3A_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.07%3A_Electrophoresis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Analytical_Chemistry_2.1_(Harvey)/12%3A_Chromatographic_and_Electrophoretic_Methods/12.07%3A_Electrophoresis), Aout 2021.
- [70] Juliet Precissi. Capillary electrophoresis. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis), Aout 2021.
- [71] Chapter 1 introduction. volume 52 of *Journal of Chromatography Library*, pages 1–30. Elsevier, 1992.
- [72] Chapter 5 electrolyte systems. volume 52 of *Journal of Chromatography Library*, pages 201–293. Elsevier, 1992.
- [73] Angela A. Alexander-Bryant, Wendy S. Vanden Berg-Foels, and Xuejun Wen. Chapter one - bioengineering strategies for designing targeted cancer therapies. volume 118 of *Advances in Cancer Research*, pages 1–59. Academic Press, 2013.
- [74] Luis A Colón, Glamarie Burgos, Todd D Maloney, José M Cintrón, and Ramón L Rodríguez. Recent progress in capillary electrochromatography. *ELECTROPHORESIS : An International Journal*, 21(18) :3965–3993, 2000.
- [75] Chapter 4 column technology. volume 52 of *Journal of Chromatography Library*, pages 155–200. Elsevier, 1992.
- [76] Narges Hadjefandiari and Anilkumar Parambath. 13 - stealth coatings for nanoparticles : Polyethylene glycol alternatives. In Anilkumar Parambath, editor, *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, pages 345–361. Woodhead Publishing, 2018.
- [77] Chapter 6 special systems and methods. volume 52 of *Journal of Chromatography Library*, pages 295–375. Elsevier, 1992.
- [78] Robert ROSSET. Isotachophorèse. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/isotachophorese/>, Aout 2021.

- [79] Xiaojuan Li, Zhengri Yin, Xiujun Cui, and Li Yang. Capillary electrophoresis-integrated immobilized enzyme microreactor with graphene oxide as support : Immobilization of negatively charged l-lactate dehydrogenase via hydrophobic interactions. *Electrophoresis*, 41(3-4) :175–182, 2020.
- [80] Rick Bosma, Jasen Devasagayam, Ashutosh Singh, and Christopher M Collier. Microchip capillary electrophoresis dairy device using fluorescence spectroscopy for detection of ciprofloxacin in milk samples. *Scientific Reports*, 10(1) :1–8, 2020.
- [81] Jana Krenkova, Marcela Liskova, Richard Cmelik, Gyula Vigh, and Frantisek Foret. Multi-cationic aminopyrene-based labeling tags for oligosaccharide analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 1095 :226–232, 2020.
- [82] Dan Luo, Zhonghui Fang, Xiaoshuang Zhao, Yaolu Ma, Jiannong Ye, and Qingcui Chu. Salt-effect enhanced hollow-fiber liquid-phase microextraction of glutathione in human saliva followed by miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection. *Electrophoresis*, 41(5-6) :328–334, 2020.
- [83] Nicole Anastos, Neil W Barnett, and Simon W Lewis. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis : a review. *Talanta*, 67(2) :269–279, 2005.
- [84] L Bito, H Davson, E Levin, M Murray, and N Snider. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *Journal of neurochemistry*, 13(11) :1057–1067, 1966.
- [85] Peng Song, Neil D Hershey, Omar S Mabrouk, Thomas R Slaney, and Robert T Kennedy. Mass spectrometry “sensor” for in vivo acetylcholine monitoring. *Analytical chemistry*, 84(11) :4659–4664, 2012.
- [86] AD Smith, RJ Olson, and JB Justice Jr. Quantitative microdialysis of dopamine in the striatum : effect of circadian variation. *Journal of neuroscience methods*, 44(1) :33–41, 1992.
- [87] Keiko Kanamori and Brian D Ross. Quantitative determination of extracellular glutamine concentration in rat brain, and its elevation in vivo by system a transport inhibitor, α -(methylamino) isobutyrate. *Journal of neurochemistry*, 90(1) :203–210, 2004.
- [88] JM Habicht, T Wolff, H Langemann, and P Stulz. Intraoperative and postoperative microdialysis measurement of the human heart—feasibility and initial results. *Swiss surgery= Schweizer Chirurgie= Chirurgie suisse= Chirurgia svizzera*, pages 26–30, 1998.
- [89] Suiling Zhang, Yajun Shi, Lizhi Tang, Jing Wang, Dongyan Guo, Mei Wang, and Xiaofei Zhang. Evaluation of brain targeting in rats of salvianolic acid b nasal delivery by the microdialysis technique. *Xenobiotica*, 48(8) :851–859, 2018.

- [90] Isaac Phang, Argyro Zoumprouli, Marios C Papadopoulos, and Samira Saadoun. Microdialysis to optimize cord perfusion and drug delivery in spinal cord injury. *Annals of neurology*, 80(4) :522–531, 2016.
- [91] Anne Paavola, Christopher M Bernards, and Per H Rosenberg. Controlled release ibuprofen-poloxamer gel for epidural use—a pharmacokinetic study using microdialysis in pigs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 108 :180–186, 2016.
- [92] Kay D Rittenhouse and Gary M Pollack. Microdialysis and drug delivery to the eye. *Advanced drug delivery reviews*, 45(2-3) :229–241, 2000.
- [93] Kim Thorsen, Anders O Kristoffersson, Ulf H Lerner, and Ronny P Lorentzon. In situ microdialysis in bone tissue. stimulation of prostaglandin e2 release by weight-bearing mechanical loading. *The Journal of clinical investigation*, 98(11) :2446–2449, 1996.
- [94] E Vargas, MA Ruiz, S Campuzano, AJ Reviejo, and JM Pingarrón. Non-invasive determination of glucose directly in raw fruits using a continuous flow system based on microdialysis sampling and amperometric detection at an integrated enzymatic biosensor. *Analytica chimica acta*, 914 :53–61, 2016.
- [95] Basinc. Probes and guide cannulas. <https://www.basinc.com/microdialysis-probes>, September 2018.
- [96] Harvardapparatus. Probes and guide. <https://www.harvardapparatus.com/microdialysis-cma/probes-and-guides.html>, September 2018.
- [97] Helen Rea and Brian Kirby. A review of cutaneous microdialysis of inflammatory dermatoses. *Acta Dermato-Venereologica*, 99(11-12) :945–952, 2019.
- [98] Robert T Kennedy, Hyeun Joong Yoon, Thitaphat Ngernsutivorakul, and Woong Hee Lee. Microfabrication of a microdialysis probe with nanoporous membrane, September 27 2018. US Patent App. 15/764,124.
- [99] Heinz-Helmut Perkampus. *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [100] Pavan M. V. Raja & Andrew R. Barron. Uv-visible spectroscopy. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_\(Barron\)/04%3A_Chemical_Speciation/4.04%3A_UV-Visible_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/04%3A_Chemical_Speciation/4.04%3A_UV-Visible_Spectroscopy), Aout 2021.
- [101] Olivier Thomas and Christopher Burgess. *UV-visible spectrophotometry of water and wastewater*. Elsevier, 2017.
- [102] Rouessac Francis and R Annick. Analyse chimique : Méthodes et techniques instrumentales modernes. *Dunod, Paris*, 2000.

- [103] Aline Gratien. *Spectroscopie ultraviolet-visible et infrarouge de molécules clés atmosphériques*. PhD thesis, Université Paris-Est, 2008.
- [104] P Bouchareine. Spectrométrie instrumentale. In *Collection de la Société Française d'Optique*, volume 5, pages 179–212. EDP Sciences, 1997.
- [105] Sanjay M. Nilapwar, Maria Nardelli, Hans V. Westerhoff, and Malkhey Verma. Chapter four - absorption spectroscopy. In Daniel Jameson, Malkhey Verma, and Hans V. Westerhoff, editors, *Methods in Systems Biology*, volume 500 of *Methods in Enzymology*, pages 59–75. Academic Press, 2011.
- [106] Fellipy S Rocha, Anderson J Gomes, Claire N Lunardi, Serge Kaliaguine, and Gregory S Patience. Experimental methods in chemical engineering : Ultraviolet visible spectroscopy—uv-vis. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 96(12) :2512–2517, 2018.
- [107] MJ Martelo-Vidal and M Vázquez. Determination of polyphenolic compounds of red wines by uv–vis–nir spectroscopy and chemometrics tools. *Food chemistry*, 158 :28–34, 2014.
- [108] Raffaella Boggia, Maria Chiara Casolino, Vilma Hysenaj, Paolo Oliveri, and Paola Zunin. A screening method based on uv–visible spectroscopy and multivariate analysis to assess addition of filler juices and water to pomegranate juices. *Food chemistry*, 140(4) :735–741, 2013.
- [109] D Cozzolino, WU Cynkar, N Shah, and P Smith. Multivariate data analysis applied to spectroscopy : Potential application to juice and fruit quality. *Food Research International*, 44(7) :1888–1896, 2011.
- [110] Francieli CGBS Alves, Aline Coqueiro, Paulo H Março, and Patrícia Valderrama. Evaluation of olive oils from the mediterranean region by uv–vis spectroscopy and independent component analysis. *Food chemistry*, 273 :124–129, 2019.
- [111] Urijatan Teixeira de Carvalho Polari Souto, Mayara Ferreira Barbosa, Hebertty Vieira Dantas, Aline Santos de Pontes, Wellington da Silva Lyra, Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz, Mário César Ugulino de Araújo, and Edvan Cirino da Silva. Identification of adulteration in ground roasted coffees using uv–vis spectroscopy and spa-lda. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2) :1037–1041, 2015.
- [112] Sander Gorog. *Ultraviolet-Visible Spectrophotometry in Pharmaceutical Analysis : 0*. CRC press, 2018.
- [113] Shimwe Dominique Niyonambaza, Praveen Kumar, Paul Xing, Jessy Mathault, Paul De Koninck, Elodie Boisselier, Mounir Boukadoum, and Amine Miled. A review of neurotransmitters sensing methods for neuro-engineering research. *Applied Sciences*, 9(21) :4719, 2019.

- [114] Dan Wen, Wei Liu, Anne-Kristin Herrmann, Danny Haubold, Matthias Holzschuh, Frank Simon, and Alexander Eychmüller. Simple and sensitive colorimetric detection of dopamine based on assembly of cyclodextrin-modified au nanoparticles. *Small*, 12(18) :2439–2442, 2016.
- [115] Shimwe Dominique Niyonambaza, Elodie Boisselier, Mounir Boukadoum, and Amine Miled. A compact visible light spectrometer for molecular detection with spherical gold nanoparticles. In *2019 41st Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, pages 1058–1061. IEEE, 2019.
- [116] Jafar Soleymani. Advanced materials for optical sensing and biosensing of neurotransmitters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 72 :27–44, 2015.
- [117] Chandrasekaran Nivedhini Iswarya, SCG Kiruba Daniel, and Muthusamy Sivakumar. Studies on l-histidine capped ag and au nanoparticles for dopamine detection. *Materials Science and Engineering : C*, 75 :393–401, 2017.
- [118] Dixit N Sathyanarayana. *Vibrational spectroscopy : theory and applications*. New Age International, 2015.
- [119] *Introduction to Vibrational Spectroscopy*, chapter 1, pages 1–18. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [120] Peter R Griffiths and James A De Haseth. *Fourier transform infrared spectrometry*, volume 171. John Wiley & Sons, 2007.
- [121] Gyfcats. 3d animation of vibrations in infrared spectroscopy. <https://gyfcats.com/fr/jitterylegitimatearachnid>, Aout 2021.
- [122] Neena Jaggi and DR Vij. Fourier transform infrared spectroscopy. In *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*, pages 411–450. Springer, 2006.
- [123] Sevgi Türker-Kaya and Christian W Huck. A review of mid-infrared and near-infrared imaging : principles, concepts and applications in plant tissue analysis. *Molecules*, 22(1) :168, 2017.
- [124] *Other Components of FT-IR Spectrometers*, chapter 6, pages 143–160. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [125] Peter R Griffiths and Christopher Homes. Instrumentation for far infrared spectroscopy. Technical report, Brookhaven National Lab., Upton, NY (US), 2001.
- [126] Walter M Doyle. Principles and applications of fourier transform infrared (ftir) process analysis. *Process control and quality*, 2(1) :11–41, 1992.
- [127] Neena Jaggi and D.R. Vij. *FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY*, pages 411–450. Springer US, Boston, MA, 2006.

- [128] *Theoretical Background*, chapter 2, pages 19–55. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [129] Mohamed Azuwa Mohamed, J Jaafar, AF Ismail, MHD Othman, and MA Rahman. Fourier transform infrared (ftir) spectroscopy. In *Membrane Characterization*, pages 3–29. Elsevier, 2017.
- [130] Mirta R Alcaraz, Andreas Schwaighofer, Christian Kristament, Georg Ramer, Markus Brandstetter, Hector Goicoechea, and Bernhard Lendl. External-cavity quantum cascade laser spectroscopy for mid-ir transmission measurements of proteins in aqueous solution. *Analytical chemistry*, 87(13) :6980–6987, 2015.
- [131] Jianfeng Zhou, Anna-Lena Sahlberg, H Nilsson, Edvin Lundgren, and Johan Zetterberg. Non-intrusive detection of methanol in gas phase using infrared degenerate four-wave mixing. *Applied Physics B*, 121(2) :123–130, 2015.
- [132] G Budinova, J Salva, and K Volka. Application of molecular spectroscopy in the mid-infrared region to the determination of glucose and cholesterol in whole blood and in blood serum. *Applied Spectroscopy*, 51(5) :631–635, 1997.
- [133] Elodie Scaglia, Ganesh D Sockalingum, Juergen Schmitt, Cyril Gobinet, Nathalie Schneider, Michel Manfait, and Gérard Thiéfin. Noninvasive assessment of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis c using serum fourier transform infrared spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(9) :2919, 2011.
- [134] Matthew J Baker, Júlio Trevisan, Paul Bassan, Rohit Bhargava, Holly J Butler, Konrad M Dorling, Peter R Fielden, Simon W Fogarty, Nigel J Fullwood, Kelly A Heys, et al. Using fourier transform ir spectroscopy to analyze biological materials. *Nature protocols*, 9(8) :1771, 2014.
- [135] Organic Chemistry Lab Staff. Ir spectrum acquisition. <https://www.orgchemboulder.com/Technique/Procedures/IR/index.shtml>, Aout 2021.
- [136] *Specular Reflection*, chapter 13, pages 277–301. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [137] *Microspectroscopy and Imaging*, chapter 14, pages 303–320. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [138] MJ Nasse, S Ratti, M Giordano, and CJ Hirschmugl. Demountable liquid/flow cell for in vivo infrared microspectroscopy of biological specimens. *Applied spectroscopy*, 63(10) :1181–1186, 2009.
- [139] L Vaccari, G Birarda, G Greci, S Pacor, and L Businaro. Synchrotron radiation infrared microspectroscopy of single living cells in microfluidic devices : advantages, disadvantages and future perspectives. In *Journal of Physics : Conference Series*, volume 359, page 012007. IOP Publishing, 2012.

- [140] Menashi A Cohenford and Basil Rigas. Cytologically normal cells from neoplastic cervical samples display extensive structural abnormalities on ir spectroscopy : implications for tumor biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(26) :15327–15332, 1998.
- [141] Ali Tfayli, Olivier Piot, Anne Durlach, Philippe Bernard, and Michel Manfait. Discriminating nevus and melanoma on paraffin-embedded skin biopsies using ftir microspectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1724(3) :262–269, 2005.
- [142] Ellen J Swain Marcsisin, Christina M Uttero, Miloš Miljković, and Max Diem. Infrared microspectroscopy of live cells in aqueous media. *Analyst*, 135(12) :3227–3232, 2010.
- [143] Michael J Walsh, Matthew J German, Maneesh Singh, Hubert M Pollock, Azzedine Hammiche, Maria Kyrgiou, Helen F Stringfellow, Evangelos Paraskevaïdis, Pierre L Martin-Hirsch, and Francis L Martin. Ir microspectroscopy : potential applications in cervical cancer screening. *Cancer letters*, 246(1-2) :1–11, 2007.
- [144] Andrea K appler, Dieter Fischer, Sonja Oberbeckmann, Gerald Schernewski, Matthias Labrenz, Klaus-Jochen Eichhorn, and Brigitte Voit. Analysis of environmental microplastics by vibrational microspectroscopy : Ftir, raman or both ? *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(29) :8377–8391, 2016.
- [145] F Paquet-Mercier, M Safdar, M Parvinzadeh, and J Greener. Emerging spectral microscopy techniques and applications to biofilm detection. *Microscopy : Advances in Scientific Research and Education*, pages 638–649, 2014.
- [146] *Attenuated Total Reflection*, chapter 15, pages 321–348. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [147] Stefanie E Glassford, Bernadette Byrne, and Sergei G Kazarian. Recent applications of atr ftir spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(12) :2849–2858, 2013.
- [148] Christian W Huck. Advances of infrared spectroscopy in natural product research. *Phytochemistry Letters*, 11 :384–393, 2015.
- [149] Amandine C elino, Olivier Gonçalves, Frédéric Jacquemin, and Sylvain Fr eour. Utilisation de la spectrométrie infrarouge pour une quantification rapide du taux d’humidité dans des fibres végétales. *Revue des composites et des matériaux avanc es*, 24(1) :81–95, 2014.
- [150] Ruth Ch ercoles Asensio, Margarita San Andr es Moya, José Manuel de la Roja, and Marisa Gómez. Analytical characterization of polymers used in conservation and restoration by atr-ftir spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(7) :2081–2096, 2009.

- [151] KLA Chan, SG Kazarian, A Mavraki, and DR Williams. Fourier transform infrared imaging of human hair with a high spatial resolution without the use of a synchrotron. *Applied spectroscopy*, 59(2) :149–155, 2005.
- [152] Sergei G Kazarian, KL Andrew Chan, Veronique Maquet, and Aldo R Boccaccini. Characterisation of bioactive and resorbable polylactide/bioglass® composites by ftir spectroscopic imaging. *Biomaterials*, 25(18) :3931–3938, 2004.
- [153] Gregory N Okolo, Hein WJP Neomagus, Raymond C Everson, Mokone J Roberts, John R Bunt, Richard Sakurovs, and Jonathan P Mathews. Chemical–structural properties of south african bituminous coals : Insights from wide angle xrd–carbon fraction analysis, atr–ftir, solid state 13c nmr, and hrtem techniques. *Fuel*, 158 :779–792, 2015.
- [154] Arjunan Suganya, Gurusamy Shanmugavelayutham, and Carmen Serra Rodríguez. Study on plasma pre-functionalized pvc film grafted with tio2/pvp to improve blood compatible and antibacterial properties. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 50(14) :145402, 2017.
- [155] *Diffuse Reflection*, chapter 16, pages 349–362. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [156] Peter R Griffiths and Donald J Dahm. Continuum and discontinuum theories of diffuse reflection. In *Handbook of near-infrared analysis*, pages 39–82. CRC Press, 2007.
- [157] *Fourier Transforms*, chapter 4, pages 75–95. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [158] James W Cooley and John W Tukey. An algorithm for the machine calculation of complex fourier series. *Mathematics of computation*, 19(90) :297–301, 1965.
- [159] *Data Processing*, chapter 10, pages 225–250. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [160] *Quantitative Analysis*, chapter 9, pages 197–224. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [161] Diletta Ami, Antonino Natalello, Paolo Mereghetti, Tui Neri, Mario Zanoni, Manuela Monti, Silvia Maria Doglia, and Carlo Alberto Redi. Ft-ir spectroscopy supported by pca–lda analysis for the study of embryonic stem cell differentiation. *Journal of Spectroscopy*, 24(1-2) :89–97, 2010.
- [162] Céline Daher. *Analyse par spectroscopies Raman et infrarouge de matériaux naturels organiques issus d’objets du patrimoine : méthodologies et applications*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2012.
- [163] *Fourier Transform Raman Spectrometry*, chapter 18, pages 375–393. John Wiley & Sons, Ltd, 2007.
- [164] Metrohm. Spectroscopie raman : exemples tirés de l’industrie des matériaux chimiques, polymères, produits alimentaires, et de la construction. <https://www.metrohm.com/fr-fr/soci%C3%A9t%C3%A9/news/news-applications-en-spectroscopie-raman/>, September 2018.

- [165] Dale E. Baker and Norman H. Suhr. Atomic absorption and flame emission spectrometry, 1983.
- [166] Zofia Kowalewska. Feasibility of high-resolution continuum source flame molecular absorption spectrometry for silicon determination in organic solutions via the sio molecule. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33(2) :260–273, 2018.
- [167] G Vilmart, N Dorval, M Orain, D Lambert, R Devillers, Y Fabignon, B Attal-Tretout, and A Bresson. Detection of iron atoms by emission spectroscopy and laser-induced fluorescence in solid propellant flames. *Applied optics*, 57(14) :3817–3828, 2018.
- [168] Khaja Muneeruddin, John J Thomas, Paul A Salinas, and Igor A Kaltashov. Characterization of small protein aggregates and oligomers using size exclusion chromatography with online detection by native electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 86(21) :10692–10699, 2014.
- [169] Nadia Altaee, Mohanad Jawad Kadhim, and Imad Hadi Hameed. Detection of volatile compounds produced by pseudomonas aeruginosa isolated from uti patients by gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, 7(6) :8–24, 2017.
- [170] Gary L Glish and Richard W Vachet. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature reviews drug discovery*, 2(2) :140–150, 2003.
- [171] Sagar Aryal. Nuclear magnetic resonance (nmr) spectroscopy. <https://microbenotes.com/nuclear-magnetic-resonance-nmr-spectroscopy/>, Aout 2021.
- [172] Raghvendra Kumar Mishra, Jayesh Cherusseri, Anjali Bishnoi, and Sabu Thomas. Nuclear magnetic resonance spectroscopy. In *Spectroscopic methods for nanomaterials characterization*, pages 369–415. Elsevier, 2017.
- [173] Charlotte Lussey-Lepoutre, Alexandre Bellucci, Aurélie Morin, Alexandre Buffet, Laurence Amar, Maxime Janin, Chris Ottolenghi, Franck Zinzindohoué, Gwennhael Autret, Nelly Burnichon, et al. In vivo detection of succinate by magnetic resonance spectroscopy as a hallmark of sdhx mutations in paraganglioma. *Clinical Cancer Research*, 22(5) :1120–1129, 2016.
- [174] C Müller, X Kong, J-M Cai, K Melentijević, A Stacey, M Markham, D Twitchen, J Isoya, S Pezzagna, J Meijer, et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy with single spin sensitivity. *Nature communications*, 5 :4703, 2014.
- [175] Igor Lovchinsky, AO Sushkov, E Urbach, NP de Leon, Soonwon Choi, Kristiaan De Greve, R Evans, R Gertner, E Bersin, C Müller, et al. Nuclear magnetic resonance detection and spectroscopy of single proteins using quantum logic. *Science*, 351(6275) :836–841, 2016.

- [176] Centre intégré en neuroimagerie et neurostimulation de Québec. Imagerie par résonance magnétique. <http://www.cinq.ulaval.ca/IRM>, Aout 2021.
- [177] Alina N Sekretaryova, Mikhail Yu Vagin, Anthony PF Turner, and Mats Eriksson. Electrocatalytic currents from single enzyme molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 138(8) :2504–2507, 2016.
- [178] Pu Wang, Ming Xia, Owen Liang, Ke Sun, Aaron F Cipriano, Thomas Schroeder, Huinan Liu, and Ya-Hong Xie. Label-free sers selective detection of dopamine and serotonin using graphene-au nanopyramid heterostructure. *Analytical chemistry*, 87(20) :10255–10261, 2015.
- [179] Bankim J Sanghavi, Walter Varhue, Ali Rohani, Kuo-Tang Liao, Lindsay AL Bazydlo, Chia-Fu Chou, and Nathan S Swami. Ultrafast immunoassays by coupling dielectrophoretic biomarker enrichment in nanoslit channel with electrochemical detection on graphene. *Lab on a Chip*, 15(24) :4563–4570, 2015.
- [180] K. Scott. 2 - electrochemical principles and characterization of bioelectrochemical systems. In Keith Scott and Eileen Hao Yu, editors, *Microbial Electrochemical and Fuel Cells*, pages 29–66. Woodhead Publishing, Boston, 2016.
- [181] K Smolinska-Kempisty, O Sheej Ahmad, A Guerreiro, K Karim, Elena Piletska, and S Piletsky. New potentiometric sensor based on molecularly imprinted nanoparticles for cocaine detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 96 :49–54, 2017.
- [182] Rongning Liang, Jiawang Ding, Shengshuai Gao, and Wei Qin. Mussel-inspired surface-imprinted sensors for potentiometric label-free detection of biological species. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(24) :6833–6837, 2017.
- [183] Yingjie Yu, Qi Zhang, Jonathan Buscaglia, Chung-Chueh Chang, Ying Liu, Zhenhua Yang, Yichen Guo, Yantian Wang, Kalle Levon, and Miriam Rafailovich. Quantitative real-time detection of carcinoembryonic antigen (cea) from pancreatic cyst fluid using 3-d surface molecular imprinting. *Analyst*, 141(14) :4424–4431, 2016.
- [184] KL Andrew Chan, Shelly Gulati, Joshua B Edel, Andrew J de Mello, and Sergei G Kazarian. Chemical imaging of microfluidic flows using atr-ftir spectroscopy. *Lab on a Chip*, 9(20) :2909–2913, 2009.
- [185] Producteurs et productrices acéricoles du Québec. Record exports in 2018. <http://ppaq.ca/en/>. Online ; accessed 23 April 2019.
- [186] Agriculture and Agri-Food Canada. Statistical overview of the canadian maple industry 2015. <http://www.agr.gc.ca/eng/industry-markets-and-trade/canadian-agri-food-sector-intelligence/horticulture/horticulture-sector-reports/statistical-overview-of-the-canadian-maple-industry-2017/?id=1524607854094/>. Online ; accessed 23 April 2019.

- [187] Timothy D Perkins and Abby K van den Berg. Maple syrup—production, composition, chemistry, and sensory characteristics. *Advances in food and nutrition research*, 56 :101–143, 2009.
- [188] Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Maple syrup density measurement. <http://www.omafra.gov.on.ca/english/food/inspection/maple/mple-guidance-S1-1-4.htm> Online; accessed 23 April 2019.
- [189] David W Ball. The chemical composition of maple syrup. *Journal of chemical Education*, 84(10) :1647, 2007.
- [190] Kathryn Hopkins. *Maple syrup quality control manual*, volume 7038. University of Maine Cooperative Extension, 2008.
- [191] Hiroyuki Takano. Investigation of chemical and physical properties of southwestern wisconsin maple syrup. 2006.
- [192] Miuța Filip, Mihaela Vlassa, Virginia Coman, and Adela Halmagyi. Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the hplc–ri optimized method. *Food chemistry*, 199 :653–659, 2016.
- [193] Yongqiang Liu, Kenneth N Rose, Nicholas A DaSilva, Shelby L Johnson, and Navindra P Seeram. Isolation, identification, and biological evaluation of phenolic compounds from a traditional north american confectionery, maple sugar. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(21) :4289–4295, 2017.
- [194] Kuanrong Zhu. *Fingerprinting Maple Syrup by Vibrational Spectroscopy and Pattern Recognition*. PhD thesis, The Ohio State University, 2019.
- [195] L Lagacé, C Girouard, J Dumont, J Fortin, and D Roy. Rapid prediction of maple syrup grade and sensory quality by estimation of microbial quality of maple sap using atp bioluminescence. *Journal of food science*, 67(5) :1851–1854, 2002.
- [196] Alain Clément, Luc Lagacé, and Bernard Panneton. Assessment of maple syrup physico-chemistry and typicity by means of fluorescence spectroscopy. *Journal of food engineering*, 97(1) :17–23, 2010.
- [197] Samantha L Frasz and J David Miller. Fungi in ontario maple syrup & some factors that determine the presence of mold damage. *International journal of food microbiology*, 207 :66–70, 2015.
- [198] James Joseph Schumacher and Angela Kristine Murphy Schumacher. Liquid density measuring device, November 14 2017. US Patent 9,816,908.
- [199] Chaoyun Chen, Jintao Wang, Zhihao Li, and Peiman Zhang. Study of glass hydrometer calibration by hydrostatic weighting. In *Seventh International Symposium on Precision*

- Mechanical Measurements*, volume 9903, page 99030N. International Society for Optics and Photonics, 2016.
- [200] Simon Goisser, Julius Krause, Michael Fernandes, and Heike Mempel. Determination of tomato quality attributes using portable nir-sensors. In *OCM 2019-Optical Characterization of Materials : Conference Proceedings*, page 1. KIT Scientific Publishing, 2019.
- [201] Al Lens. *Optics, retinoscopy, and refractometry*. Slack Incorporated, 2005.
- [202] Canadian Grade Compendium. Canadian food inspection agency. <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/acts-and-regulations/list-of-acts-and-regulations/documents-incorporated-by-reference/canadian-grade-compendium-volume-7/eng/1521118355767/1521118356469?chap=0>. Online; accessed 23 April 2019.
- [203] Amine Miled, Jesse Greener, KARA Adnane, and Jessy Mathault. Electroanalytical imaging methods and devices involving a substrate with an array of electrodes, August 16 2018. US Patent App. 15/891,797.
- [204] Jessy Mathault, Dominic Grenier, and Amine Miled. Counter/reference-based potentiostat architecture analysis and comparison. In *2017 15th IEEE International New Circuits and Systems Conference (NEWCAS)*, pages 201–204. IEEE, 2017.
- [205] Canadian Food Inspection Agency. General Requirements.
- [206] Joan R. Walker. Carbohydrate consumption and diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, 23(2) :143–149, 1964.
- [207] S Herschdoerfer. *Quality control in the food industry*, volume 2. Elsevier, 2012.
- [208] George A Bray and Barry M Popkin. Dietary sugar and body weight : have we reached a crisis in the epidemic of obesity and diabetes ? : health be damned ! pour on the sugar. *Diabetes care*, 37(4) :950–956, 2014.
- [209] David S Ludwig, Karen E Peterson, and Steven L Gortmaker. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity : a prospective, observational analysis. *The Lancet*, 357(9255) :505–508, 2001.
- [210] Roger C Pettersen. Wood sugar analysis by anion chromatography. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 11(4) :495–501, 1991.
- [211] Jiannong Ye and Richard P Baldwin. Determination of carbohydrates, sugar acids and alditols by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode. *Journal of Chromatography A*, 687(1) :141–148, 1994.
- [212] Iola F Duarte, António Barros, Ivonne Delgadillo, Cláudia Almeida, and Ana M Gil. Application of ftir spectroscopy for the quantification of sugars in mango juice as a

- function of ripening. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11) :3104–3111, 2002.
- [213] S Garrigues, FJ Rambla, and M De la Guardia. Comparative study of reflectance cells for pls-ftir determination of sugars in soft drinks. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 362(1) :137–140, 1998.
- [214] B Roig, C Gonzalez, and O Thomas. Measurement of dissolved total nitrogen in wastewater by uv photooxidation with peroxodisulphate. *Analytica chimica acta*, 389(1-3) :267–274, 1999.
- [215] B Roig, C Gonzalez, and O Thomas. Simple uv/uv-visible method for nitrogen and phosphorus measurement in wastewater. *Talanta*, 50(4) :751–758, 1999.
- [216] Katrien Beullens, Dmitriy Kirsanov, Joseph Irudayaraj, Alisa Rudnitskaya, Andrey Legin, Bart M Nicolai, and Jeroen Lammertyn. The electronic tongue and atr-ftir for rapid detection of sugars and acids in tomatoes. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 116(1-2) :107–115, 2006.
- [217] F Bosch Reig, JV Gimeno Adelantado, and MCM Moya Moreno. Ftir quantitative analysis of calcium carbonate (calcite) and silica (quartz) mixtures using the constant ratio method. application to geological samples. *Talanta*, 58(4) :811–821, 2002.
- [218] Dongari Nagaraju and Shang-Da Huang. Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction with gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161(1-2) :89–97, 2007.
- [219] Juan M Coronado, Sho Kataoka, Isabel Tejedor-Tejedor, and Marc A Anderson. Dynamic phenomena during the photocatalytic oxidation of ethanol and acetone over nanocrystalline tio₂ : simultaneous ftir analysis of gas and surface species. *Journal of Catalysis*, 219(1) :219–230, 2003.
- [220] Cecilie Ro/nne, Lars Thrane, Per-Olof Åstrand, Anders Wallqvist, Kurt V Mikkelsen, and So/ren R Keiding. Investigation of the temperature dependence of dielectric relaxation in liquid water by thz reflection spectroscopy and molecular dynamics simulation. *The Journal of chemical physics*, 107(14) :5319–5331, 1997.
- [221] SG Kazarian and KLA Chan. Applications of atr-ftir spectroscopic imaging to biomedical samples. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(7) :858–867, 2006.
- [222] Sergei G Kazarian and KL Andrew Chan. Atr-ftir spectroscopic imaging : recent advances and applications to biological systems. *Analyst*, 138(7) :1940–1951, 2013.
- [223] Ahmad R Shahverdi, Sara Minaeian, Hamid Reza Shahverdi, Hossein Jamalifar, and Ashraf-Asadat Nohi. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants

- of enterobacteria : a novel biological approach. *Process Biochemistry*, 42(5) :919–923, 2007.
- [224] Adele Boskey and Nancy Pleshko Camacho. Ft-ir imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials*, 28(15) :2465–2478, 2007.
- [225] Guolan Lu and Baowei Fei. Medical hyperspectral imaging : a review. *Journal of biomedical optics*, 19(1) :010901, 2014.
- [226] Andrew R Hind, Suresh K Bhargava, and Anthony McKinnon. At the solid/liquid interface : Ftir/atr—the tool of choice. *Advances in colloid and interface science*, 93(1-3) :91–114, 2001.
- [227] KT Queeney, MK Weldon, JP Chang, YJ Chabal, AB Gurevich, J Sapjeta, and RL Opila. Infrared spectroscopic analysis of the si/sio₂ interface structure of thermally oxidized silicon. *Journal of Applied Physics*, 87(3) :1322–1330, 2000.
- [228] Richard A Larsen and John Carriker. Development and applications of a sample compartment ftir microscope. *American laboratory*, 39(17) :10–11, 2007.
- [229] Base de données standard de référence NIST. Webbook de chimie nist, srd 69-national institute of standards and technology.
- [230] Medhat Ibrahim, Moussa Alaam, Hanan El-Haes, Abraham F Jalbout, and Aned de Leon. Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Ecletica quimica*, 31(3) :15–21, 2006.
- [231] Stephen D Glasgow, Ryan McPhedrain, Jeanne F Madranges, Timothy E Kennedy, and Edward S Ruthazer. Approaches and limitations in the investigation of synaptic transmission and plasticity. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 11 :20, 2019.
- [232] William Tedjo and Thomas Chen. An integrated biosensor system with a high-density microelectrode array for real-time electrochemical imaging. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems*, 14(1) :20–35, 2019.
- [233] NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL IMAGING and BIOENGINEERING. Nuclear medicine. Online ; accessed 23 April 2020.
- [234] Nathan J Kolla and Sylvain Houle. Single-photon emission computed tomography and positron emission tomography studies of antisocial personality disorder and aggression : a targeted review. *Current psychiatry reports*, 21(4) :24, 2019.
- [235] Ammar Abdo and Mesut Sahin. Feasibility of neural stimulation with floating-light-activated microelectrical stimulators. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems*, 5(2) :179–188, 2011.
- [236] Yu-Chieh Huang, Po-Tsang Huang, Shang-Lin Wu, Yu-Chen Hu, Yan-Huei You, Jr-Ming Chen, Yan-Yu Huang, Hsiao-Chun Chang, Yen-Han Lin, Jeng-Ren Duann, et al.

- Ultrahigh-density 256-channel neural sensing microsystem using tsv-embedded neural probes. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems*, 11(5) :1013–1025, 2017.
- [237] Joohee Jeon, Inseong Hwang, and Taek Dong Chung. Electrochemical detection of neurotransmitters : Toward synapse-based neural interfaces. *Biomedical Engineering Letters*, 6(3) :123–133, 2016.
- [238] Anupriya Baranwal and Pranjal Chandra. Clinical implications and electrochemical biosensing of monoamine neurotransmitters in body fluids, in vitro, in vivo, and ex vivo models. *Biosensors and Bioelectronics*, 121 :137–152, 2018.
- [239] Mohamed Amine Miled and Mohamad Sawan. Dielectrophoresis-based integrated lab-on-chip for nano and micro-particles manipulation and capacitive detection. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems*, 6(2) :120–132, 2012.
- [240] Elizabeth S Bucher and R Mark Wightman. Electrochemical analysis of neurotransmitters. *Annual review of analytical chemistry*, 8 :239–261, 2015.
- [241] Wayne R Matson, P Langlais, L Volicer, PH Gamache, Edward Bird, and KA Mark. n-electrode three-dimensional liquid chromatography with electrochemical detection for determination of neurotransmitters. *Clinical Chemistry*, 30(9) :1477–1488, 1984.
- [242] Jianqing Lu, Feiyi Sun, Hong Ma, Hong Qing, and Yulin Deng. Quantitative detection of dopamine, serotonin and their metabolites in rat model of parkinson’s disease using hplc-ms/ms. In *2015 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation (ICMA)*, pages 1460–1465. IEEE, 2015.
- [243] Richard John Hamilton and Peter Alexis Sewell. Introduction to high performance liquid chromatography. In *Introduction to high performance liquid chromatography*, pages 1–12. Springer, 1982.
- [244] JS Huber, SM Hanrahan, WW Moses, SE Derenzo, BW Reutter, JP O’Neil, and GT Gullberg. Development of a high-sensitivity radiation detector for chromatography. In *2009 IEEE Nuclear Science Symposium Conference Record (NSS/MIC)*, pages 2620–2624. IEEE.
- [245] BenchSci. Western blot detection methods. Online ; accessed 04 Mai 2020.
- [246] Alexandra C Pimentel, AT Pereira, V Chu, DMF Prazeres, and JP Conde. Detection of chemiluminescence using an amorphous silicon photodiode. *IEEE Sensors Journal*, 7(3) :415–416, 2007.
- [247] Li Ma, Tangjuan Zhao, PingPing Zhang, Mengying Liu, Hongmei Shi, and Weijun Kang. Determination of monoamine neurotransmitters and metabolites by high-performance liquid chromatography based on ag (iii) complex chemiluminescence detection. *Analytical Biochemistry*, 593 :113594, 2020.

- [248] Wenyue Gao, Liming Qi, Zhongyuan Liu, Saadat Majeed, Shimeles Addisu Kitte, and Guobao Xu. Efficient lucigenin/thiourea dioxide chemiluminescence system and its application for selective and sensitive dopamine detection. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 238 :468–472, 2017.
- [249] Yaser Dahman. *Nanotechnology and functional materials for engineers*. Elsevier, 2017.
- [250] Lingyu Hong and Kaushik Sengupta. Fully integrated optical spectrometer in visible and near-ir in cmos. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems*, 11(6) :1176–1191, 2017.
- [251] Robert Hans Stavn. Light attenuation in natural waters : Gershun’s law, lambert-beer law, and the mean light path. *Applied optics*, 20(14) :2326_1–2327, 1981.
- [252] Franz Mairinger. The infrared examination of paintings. *Radiation in Art and Archeometry Eds. DC Creagh, DA Bradley, Elsevier*, pages 40–55, 2000.
- [253] R.A. Spragg. Ir spectrometers. In John C. Lindon, editor, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, pages 1048 – 1057. Elsevier, Oxford, 1999.
- [254] Abdullah Chandra Sekhar Talari, Marcela A Garcia Martinez, Zanyar Movasaghi, Shazza Rehman, and Ihtesham Ur Rehman. Advances in fourier transform infrared (ftir) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 52(5) :456–506, 2017.
- [255] Chemical Book. 3-hydroxytyramine hydrochloride product basic information. Online ; accessed 20 Mai 2020.
- [256] Guide Chem. L(+)-ascorbic acid ir spectrum. Online ; accessed 20 Mai 2020.
- [257] Chemical Book. Acetylcholine chloride product basic information. Online ; accessed 20 Mai 2020.
- [258] WebBook de Chimie NIST. 4-aminobutanoic acid. Online ; accessed 20 Mai 2020.
- [259] WebBook de Chimie NIST. L-glutamic acid. Online ; accessed 20 Mai 2020.
- [260] WebBook de Chimie NIST. Glycine. Online ; accessed 20 Mai 2020.