



UNIVERSITÉ DE
SHERBROOKE

Faculté de génie
Département de génie électrique et informatique

CONCEPTION D'UN BIOCAPTEUR BASÉ SUR LA PHOTOLUMINESCENCE DU GaAs (001) POUR LA DÉTECTION DE MICRO-ORGANISMES

Mémoire de maîtrise
Spécialité : Nanobiotechnologies

Valérie DUPLAN

Évaluateurs :

Jan J. DUBOWSKI (directeur de recherche)
Eric H. FROST (codirecteur de recherche)
Serge CHARLEBOIS (membre du jury interne)
Pierre HIERNEAUX (membre du jury externe)



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-91709-1

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-91709-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

RÉSUMÉ

Pendant que la menace potentielle du bioterrorisme augmente, il y a grand besoin d'un outil qui peut détecter les agents biologiques contaminants dans l'environnement de façon rapide, fiable et précise. Par contre, les méthodes traditionnelles utilisées nécessitent l'utilisation de laboratoires d'analyse sophistiquée, souvent dans des installations centralisées, ce qui demande un capital considérable et une main-d'œuvre hautement qualifiée. Il est possible de développer des dispositifs basés sur les biocapteurs à faible coût et très efficace à la détection d'agents biologiques. De plus, ils peuvent être utilisés dans d'autres domaines, au jour le jour, tel pour la surveillance de contaminants dans les produits comestibles.

Dans le but de résoudre ce problème, une nouvelle approche pour la fabrication d'un biocapteur optique a été développée. Celui-ci serait capable de détecter, de façon directe, des micro-organismes qui seraient immobilisés à sa surface plus rapidement et plus aisément qu'avec les méthodes conventionnelles. En effet, les expériences présentées visent la fabrication d'un biocapteur suite à la déposition de molécules biochimiques sur une hétérostructure de GaAs/AlGaAs. Le biocapteur ainsi produit tire parti de la photoluminescence émise par ce semi-conducteur quantique III-V pour la détection de micro-organismes immobilisés spécifiquement et négativement chargés.

La présente recherche est basée sur des techniques novatrices de biocapteurs pour lesquelles il existe peu de littérature. Les travaux expérimentaux et les explications théoriques se révèlent ainsi de nature très exploratoires. Les résultats préliminaires obtenus ont d'ailleurs été similaires aux prédictions initiales. De plus, les détails théoriques et explications physiques permettent de comprendre l'origine des résultats obtenus et d'établir, de manière convaincante, les procédures à suivre pour une architecture optimale.

Je rapporte ainsi l'étude de la bio-fonctionnalisation du GaAs (001) visant l'immobilisation d'anticorps polyclonaux selon deux architectures différentes. De plus, les architectures proposées ont leurs régions actives ouvertes à l'environnement, pour permettre des mesures en continues et, en plus d'être des systèmes offrant la possibilité de multiplexage, offrent un potentiel de mesures en parallèle, pour un grand nombre de mesures en simultanées. Les résultats obtenus démontrent l'immobilisation réussie ainsi que la détection effectuée du virus de l'influenza A et des bactéries *Escherichia coli* et *Legionella pneumophila* respectivement. Enfin, les avantages et les limites de chaque architecture ont ensuite été détaillés.

Mots-clés : monocouche autoassemblée (SAM); thiol polyéthylène-glycol (PEG); GaAs (001); immobilisation spécifique; microscopie de force atomique; microscopie en fluorescence; immunosenseur optique, photoluminescence (PL).

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont au Docteur Jan J. Dubowski, Professeur et codirecteur de recherche à l'Université de Sherbrooke. Je tiens à le remercier de m'avoir accueillie dans son laboratoire pour avoir accepté de codiriger cette thèse en compagnie du Docteur Éric Frost, Professeur et codirecteur de recherche. Je les remercie pour leur encadrement et surtout pour leur aide à modérer de façon juste toutes mes idées et mes travaux. Leur enthousiasme, leurs vastes connaissances dans tous les sujets et leurs compétences m'ont été d'une très grande aide. Merci aux membres du jury pour la correction de ce mémoire, soit le Dr Charlebois et le Dr Hierneaux, je tiens à exprimer ma gratitude d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements les plus profonds vont à tous les membres du groupe de recherche sur les semi-conducteurs quantique (QS-group). Les interactions que j'ai pu établir au cours de ces deux années de thèse ainsi leur grande expertise scientifique ont enrichi mes connaissances tout comme mon intérêt pour la recherche scientifique. Je tiens à remercier tout particulièrement Chan Kyu Kim, Mohammed Walid Hassen ainsi que Palani Arudra, postdoctorats dans le QS-group pour toute l'aide technique ainsi que pour tous les précieux conseils donnés au cours des années que j'ai passées dans le Département de Génie Électrique. Je vous remercie pour votre gentillesse et pour tout l'appui que vous m'avez apporté.

Je remercie le Département de Biologie de la Faculté de Sciences qui ont fourni, avec gentillesse, les cellules bactériennes utilisées dans le cadre de ces travaux. Enfin, je remercie, l'entreprise Magnus pour son support financier ainsi que son intérêt pour le projet.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille, ma mère et mon fiancé pour leur amour et leur support moral tout au long de mes études.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ACRONYMES.....	xi
LISTE DES RÉFÉRENCES.....	122

Chapitre 1. INTRODUCTION	1
Chapitre 2. ÉTAT DE L'ART	7
2.1 Les micro-organismes	7
2.1.1 Les virus	7
2.1.2 Les bactéries	11
2.2 Les méthodes de détection de micro-organismes en milieu aqueux.....	15
2.2.1 Les méthodes conventionnelles.....	16
2.1.1 Les méthodes avant-gardiste	18
2.2 Les biocapteurs	20
2.2.1 Généralités.....	20
2.2.2 Historique et commercialisation des biocapteurs	21
2.3 Le Principe des biocapteurs	23
2.3.1 Les biorécepteurs.....	24
2.3.2 Les transducteurs	27
2.4 L'Arséniure de Gallium	29
2.4.1 La Photoluminescence.....	32
2.4.2 Les puits quantiques	33
2.5 Les méthodes de passivation du GaAs	35
2.5.1 Thiol et SAM.....	36
2.5.2 Nitrure de silicium.....	39
2.6 Les techniques de caractérisation.....	40
2.6.1 Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier	41
2.6.2 La spectroscopie de photoélectrons avec rayon X (XPS).....	41
2.6.3 La microscopie optique	42
2.6.4 Le microscope à force atomique (AFM)	44
2.6.5 Mesures d'angle de contact	45
2.6.6 Cartographe de photoluminescence; Hi-PLM.....	46

2.7	Les charges négatives et la PL.....	47
Chapitre 3. IMMOBILIZATION DE MICRO-ORGANISMES.....		55
Specific immobilization of influenza A virus on GaAs (001) surface.....		57
3.	Introduction.....	59
3.1	Experimental Methods.....	60
3.1.1	Materials.....	60
3.2	Preparation of the Samples.....	61
3.2.1	Interface and Surface Characterization.....	62
3.3	Results and Discussion.....	64
3.3.1	PEG Thiol SAM Formation on GaAs (001).....	64
3.3.2	Surface Morphology and Biofunctionalization.....	65
3.3.3	Fluorescence Tests on Virus Exposed Samples.....	66
3.4	Acknowledgements.....	68
Chapitre 4. CONCEPTION ET RÉALISATION D'UN BIOCAPTEUR BASÉ SUR LA PL.....		69
A photoluminescence-based quantum semiconductor biosensor for rapid <i>in situ</i> detection of <i>Escherichia coli</i>		71
4.	Introduction.....	73
4.1	Experimental procedure.....	74
4.1.1	Materials.....	74
4.1.2	Biofunctionalization of the GaAs (001) surface.....	75
4.1.3	Transducer effect and detection of bacteria using PL emission.....	77
4.1.4	Interface and Surface Characterization.....	78
4.1.5	Optical microscopy.....	79
4.1.6	Atomic Force Microscopy (AFM).....	79
4.1.7	PL signal detection.....	80
4.2	Experimental Results and discussion.....	81
4.2.1	Static contact angle measurements.....	81
4.2.2	Density of immobilized bacteria.....	81
4.2.3	Surface morphology.....	82
4.2.4	Dynamics of bacteria detection observed by PL.....	82
4.3	Conclusion.....	85
4.4	Acknowledgements.....	85
Chapitre 5. DÉTECTION PHOTONIQUE EX-SITU D'ESCHERICHIA COLI BASÉ SUR LA PHOTOLUMINESCENCE D'HÉTÉRO-STRUCTURES ÉPITAXIALES.....		87
5.	Introduction.....	91
5.1	Experimental Section.....	92
5.1.1	GaAs/AlGaAs semiconductor microstructures.....	92
5.1.2	Chemicals.....	92
5.1.3	Preparations.....	93
5.1.4	Bacterial cultures.....	95

5.1.5	Optical microscopy.....	95
5.1.6	Fluorescence Microscopy	96
5.1.7	Transducer effect	96
5.1.8	Biosensing architectures and PL-based detection	96
5.2	Results and Discussion	98
5.2.1	Coverage density	98
5.2.2	Analysis of specificity	99
5.2.3	Bacteria detection	100
5.3	Conclusion	101
5.4	Acknowledgements	102
Chapitre 6. DÉTECTION DE <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> INACTIVÉ		103
6	Résumé	103
6.2	Introduction.....	103
6.3	Matériel et méthodes.....	104
6.3.1	Matériel.....	104
6.3.2	Préparation des échantillons	105
6.3.3	Microscopie optique	105
6.3.4	Microscopie à force atomique	105
6.4	Résultats expérimentaux et discussion	106
6.4.1	Microscopie optique	106
6.4.2	Topographie de surface	106
6.4.3	Mesures de photoluminescence	107
6.5	Conclusion	110
Chapitre 7. CONCLUSION.....		111
7.2	Rappel des objectifs du projet.....	111
7.3	Choix et mise au point du biocapteur	112
7.4	Validation du biocapteur.....	113
7.5	Optimisations futures.....	113
Annex A. SUPPORTING INFORMATION		119
A.	Sample preparation procedures and PL characterization.....	119
a.	GaAs thiolation procedure	119
b.	Aldehydization of the Si ₃ N ₄ coated GaAs/AlGaAs microstructures	119
c.	PL collection procedure	120
B.	Macro and micro-characterization of biosensor surfaces	120
a.	Static contact angle measurements	120
b.	Surface morphology of processed samples	121

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Représentation schématique d'échantillons complètement bio-fonctionnalisés (a) à l'aide de thiols et (b) par réticulation ayant été exposés à une solution de micro-organismes. ...3	3
Figure 2.1 Model en trois dimensions du virus de la grippe <i>Influenza A</i> montrant la structure de différents types d'antigènes présents sur et à l'intérieur de la capsid.10	10
Figure 2.2 Le processus d'inactivation de l'ADN ou l'ARN à l'aide de rayons gamma. Modifié de [48].....11	11
Figure 2.3 Illustrations montrant les différences entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. [modifié de http://en.wikipedia.org/wiki/Gram-positive]13	13
Figure 2.4 La structure d' <i>E. coli</i>14	14
Figure 2.5 La structure de <i>L. pneumophila</i> [modifié de http://microblog.me.uk/90].....15	15
Figure 2.6 Nombre approximatifs d'articles utilisant des techniques différentes pour détecter et/ou d'identifier des bactéries pathogènes. [60].....15	15
Figure 2.7 Représentation d'un ELISA en sandwich avec l'utilisation d'anticorps couplés à la HRP (une enzyme permettant le dosage)18	18
Figure 2.8 (A) Distributions, par domaine d'intérêt, du nombre relatif de travaux publiés dans la littérature sur la détection de bactéries pathogènes. (B) Distribution, par micro-organismes, du nombre relatif d'œuvres paru dans le la littérature sur la détection de bactéries pathogènes. [60]20	20
Figure 2.9 : Schéma des composantes d'un dispositif biocapteur.24	24
Figure 2.10: (a) Structure fondamentale d'un anticorps; (b) Vue rapprochée d'un site de fixation d'un antigène.26	26
Figure 2.11 : Comparaison de la disposition des bandes d'un métal, d'un semi-conducteur et d'un isolant. [modifié de http://solarpower.e-bookz.info/?p=80]30	30
Figure 2.12. Diagramme de bandes d'énergie d'un semi-conducteur montrant (a) la disposition des maximums et des minimums de la bande de valence et de conduction en fonction de l'énergie et du vecteur d'onde de la structure cristalline et (b) la photo-excitation et la recombinaison radiative des porteurs de charge. [modifié de http://people.seas.harvard.edu/~jones/ap216/images/bandgap_engineering/bandgap_engineering.html]32	32
Figure 2.13 Un schéma de la structure de bandes et l'épitaxie d'un puits quantique formé d'aluminium, de gallium et d'arsenic. [modifié de http://www.intenseco.com/technology/]...34	34
Figure 2.14 Configuration géométrique des structures de GaAs utilisées contenant plusieurs puits quantiques. Provenant de la série (a) V0729 et (b) V0802.....35	35
Figure 2.15 Représentations schématiques de (a) liens ballants à la surface cristalline d'un substrat (vue latérale) et (b) de la disposition d'états défectueux en termes d'énergie.36	36
Figure 2.16 Structures (a) chimiques générales du groupement thiol et (b) d'une molécule de thiol complète contenant un groupement fonctionnel, un groupement thiol ainsi qu'une chaîne alkyle. [modifié de http://en.wikipedia.org/wiki/Self-assembled_monolayer]37	37
Figure 2.17 Formation d'une monocouche auto-assemblée sur un support solide.39	39
Figure 2.18 Représentation des bandes d'absorption de différents groupements chimiques en fonction de nombre d'ondes.41	41
[modifié de http://en.wikipedia.org/wiki/File:IR_summary_version_2.gif]41	41

Figure 2.19 Représentations schématiques (a) d'un microscope optique classique et (b) du chemin optique dans un microscope classique avec éclairage épiscopique. [modifié de http://www.kbears.com/sciences/microscopedefinition.html]	43
Figure 2.20. Représentation d'un système de déviation du faisceau, utilisant un laser ainsi qu'une photodiode mesurant la position du faisceau lors de la mesure d'un échantillon.	44
[modifié de http://www.few.vu.nl/~wroos/Research.html].....	44
Figure 2.21 Images schématiques de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur des échantillons hydrophobes et hydrophiles. [modifié de http://www.ramehart.com/contactangle.htm]	45
Figure 2.22 Cartographe de photoluminescence (Hi-PLM)	47
Figure 2.23 Schéma de la structure électronique d'un semi-conducteur de type n (a) ayant un haut degré de courbure de bande et (b) une dé-courbure de bande, avec la ligne verticale de droite indiquant la surface du GaAs.	48
[modifié de http://www.chm.bris.ac.uk/pt/diamond/gustavothesis/chapter5.htm]	48
Figure 2.24 Augmentation de la PL en fonction de l'absorption non-spécifique de molécules chargées négativement.....	49
Figure 2.25 La paroi cellulaire d'une bactérie	50
Gram-négative. [modifié de http://www.thefullwiki.org/Gram_negative_bacteria].....	50
Figure 2.26 Structures chimiques d'un acide téichoïque, montrant un monomère d'acide téichoïque et une liaison phosphodiester.	51
[modifié de http://eglobalmed.com/core/MedicalMicrobiology/gsbs.utmb.edu/microbook/ch002.html]....	51
Figure 2.27 Modulation de la PL, suite à l'absorption spécifique de microbilles chargées en fonction du pH de la solution utilisée. Mesurée en temps réel à l'aide du Hi-PLM en (a) conditions stagnantes et (b) avec un chambre microfluidique.	53
Figure 2.28 Microscopie optique en champ clair obtenu après l'exposition de l'échantillon de GaAs passivé à l'aide de thiols biotine à 6.11×10^8 billes/ml.	53
Figure 3.1 Molecular structure of a) Biotinylated PEG thiol (SH-[CH ₂] ₁₁ -EG ₃ -Biotin), and b) OH-terminated PEG thiol (SH-[CH ₂] ₁₁ -EG ₃ -OH).....	61
Figure 3.2. Schematic illustration of the biofunctionalization steps applied for the immobilization of the Influenza A virus on GaAs (001) substrate (a) that having been etched with NH ₄ OH was passivated using a 2mM solution of mixed PEG thiols (1:15) (b) and incubated in a solution of neutravidin (c). Biotinylated antibodies against Influenza A were immobilized on the neutravidin coated substrate (d), which allowed immobilizing virus particles from a solution (e).....	63
Figure 3.3. FTIR spectra of SAMs deposited on three different GaAs (001) samples (a, b, c) demonstrating the reproducibility of the thiolation process.	64
Figure 3.4. AFM images and cross-sectional scans of a reference GaAs (001) sample (a), the GaAs (001) sample biofunctionalized with PEG thiols and neutravidin (b), and the sample that following the functionalization with the Influenza A antibody was exposed to a solution of inactivated Influenza A virus (c).	66
Figure 3.5. Fluorescence microscopy image of a GaAs (001) sample that following the specific immobilization of the Influenza A virus was exposed to fluorescein stained antibody against the Influenza A virus.	67
Figure 4.1. Schematic illustration of the detection process of a sample (a) functionalized with either (b) SAM and biotin conjugated antibodies, or (c) Si ₃ N ₄ and reticulation of unconjugated antibodies to achieve (d) immobilization of bacteria. The inset schematically depicts the concept of PL-based detection.....	78

Figure 4.2. Example of a bright field optical microscopy image obtained after exposure of the antibody functionalized GaAs samples to 10^6 CFU/ml <i>E. coli</i> (inset: a negative control showing an image of a sample exposed to 10^6 CFU/ml <i>L. lactis</i>).....	82
Figure 4.3. Selected area of the antibody functionalized Si_3N_4 -GaAs/AlGaAs sample that, after the exposure to 10^6 CFU/ml of <i>E. coli</i> solution, shows a bacterium immobilized on the surface.	83
Figure 4.4. Normalized PL intensity dependence observed for different concentrations of bacterial solutions as a function of time for (a) thiol SAM based architectures, and (b) of Si_3N_4 with glutaraldehyde crosslinking architectures.	84
Figure 5. Normalized PL intensity dependence for different concentrations of bacterial solutions observed in-situ with SAM-based architectures. The samples were rinsed after 30 minutes of exposure to the bacteria. The results are shown without subtracting the PBS related signal.....	84
Figure 5.1. Molecular structure of (a) Hexadecanethiol (HDT) and (b) Biotinylated PEG thiol (SH-[CH ₂] ₁₁ -EG3-Biotin) used to fabricate biotin-terminated SAMs.	93
Figure 5.2. Schematic of the detection procedure of immobilized bacteria on biofunctionalized GaAs substrates for the SAM-based architecture. (a) Initial PL intensity measured following functionalization and (b) PL intensity enhanced following bacteria immobilization.	97
Figure 5.3. Estimated surface density of bacteria immobilized on an <i>E. coli</i> antibody-functionalized GaAs using (a) SAM- and (b) Si_3N_4 plus glutaraldehyde-based crosslinking architectures.....	99
Figure 5.4. Fluorescence microscopy image obtained after an <i>E. coli</i> SAM-based antibody functionalized sample was exposed to 10^6 CFU/ml of <i>E. coli</i> and then, to FITC conjugated antibodies against <i>E. coli</i> . (200X Magnification). Inset: an image of a sample exposed to 10^6 CFU/ml <i>L. lactis</i> (the bar indicates a 30 μm length).	100
Figure 5.5. PL intensity observed <i>ex situ</i> for <i>E. coli</i> antibody functionalized samples following their exposure to PBS and different bacterial solutions for (a) SAM- and (b) of Si_3N_4 plus glutaraldehyde-based crosslinking based architectures.....	101
Figure 6.1 Microscopie optique en champ obtenu après l'exposition de l'échantillon de GaAs fonctionnalisé à l'aide d'anticorps à 2×10^5 UFC/ml de <i>L. pneumophila</i>	106
Figure 6.2 Topographie AFM et profil de (A) un échantillon de GaAs (001) bio-fonctionnalisé suite à l'exposition à 10^5 UFC/ml de <i>L. pneumophila</i> et (B), le même échantillon montrant une bactérie immobilisée sur la surface.	108
Figure 6.3 Évolution de la PL en fonction du temps suite à l'exposition <i>in situ</i> d'échantillons fonctionnalisés à 10^8 UFC/ml d' <i>E. coli</i> morts ou vivants. Les échantillons ont été rincés après 30 minutes d'exposition, les résultats sont présentés sans normalisation.	108
Figure 6.4 dépendance intensité PL de différentes concentrations de bactéries en fonction du temps.....	109
Figure 6.5 Dépendance de l'intensité de PL de différentes concentrations de bactéries en fonction du temps. Les échantillons ont été rincés après 30 minutes d'exposition au bactéries, les résultats sont présentés sans normalisation.	110
Figure 7.1 Illustration schématique d'un système micro-fluidique avec un champ électrique intégré.	115
Figure 7.2. Illustration schématique d'une rangée de points quantiques épitaxiaux pour la détection parallèle et rapide de certaines molécules spécifiques.....	117

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 7.1 : Taux de survie des bactéries *E. coli* exposées à la lumière laser 30mW/cm²... 116

LISTE DES ACRONYMES

Acronyme	Définition
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Atomique Force Microscopy <i>ou</i> microscopie à force atomique.
AlGaAs	Arséniure de gallium aluminium
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BSA	Bovine Serum Albumin <i>ou</i> albumine de sérum bovin
UFC	Colony Forming Units <i>ou</i> unités formatrices de colonies
Eau DI	Eau désionisée
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy <i>ou</i> spectroscopie d'impédance électrochimique
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay <i>ou</i> essai d'un immunosorbent lié aux enzymes
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FTIR	Fourier Transformed Infrared Spectroscopy <i>ou</i> spectroscopie infrarouge en transformée de Fourier.
GaAs	Arséniure de gallium
MEB	Microscopie Électronique à Balayage
NA	Numerical aperture <i>ou</i> ouverture numérique
N_{ss}	Surface State Density
PBS	Phosphate Buffer Solution <i>ou</i> solution de tampon phosphate
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
PCR	Polymerase Chain Reaction <i>ou</i> réaction en chaîne par polymérase
PL	Photoluminescence
VIA	Virus de l' <i>Influenza A</i>
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
SAMs	Self-assembled monolayers <i>ou</i> monocouches autoassemblées
Si_3N_4	Nitrure de silicium
SPR	Surface Plasmon Resonance <i>ou</i> Résonance de plasmons de surface
TIR	Total Internal Reflection <i>ou</i> Réflexion totale interne
UG	Unité Génome
QW	Quantum well <i>ou</i> Puit quantique
XPS	XRay Photoelectron Spectroscopy

Chapitre 1. INTRODUCTION

Les tours de refroidissement peuvent être un processus critique dans de nombreuses installations de production industrielle. Elles sont des dispositifs de dissipation de chaleur utilisée pour le transfert de la chaleur résiduelle vers l'atmosphère. Les applications communes incluent le refroidissement de la circulation d'eau utilisée dans les raffineries de pétrole, les usines chimiques, les centrales électriques et de refroidissement du bâtiment. Cependant, lorsque ces tours sont équipées d'un système de recirculation ouverte, des micro-organismes peuvent se propager de l'air à l'eau.[1]

Une tour de refroidissement industrielle peut être le médium parfait pour la croissance microbologique si elle n'est pas correctement traitée. En effet, le pH typique d'une telle tour est maintenu entre 7 et 9, les températures peuvent avoir une large gamme et il y a une concentration en oxygène et en nutriments propice à la prolifération. Les micro-organismes peuvent ainsi rapidement croître et se multiplier quand un nombre de ces conditions sont idéales pour la croissance microbienne.[2] En outre, quand une forte croissance microbienne a lieu, une couche de limon, appelé biofilm, est formé et celui-ci contient à la fois de la matière organique et inorganique. Suite à la formation du biofilm, les micro-organismes peuvent s'y fixer, ceci faisant en sorte que les micro-organismes présents ne seront plus délogés et éliminés par l'eau de refroidissement de la tour.[3] En effet, les biofilms protègent certains micro-organismes de la majorité des désinfectants chimiques. Ceci rend donc la désinfection de l'eau beaucoup plus difficile.[4]

De plus, les contaminants, tels que *Legionella pneumophila*, peuvent être nocifs pour les humains, par exemple, pour le personnel de maintenance entrant en contact avec cette bactérie. L'exemple le plus notable a été l'apparition de la maladie du légionnaire, qui touche les personnes, dans les hôtels, les hôpitaux et autres lieux, qui entrent en contact avec l'air refroidi par un système de

conditionnement d'air contaminé par l'eau d'une tour de refroidissement.[1-5] Par conséquent, le traitement fréquent de l'eau et le suivi est essentiel.

Toutefois, les méthodes actuellement disponibles pour la détection de bactéries, incluant la culture cellulaire,[6] les méthodes immunologiques[7-9] et des méthodes moléculaires,[10] y compris le PCR ne sont pas idéales. Pour de nombreuses bactéries, la culture est la méthode de choix. Cette technique peu coûteuse exige toutefois beaucoup de temps et d'expertise.[11, 12] La méthode de détection traditionnelle pour les *Legionella spp.* se base sur la collecte d'un échantillon d'eau (4 L) qui est concentré à l'aide d'une membrane de 0,45 µm. Cette quantité est ensuite remise en suspension dans un diluant qui est étalée sur un Agar BCYE. Cette bactérie nécessite la présence de cystéine pour croître. Elle ne pousse donc pas sur une gélose au sang communément utilisée en laboratoire pour effectuer des décomptes du nombre total de bactérie viable. C'est seulement après une incubation de 2 semaines que la confirmation de la présence de *Legionella* est confirmée. La confirmation est faite uniquement si les colonies poussant sur le BCYE contenant de la cystéine ne poussent pas sur la gélose sans cystéine ajoutée. Une autre méthode qui est largement utilisée pour la détection de *Legionella spp.* est la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qRT-PCR) en utilisant des sondes spécifiques. Cette alternative utile est nettement plus spécifique, plus sensible et plus rapide, ne prenant que quelques heures.[10-13] Cependant, l'appareillage requis pour effectuer cette technique peut être très coûteux, nécessite du personnel qualifié et d'un laboratoire bien équipé. La nature des tests de PCR ne permet pas de déterminer le ratio entre le nombre de cellules vivantes et mortes qui ont été détectées. Ce qui signifie que l'analyste n'aperçoit pas le niveau réel de menace posée par un résultat positif.

Par conséquent, il est nécessaire de développer des méthodes automatisées de détection qui sont faciles, rapides et précises visant les bactéries, les champignons et diverses toxines. Une telle stratégie n'est possible que par le biais de biocapteurs. Car les méthodes actuelles, couramment utilisées pour les tests de

toxicité, sont généralement effectuées en laboratoire dans des conditions statiques, ce qui rend impossible l'analyse en temps réel.[14-16] Ces capteurs pourraient ensuite être utilisés pour des applications biomédicales telles que le diagnostic médical, l'analyse clinique, voire même les essais sur le terrain. La production de biocapteurs contenant des molécules organiques est une solution prometteuse en raison de la rapidité, la simplicité et la capacité de surveillance en continu qu'ils fournissent.[17] En effet, la surveillance de contaminants environnementaux à l'aide de systèmes automatiques permettant une réponse rapide constitue un des moyens les plus efficaces d'améliorer la qualité de l'environnement. L'analyse en temps réel offre l'avantage de détecter rapidement les sources de pollution ainsi que les contaminants biologiques et de prévenir tout déversement accidentel de ceux-ci.

Le projet présenté concerne l'étude d'une nouvelle approche pour la fabrication d'un biocapteur optique. Celui-ci serait capable de détecter des microorganismes pathogènes qui sont immobilisés à sa surface plus rapidement et plus aisément qu'avec les méthodes conventionnelles. En effet, le type de capteur présenté ici consiste à l'immobilisation d'anticorps spécifiques, par l'intermédiaire de molécules organiques, dans le but de produire un biocapteur optique basé sur la photoluminescence (PL) émise par un hétérostructure de semi-conducteur III-V; plafonné par une fine pellicule de GaAs.

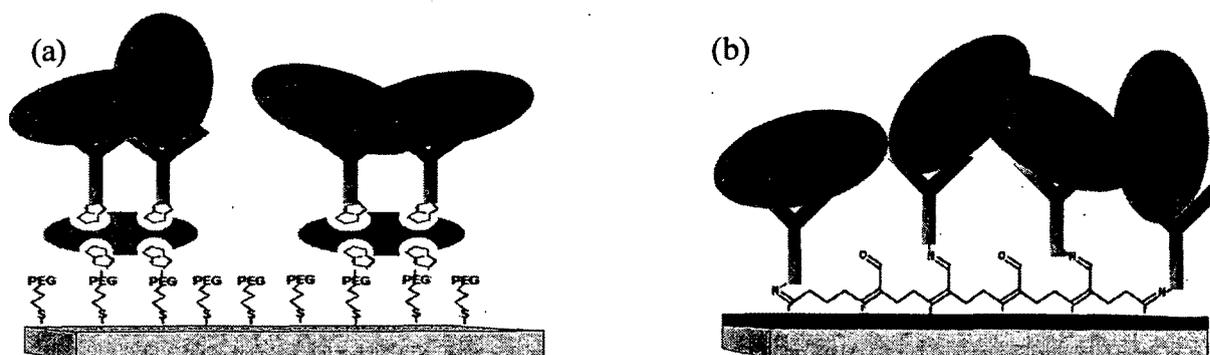


Figure 1.1 Représentation schématique d'échantillons complètement bio-fonctionnalisés (a) à l'aide de thiols et (b) par réticulation ayant été exposés à une solution de micro-organismes.

La détection directe de ces agents pathogènes peut alors être basée sur les propriétés électriques et optiques du substrat utilisé pour la production d'un biocapteur optique.[12] La figure 1.1 illustre les principes de bio-fonctionnalisation utilisés lors de ce projet ainsi que l'immobilisation de micro-organismes. Dans le cadre de ce travail, la détection rapide, efficace et spécifique d'agents pathogènes dans un milieu aqueux sera démontrée en utilisant la PL émise par le GaAs. Deux différentes architectures ont été explorées pour la fonctionnalisation, la stabilisation et l'optimisation du biocapteur optique en milieu aqueux.

En premier lieu, le GaAs a été passivé à l'aide d'une monocouche auto-assemblée (SAM).(Figure 1.1.a)[18] En effet, l'élément clé dans de la création du dispositif optique est l'immobilisation efficace de biomolécules à la surface du capteur. Ceci a été réalisé à l'aide de thiols, un composé qui contient un groupe fonctionnel composé d'un atome de soufre. Les thiols ont la capacité de former des SAMs sur la surface des métaux, tels l'or[19, 20] et des semi-conducteurs, tel le GaAs.[21] En plus de conduire à une amélioration de la PL du signal émis par le GaAs,[22] le dépôt de thiols participe également à la passivation et donc la stabilisation du signal.[23, 24] Par contre, l'extrémité opposée de la molécule doit avoir une forte affinité pour des composés biologiques diverse afin de permettre une fonctionnalisation spécifique.[25, 26] Une variété de thiols a été étudiée à cet effet. En second lieu, la deuxième approche était basée sur une stratégie de modification de surface impliquant le dépôt d'une fine pellicule de Si_3N_4 sur des substrats de GaAs. L'immobilisation d'anticorps polyclonaux a ensuite été réalisée par le biais de fonctionnalisation par réticulation à l'aide de glutaraldehyde.(Figure 1.1.b) L'utilisation de Si_3N_4 permet simultanément de complètement recouvrir le GaAs en le protégeant ainsi de l'environnement tout en maintenant une capacité de fonctionnalisation.[27, 28]

Tout au long de ce projet, la détection rapide et spécifique de bactéries a été effectuée en se basant sur l'intensité de la PL émise par des substrats de GaAs bio-fonctionnalisés. Ceci permettant donc une réduction significative du coût et

du temps nécessaire pour la détection de celles-ci. Plus précisément, la caractérisation du comportement du semi-conducteur face à la présence de pathogènes, en termes de PL, a été faite et quantifiée. Ceci en procédant à l'examen de l'augmentation de la PL émise par des substrats de GaAs lorsque des bactéries y ont été spécifiquement immobilisées en utilisant les architectures proposées dans la figure 1.1. En outre, la procédure de bio-fonctionnalisation du GaAs a été optimisée afin de spécifiquement et sélectivement détecter les bactéries d'intérêt dans un solvant aqueux. En utilisant des concentrations connues de bactéries, la limite de détection du biocapteur a été déterminée et vérifiée à l'aide d'autres techniques telles que la microscopie de force atomique (AFM), la microscopie optique ainsi que la microscopie à fluorescence indirecte (IFA). Enfin, la détection de bactéries en laboratoire; c'est-à-dire dans un environnement stérile a été effectuée. De cette façon, il a été possible de déterminer si une telle méthode de détection est suffisamment efficace pour procéder à la production d'un prototype de biocapteur à être utilisés sur le terrain et dans les baignoires stagnantes.

Ce travail comporte sept chapitres. Le premier chapitre constitue l'introduction. Le deuxième chapitre a pour objectif de présenter les bases théoriques fondamentales nécessaires à une meilleure compréhension des biocapteurs en mettant l'accent sur leurs différentes composantes tels les transducteurs et les biorécepteurs ainsi que sur les principales techniques de détection. Aussi, un rappel bibliographique sur les différents types de fonctionnalisation ainsi que sur les pathogènes utilisés est présenté. Dans le troisième chapitre sont évoquées les méthodes utilisées afin d'immobiliser des particules infectieuses, le virus de l'influenza A, sur des substrats de GaAs. Le quatrième chapitre expose les résultats expérimentaux obtenus lors de l'utilisation du biocapteur optique produit selon les deux architectures présentés pour la détection d'*Escherichia coli* (*E. coli*). Le cinquième chapitre élabore sur la détection d'*E. coli* à l'aide d'échantillons fonctionnalisés pouvant être séchés et mesurés indépendamment de leur incubation. Finalement, le sixième chapitre démontre la détection de *Legionella pneumophila* dans un échantillon d'eau concentré provenant d'une tour

de refroidissement. Le septième chapitre est consacré à la conclusion et une discussion sur la possibilité d'optimisation d'un biocapteur de ce type pour utilisation en industrie.

Bref, les travaux présentés dans ce mémoire portent principalement sur la réalisation d'un biocapteur optique destiné à l'analyse d'interactions biomoléculaires, se produisant à la surface de substrats de GaAs, visant à la détection de divers micro-organismes. Ils sont donc à l'interface entre la physique, la chimie et la biologie. Fondé sur la PL et la bio-fonctionnalisation de surface, ce sujet pluridisciplinaire s'inscrit dans le cadre d'un domaine de recherche en pleine effervescence : les biocapteurs, et plus largement ce qu'on appelle la biophotonique.

Chapitre 2. ÉTAT DE L'ART

2.1 Les micro-organismes

Un micro-organisme est un organisme vivant qui est microscopique; c'est-à-dire, trop petit pour être visibles à l'œil nu. Les micro-organismes sont très divers : ils comprennent les bactéries, les champignons, les archaebactéries, les protistes, les plantes microscopiques (algues vertes) et des animaux tels que le plancton et les planaires. Certains microbiologistes comprennent également les virus, mais d'autres considèrent que ceux-ci sont non-vivants par cause de leur incapacité de se multiplier seul par division.[29] La plupart des micro-organismes sont unicellulaires, mais ce n'est pas universel, puisque certains organismes multicellulaires sont microscopiques, alors que certains protistes unicellulaires et bactéries sont macroscopiques et visibles à l'œil nu.[30]

Les micro-organismes vivent dans toutes les parties de la biosphère où il y a de l'eau liquide, y compris le sol, les sources chaudes, sur le plancher océanique, dans la haute atmosphère et même dans les profondeurs de la croûte terrestre.[31, 32] Les micro-organismes sont essentiels pour le recyclage des nutriments dans les écosystèmes, car ils agissent comme des décomposeurs. De plus, certains micro-organismes peuvent fixer l'azote, ils sont donc une partie vitale du cycle de l'azote, et de récentes études indiquent que les microbes dans l'air pourraient jouer un rôle dans les précipitations et la température.[33, 34] Les microbes sont également exploités en biotechnologie, autant dans la préparation traditionnelle d'aliments et de boissons que dans les technologies modernes basées sur le génie génétique. Cependant, les microbes pathogènes sont nuisibles, car ils envahissent et se développent au sein d'autres organismes, causant des maladies qui tuent soit l'homme, d'autres animaux ou les plantes.[35]

2.1.1 Les virus

Un virus est une entité biologique qui nécessite une cellule hôte, dont il utilise les constituants pour se multiplier. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires. Les virus existent sous une forme extracellulaire ou intracellulaire.

Sous la forme intracellulaire (à l'intérieur de la cellule hôte), les virus sont des éléments génétiques qui peuvent se répliquer de façon indépendante par rapport au chromosome, mais non indépendamment de la cellule hôte. Sous la forme extracellulaire, à l'extérieur de cellules hôte, les virus sont des objets particuliers, infectieux, constitués au minimum d'acide nucléique et de protéines.[36] L'éventail des effets biochimiques et structurels que les virus ont sur la cellule hôte est vaste : ce sont les effets cytopathiques. La plupart des infections de virus entraînent éventuellement la mort de la cellule hôte. Les causes de décès comprennent la lyse cellulaire, des altérations à la membrane de surface de la cellule et de l'apoptose.[37] De plus, la mort cellulaire est souvent causée par la cessation des activités normales de la cellule à cause de l'expression de protéines virales causant la répression de celles-ci.

La plupart des virus sont trop petits pour être vus directement avec un microscope optique. De plus, ils infectent tous les types d'organismes, d'animaux et de plantes allant jusqu'aux bactéries et archeae.[38] Aujourd'hui, il existe environ 5000 virus qui ont été décrits en détail, bien qu'il y ait des millions de types différents.[39] Les virus sont retrouvés dans presque tous les écosystèmes terrestres et sont le type le plus abondant d'entité biologique.[40] Les particules virales (connu sous le nom virions) se composent de deux ou trois parties essentielles: le matériel génétique composé soit par de l'ADN ou de l'ARN, de longues molécules qui transportent l'information génétique; une capsid, protéines «manteau», qui protège ces gènes, et dans certains cas, une enveloppe de lipides qui entoure la capsid quand ils sont en dehors d'une cellule. Les formes de virus vont de simple forme hélicoïdale et icosaédrique à des structures plus complexes. Un virus de taille moyenne mesure environ quelques centaines de nanomètres.[41]

Enfin, les virus sont classés principalement selon leurs caractéristiques phénotypiques, comme leur morphologie, le type d'acide nucléique qu'ils contiennent, leur mode de réplication, les organismes qu'ils infectent ainsi que le type de maladie qu'ils causent.[39] Il existe actuellement deux systèmes

principaux utilisés pour la classification des virus : le système du Comité international de taxonomie des virus (ICTV) et selon le système de classification de Baltimore. Le système utilisé par l'ICTV partage de nombreuses caractéristiques avec le système de classification des organismes cellulaires, telles que la structure taxon.[42] Le classement viral commence au niveau de l'ordre et continu comme suit, avec le taxon suffixes en italique :

- Ordre (— *virales*)
 - Famille (— *viridae*)
 - Sous-Famille (— *virinae*)
 - Genre (— *virus*)
 - Espèce

La classification Baltimore, quant à elle, est un système de classification qui place les virus dans l'un de sept groupes en fonction d'une combinaison de leur acide nucléique (ADN ou ARN), la structure de l'acide nucléique (simple brin ou double brin), la forme de l'acide nucléique (linéaire, circulaire, segmenté ou non) ainsi que le sens et la méthode de répllication.[42]

Dans le cadre de ce travail, le virus utilisé a été celui de l'*Influenza A* (IAV). La grippe (ou *Influenza*) est une maladie infectieuse fréquente et contagieuse causée par deux virus à ARN de la famille des *Orthomyxoviridae* (*Myxovirus influenzae A* et B), touchant les oiseaux et certains mammifères dont le porc et l'être humain. Chez l'homme, cette maladie peut se présentée avec des frissons, la fièvre, les maux de gorge, les douleurs musculaires, les maux de tête sévères, la toux ainsi qu'une fatigue et de l'inconfort général. Les maux de gorge, la fièvre et la toux sont cependant les symptômes les plus fréquents. Dans les cas plus graves, la grippe provoque la pneumonie, qui peut être mortelle, en particulier pour les jeunes enfants et les personnes âgées.[43] En général, la grippe se transmet de façon aérienne par la toux ou les éternuements, créant ainsi des aérosols contenant le virus. La grippe peut également être transmise par contact direct avec les fientes d'oiseaux ou de sécrétions nasales, ou par contact avec des surfaces contaminées.[44]

Par convenance, le virus grippal *Influenza A* est classé en fonction du type de deux de ses protéines de surfaces, en 144 combinaisons possibles (16 hémagglutinines 9 neuraminidases). (Figure 2.1) Ces 144 sous-types semblent tous pouvoir infecter toutes les espèces d'oiseaux, et actuellement six d'entre eux (H_1N_x , H_2N_x ou H_3N_x , ou H_xN_1 ou H_xN_2) ont des caractéristiques leur permettant d'infecter plus facilement l'Homme, situation qui peut évoluer si le virus subit une mutation ou échange ses gènes avec un autre virus grippal *Influenza*. Chaque sous-type peut produire de nombreuses variantes, plus ou moins pathogènes. [45] Le nom H_xN_x (par exemple H_3N_2 ou H_1N_1) fait référence à deux sous-types d'antigènes présents à la surface du virus : l'hémagglutinine de type 3 ou 1 et la neuraminidase de type 2 ou 1 respectivement. Il y a entre trois et cinq millions de cas de maladie grave et jusqu'à 500 000 décès dans le monde, qui selon certaines définitions est une épidémie de grippe chaque année. Bien que l'incidence de la grippe puisse varier considérablement d'année en année, environ 36 000 morts et plus de 200 000 hospitalisations ont été directement liés à la grippe au cours des dernières années aux États-Unis. [43, 46] Périodiquement le sous-type peut changer, provoquant une pandémie qui peut occasionner beaucoup plus de mortalité, surtout chez les jeunes adultes. L'exemple extrême fut la pandémie de 1918/19 qui a tué environ 50,000,000 de personnes.

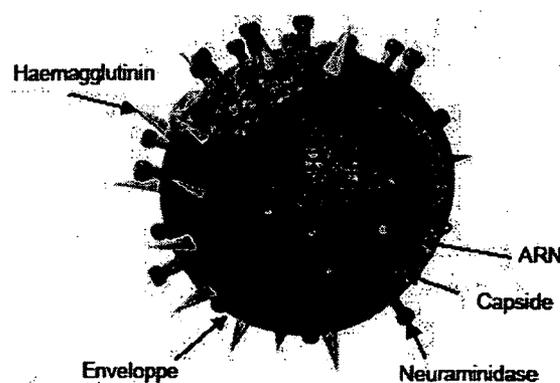


Figure 2.1 Model en trois dimensions du virus de la grippe *Influenza A* montrant la structure de différents types d'antigènes présents sur et à l'intérieur de la capsid.

[modifié de <http://medicineworld.org/news/news-archives/society-news/2106462972-Nov-18-2006.html>]

C'est pourquoi la surveillance des tendances épidémiologiques émergentes, pouvant avoir une importance clinique par rapport au commencement de pandémiques, est primordiale. Dans la présente étude, afin de limiter la contamination de l'espace de travail, des virions inactivés ont été utilisés. Afin d'inactiver les particules virales, l'ARN de celle-ci a été endommagé à l'aide de rayons gamma (γ). Le rayonnement gamma, généralement à partir de cobalt-60 ou Cesium-137, a été fréquemment utilisé pour l'inactivation de réactifs biologiques.[47] L'inactivation du virus est obtenue suite à la détérioration de sa microstructure d'ARN tout en laissant l'enveloppe virale intacte. (Figure 2.2)

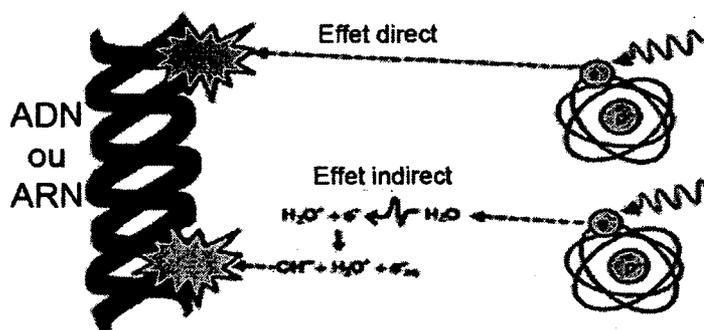


Figure 2.2 Le processus d'inactivation de l'ADN ou l'ARN à l'aide de rayons gamma. Modifié de [48]

2.1.2 Les bactéries

Les bactéries sont, comme les virus, pratiquement toutes invisibles à l'œil nu, à quelques exceptions près, comme *Thiomargarita namibiensis*. [30] Ce sont des micro-organismes procaryotes unicellulaires ayant une taille moyenne de quelques micromètres de longueur. Ils n'ont pas d'organites membranaires, et peuvent fonctionner et se reproduire en tant que cellules individuelles, mais se regroupent souvent en colonies multicellulaires. [49] Leur génome est généralement une seule boucle de l'ADN, mais ils peuvent également héberger de petits morceaux d'ADN appelés plasmides. Ces plasmides peuvent être transférés entre les cellules grâce à la conjugaison bactérienne. Les bactéries sont entourées d'une paroi cellulaire, qui leur fournit une certaine résistance et rigidité. Elles se reproduisent par scissiparité ou parfois par bourgeonnement, mais n'utilisent pas la reproduction sexuée. Aussi, certaines espèces forment des spores extrêmement

résistantes, par contre pour les bactéries il s'agit d'un mécanisme de survie, pas de reproduction. Sous des conditions optimales, les bactéries peuvent se développer très rapidement et leur nombre peut doubler très rapidement allant jusqu'à toutes les 10 minutes, pour certaines espèces.[50]

De plus, les bactéries sont présentes dans tous les milieux et ont un large éventail de formes, allant de sphères aux tiges en passant par les spirales. Les bactéries sont omniprésentes dans tous les habitats de la planète, dans le sol, sources chaudes acides, déchets radioactifs, l'eau, et dans la croûte terrestre, ainsi que dans la matière organique et les organismes vivants végétaux et animaux. En effet, tous les aliments en contiennent, et ce, plus particulièrement en surface. Elles jouent des rôles importants notamment dans le recyclage de la matière organique, dans l'équilibre des plantes et des animaux et dans certaines productions alimentaires et industrielles. Aussi, la plupart des bactéries n'ont pas été caractérisées, et seulement environ la moitié des phylums de bactéries sont des espèces qui peuvent être cultivées en laboratoire.[51] Cependant, certaines espèces sont pathogènes et peuvent provoquer des maladies chez les humains et les animaux. En effet, bien que la grande majorité des bactéries soit inoffensive ou bénéfique, une quantité importante de bactéries sont pathogènes.

Leur classification a pour but de décrire la diversité des espèces bactériennes en nommant et regroupant ces organismes en fonction de leurs similitudes. Les bactéries peuvent être classées sur la base de leur structure cellulaire, leur métabolisme cellulaire ou sur les différences dans les composants cellulaires comme l'acide nucléique, les acides gras, les colorations et les antigènes.[52] De plus, la coloration de Gram (ou méthode de Gram) est une méthode empirique qui permet de différencier les espèces bactériennes en deux grands groupes (Gram positifs et Gram négatifs) sur la base des propriétés chimiques et physiques de leurs parois cellulaires. La coloration de Gram est presque toujours la première étape dans l'identification d'un organisme bactérien. Malgré le fait que la coloration de Gram est un outil précieux de diagnostic dans les deux milieux

cliniques et de recherche, toutes les bactéries ne peuvent être définitivement classées par cette technique.[53] Les bactéries Gram-positives sont celles qui sont colorées en bleu foncé ou violet par coloration de Gram. Ceci est en contraste avec les bactéries Gram-négatives, qui ne peuvent pas conserver le colorant cristal violet, et qui prennent, à la place, le contre-colorant (safranine ou fuchsine) et apparaissant en rouge ou rose. Les organismes à Gram-positif sont en mesure de conserver la coloration au cristal violet en raison de la quantité élevée de peptidoglycane de la paroi cellulaire. Les parois des cellules Gram-positives n'ont généralement pas la membrane externe qui est retrouvée chez les bactéries Gram-négatives ce qui facilite l'absorption du colorant violet. (Figure 2.3)

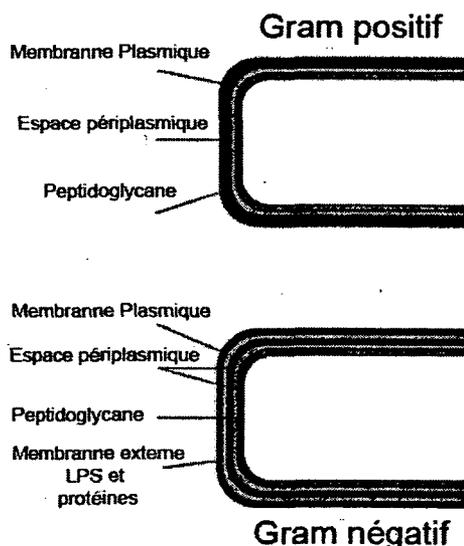


Figure 2.3 Illustrations montrant les différences entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives. [modifié de <http://en.wikipedia.org/wiki/Gram-positive>]

La première souche bactérienne utilisée pour cette étude est une *Escherichia coli* K12 (Figure 2.4) qui est une bactérie Gram-négative en forme de bâtonnet cylindrique aux extrémités arrondies, elle mesure environ 2,5 μm en longueur et 0,8 μm de diamètre. *E. coli* est communément trouvé dans le gros intestin des organismes à sang chaud (endothermes) et certaines souches sont motiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent des flagelles. [54] La plupart des souches d'*E. coli* sont inoffensives, mais certaines, comme le sérotype O157: H7, peuvent causer des intoxications alimentaires graves chez l'homme, et sont parfois responsables de

rappels de produits.[55] Les souches inoffensives font partie de la flore normale de l'intestin, et peuvent bénéficier à leurs hôtes par la production de la vitamine K2[56] et en empêchant l'établissement de bactéries pathogènes dans l'intestin.[57] *E. coli* n'est cependant pas confiné à l'intestin, et sa capacité de survivre en dehors du corps le rend un organisme indicateur idéal pour tester les échantillons environnementaux afin de dépister certaines contaminations.[58, 59] *E. coli* peut aussi être facilement cultivé et sa génétique est relativement simple et facile à manipuler, ce qui en fait l'un des organismes modèles procaryotes les plus étudiés ainsi qu'une espèce importante dans les biotechnologies et la microbiologie.

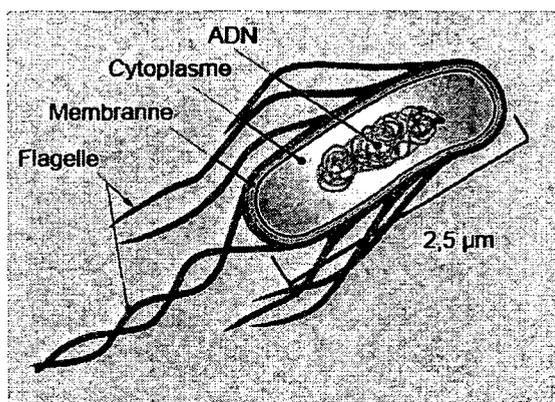


Figure 2.4 La structure d'*E. coli*

[modifié de <http://www.foodpoisonjournal.com/2009/09/articles/foodborne-illness-outbreaks/nono157h7-shiga-toxin-e-coli-human-disease-vectors-and-outbreaks/>]

En effet, les souches de laboratoire, tel qu'*E. coli* K12, sont bien adaptées à l'environnement de laboratoire, et, à la différence des souches de type sauvage, ont perdu leur capacité à prospérer dans l'intestin.

La deuxième bactérie utilisée dans cette étude est *Legionella pneumophila*. (Figure 2.5) C'est une bactérie Gram négative mince, pléomorphe et flagellée du genre *Legionella*. *L. pneumophila* est la principale bactérie pathogène humaine dans ce groupe et est l'agent causal de la légionellose ou maladie du légionnaire. En effet, elle est considérée comme un parasite facultatif des protozoaires retrouvés dans l'eau douce. Cette bactérie cause des maladies respiratoires chez l'homme lorsque,

par exemple, un hôte inhale de l'eau sous forme d'aérosol contenant des bactéries. Elles mesurent environ 2 μm en longueur et entre 0,3 et 0,7 μm de diamètre.



Figure 2.5 La structure de *L. pneumophila* [modifié de <http://microblog.me.uk/90>]

2.2 Les méthodes de détection de micro-organismes en milieu aqueux
Les méthodes de détection d'agents pathogènes sont actuellement peu nombreuses. Par contre en raison l'implication des différentes techniques visant la préparation des échantillons (l'extraction, la purification, l'enrichissement, la séparation...) et l'analyse, elles sont riches en complexité. Les méthodes classiques sont utilisées en dépit de leur vieillesse en raison de leur sélectivité et de leur sensibilité élevée. Les biocapteurs, domaine émergent, ont la possibilité de raccourcir le laps de temps requis entre la collecte de l'échantillon et l'obtention de résultats, mais leur avenir dépend de la réalisation de sélectivités et de sensibilités comparables aux méthodes établies pour une fraction du coût. (Figure 2.6)

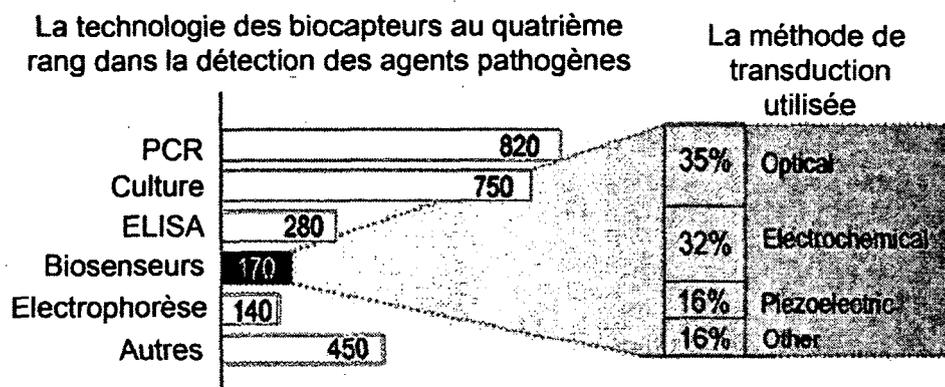


Figure 2.6 Nombre approximatif d'articles utilisant des techniques différentes pour détecter et/ou d'identifier des bactéries pathogènes. [60]

2.2.1 Les méthodes conventionnelles

Le PCR est une méthode existant pour la détection rapide d'agents pathogènes microbiens dans des échantillons cliniques et lors d'analyses environnementales. En particulier, c'est lorsque la culture *in-vivo* de certains agents pathogènes spécifiques est ardue ou qu'elle nécessite une longue période d'incubation que la valeur diagnostique du PCR devient significative. Toutefois, l'application du PCR pour les échantillons cliniques ou microbiologiques a de nombreux pièges potentiels en raison de la sensibilité de celui-ci aux inhibiteurs et aux conditions expérimentales.[61] Par exemple, on sait que la sensibilité et la spécificité du PCR dépendent de gènes cibles, des séquences d'amorces, des techniques de PCR ainsi que des procédures d'extraction. En effet, le test PCR pour le diagnostic implique plusieurs étapes cruciales, telles que l'extraction d'ADN à partir d'échantillons, l'amplification par PCR et la détection des amplicons. En particulier, lorsque les échantillons spécifiques, à tester par PCR, ne contiennent seulement qu'un petit nombre de bactéries présentes par ml de spécimen, chaque procédure doit être soigneusement conçue et exécutée.

Aussi, il existe de nombreuses publications concernant les protocoles de base d'un test de PCR visant la détection.[62] Par exemple, la détection par PCR de bactéries dans les échantillons cliniques et environnementaux est couramment rapportée. Le laboratoire du Dr. Bej et coll. rapporte l'utilisation de PCR pour la détection, à l'aide de sondes génétiques visant des régions de deux gènes (*lacZ* et *LamB*), de bactéries coliformes dans des milieux aqueux. Ils indiquent, malgré le fait que la sensibilité de détection dépendait des conditions expérimentales du PCR, puisqu'ils ont une limite de détection allant de 1 à 10 fg d'ADN d'*E. coli*, ce qui correspond à 1-2 UFC.[63]

Plus récemment, le groupe du Dr. Takahashi et coll. a effectué le recensement rapide des souches d'*E. coli* par PCR quantitative en temps réel (rt-PCR) en ciblant le gène *uidA*. [64] Le test développé a été utilisé pour effectuer l'analyse de viande hachée, de thon et d'huîtres crus. En but de comparaison, ils ont eu une sensibilité de 1 UFC/g de viande suite à une incubation sur du milieu TSB. Cette

sensibilité est comparable à celle qu'ils ont obtenue, suite à un test PCR utilisant une sonde « TaqMan » qui a été capable de distinguer entre les différentes souches dans les 1.5 heure.

En outre, la technique de PCR est sensible, sélective et rapide. Par contre, le coût de l'appareillage, du matériel requis et de l'embauche de personnel qualifié est important et peut entraver l'utilisation extensive de cette méthode.[65]

La méthode de culture et d'énumération bactérienne est la technique la plus ancienne, mais aussi la méthode de choix. Toutefois, d'autres techniques sont souvent simultanément nécessaires parce que les méthodes de culture sont trop de longues. Comme mentionnée précédemment, la détection de Legionella peut aller jusqu'à 10 jours. De plus, dans le cas de Campylobacter, 4 à 9 jours sont souvent nécessaires pour obtenir un résultat négatif et entre 14 et 16 jours pour la confirmation d'un résultat positif.[66] Ceci est un inconvénient évident dans de nombreuses applications industrielles, notamment dans le secteur des aliments. Différents milieux sélectifs sont utilisés pour détecter des espèces de bactéries particulières. Ils peuvent contenir des inhibiteurs (dans le but d'arrêter ou de retarder la croissance des souches non ciblées) ou de substrats que seules les bactéries visées sont capables de dégrader ou encore modifiant la couleur de la culture.[67] La détection est alors effectuée à l'aide des méthodes optiques, principalement par l'inspection visuelle.

Finalement, le domaine des méthodes immunologiques de détection des bactéries fournit des outils d'analyse très puissants pour un large éventail de cibles. Dans le cas du dosage immuno-enzymatique (ELISA),[68] ce test est la technique la plus établie aujourd'hui ainsi que la source d'inspiration majeure pour de nombreux biocapteurs. L'ELISA combine la spécificité des anticorps et la sensibilité des tests enzymatiques en utilisant des anticorps ou antigènes couplés à une enzyme, permettant le dosage facile. La figure 2.7 illustre le principe d'un ELISA de type sandwich, qui est le plus type le plus commun.

2.1.1 Les méthodes avant-gardiste

La technologie des biocapteurs promet l'atteinte du même degré de fiabilité que les méthodes traditionnelles, en termes de résultats, en temps beaucoup plus court, ce qui explique pourquoi ils sont en train d'attirer un grand intérêt. Au fil des années, de nombreuses méthodes de détection optique pour cette bactérie ont été rapportées en utilisant des anticorps spécifiques et/ou monocouches auto-assemblés (SAM).

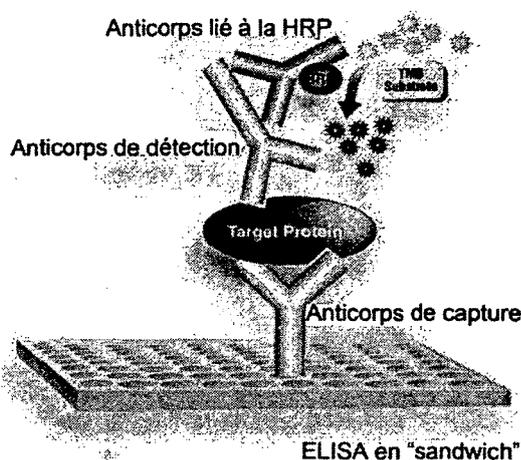


Figure 2.7 Représentation d'un ELISA en sandwich avec l'utilisation d'anticorps couplés à la HRP (une enzyme permettant le dosage)
[modifié de http://newenglandbiolabs.de/en/index.php?option=com_content&task=view&id=78&Itemid=20]

Parmi les méthodes utilisées pour la production d'immunosenseurs optiques visant la détection de bactéries sont, entre autres, la résonance de plasmons de surface (SPR) et l'utilisation de fibres optiques. Cependant, à notre connaissance, c'est la première fois que les propriétés optiques du GaAs seront exploitées pour la production d'un biocapteur dans le but de détecter des bactéries dans des échantillons d'eau.

Par exemple, Dr. Oh et ses collaborateurs ont mis au point un immunocapteur SPR basé sur des SAMs et la protéine G, en utilisant des anticorps spécifiques antilégionellose, pour la détection de *L. pneumophila* et sa limite inférieure de détection était de 10^5 cellules/ml.[7] Cet appareil a été développé afin d'examiner des eaux usées brutes et traitées, l'eau provenant d'océan ainsi que les

environnements côtiers du littoral pour détecter la présence de *L. pneumophila* et d'autres *Legionella spp.* Un autre immunocapteur basé sur l'imagerie par ellipsométrie a été développé pour la détection de *L. pneumophila*. La déposition séquentielle de thiol (acide 11-mercaptopundecanoic (11-MUA)), la protéine G, et d'anticorps monoclonaux dirigés contre *L. pneumophila* sur une surface d'or a été confirmée par SPR. Après la liaison des agents pathogènes aux anticorps, selon différentes concentrations, l'épaisseur de l'échantillon a changé telle que déterminée par les images ellipsométriques. Le biocapteur présenté selon cette méthode avait une limite inférieure de détection de 10^3 UFC/ml de *L. pneumophila*. [69] De plus, Dr. Lin et ses collaborateurs ont utilisé une méthode similaire pour la production d'un immunosenseur à fibre optique polie « side-polished fiber » basé sur la SPR pour la détection de bactéries en utilisant de la lumière blanche provenant d'une lampe halogène et de diodes (D.E.L.) émettant à 850 nm. La surface de détection a été fabriquée par la liaison chimique de SAM faite de 11-MUA sur de l'Or en immobilisant des anticorps spécifiques contre *L. pneumophila*. Le capteur fournissant ainsi une limite inférieure de détection de 10 UFC/ml de bactéries [70] Enfin, Yu-Chia et ses collaborateurs ont également mis au point un immunocapteur à fibre polie fondé sur la SPR utilisant des protéines, une monocouche auto-assemblées pour la détection de *L. pneumophila*. Cet immunocapteur a été efficace et avait une limite de détection de 10 UFC/ml avec un angle de résonance SPR variant en longueur d'onde de 1070 à 1105 nm. [71]

Bref, il a été démontré que les biocapteurs optiques sont une alternative intéressante pour la détection de pathogènes et qu'ils fournissent la possibilité de détection directe. Le but de ce projet était d'explorer une nouvelle avenue en exploitant les propriétés du GaAs. Comment détecter rapidement, efficacement et spécifiquement les agents pathogènes dans l'eau en utilisant la PL émise par le GaAs?

2.2 Les biocapteurs

2.2.1 Généralités

Les efforts de sociétés technologiquement avancées sont de plus en plus assujettis à l'estimation, au suivi et à la surveillance des espèces chimiques et biologiques. Cette obligation d'analyse de l'information s'applique à tous les secteurs d'activité, y compris les soins de santé, l'agroalimentaire, la pharmaceutique, les bioprocédés ainsi que la surveillance environnementale. (Figure 2.8) Par contre, les méthodes traditionnelles utilisées nécessitent l'utilisation de laboratoires d'analyse sophistiqués, souvent dans des installations centralisées, ce qui demande un capital considérable et une main-d'œuvre hautement qualifiée. Toutefois, il existe de nombreux cas pour lesquels ces dispositions sont insuffisantes et inadéquates..

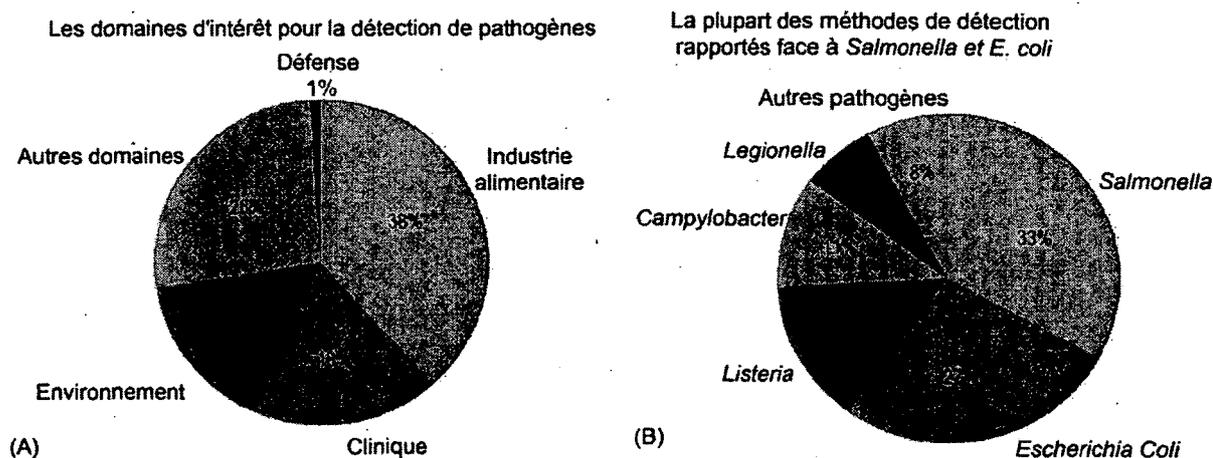


Figure 2.8 (A) Distributions, par domaine d'intérêt, du nombre relatif de travaux publiés dans la littérature sur la détection de bactéries pathogènes. (B) Distribution, par micro-organismes, du nombre relatif d'œuvres paru dans le la littérature sur la détection de bactéries pathogènes. [60]

Par exemple, en médecine, le délai et la ponctualité de mesures tant dans le dépistage et le suivi des marqueurs analytiques peuvent être critiques dans le diagnostic et le traitement ultérieur d'une maladie.

C'est pourquoi la possibilité d'amener le laboratoire d'analyse au patient ou sur le terrain est susceptible de révolutionner la pratique clinique et la surveillance environnementale. En effet, des tests tels que ceux de grossesse, d'urine ou

encore de glycémie sont déjà largement disponibles pour « l'autodiagnostic », en particulier en Amérique de nord. Toutefois, pour atteindre la pleine réalisation de cette perspective dans tous les domaines, il faudra élaborer de nouvelles technologies de capteurs chimiques et biologiques pour un large éventail d'analytes. Ces senseurs devront donc être sensibles, sélectifs, permettant l'obtention d'une réponse rapide, peu coûteux et faciles à utiliser. Ces dispositifs complèteraient (et parfois remplaceraient complètement) l'utilisation d'appareillage coûteux. En outre, ils offrent le potentiel d'analyse en ligne continue, par exemple, dans les unités de soins et dans les systèmes nécessitant la surveillance des processus industriels. De nouveaux capteurs seraient également utiles dans le remplacement des essais biologiques existants pour le suivi de drogue, de micro-organismes ou encore de la qualité de l'eau.

En effet, au cours des deux dernières décennies, les avantages de l'analyse à l'aide de biocapteurs ont commencé à avoir un impact important sur le marché et l'utilisation de ces systèmes est de plus en plus fréquente dans de nombreux laboratoires.[72, 73]

2.2.2 Historique et commercialisation des biocapteurs

L'invention de biocapteurs a commencé en 1962 avec le développement d'électrodes enzymatiques par le docteur Leland C. Clark Jr., le père du concept de biocapteur. C'est en 1956 que Clark a publié son document définitif sur la sonde à oxygène,[74] désormais connue sous le nom d'électrodes de Clark. Sur la base de cette expérience et s'adressant à son désir d'élargir la gamme des analytes qui pourraient être mesurées dans le corps, il décrit comment produire des capteurs électrochimiques intelligents en utilisant comme transducteurs des enzymes membranaires. Le concept a été illustré par une expérience dans laquelle la glucose oxydase a été piégé sur une électrode de Clark. Puisque la diminution de la concentration d'oxygène mesurée est proportionnelle à la concentration de glucose, il est donc possible de déterminer la concentration approximative de glucose dans le sang. Quelques années plus tard, Updike et Hicks,[75] ont élaboré

sur les détails expérimentaux nécessaires à la construction d'électrodes enzymatiques fonctionnelle pour le glucose. La première électrode potentiométrique basée sur une enzyme est, quant à elle, parue dans JACS en 1969 par Guilbault et Montalvo. Elle se constituait d'une sonde pour l'urée avec l'uréase immobilisée.[76]

Après une relativement longue période de silence, la recherche sur les biocapteurs a reçu une plus grande attention au cours de la dernière décennie. En effet, en août 2002, Kalorama Information publie la première édition d'un rapport intitulé «Medical and Biological Sensors and Sensor Systems: Markets, Applications and Competitors Worldwide. » Kalorama prévoyait alors que le marché mondial de biocapteur serait, en 2005, proche de 2,3 milliards de dollars. En revisitant le sujet en 2006, les résultats de la deuxième édition montrent une image encore meilleure du marché, avec des revenus réels de plus de 25 % supérieurs à ceux projetés. Selon les recherches faites, les recettes dans le monde entier pour des biocapteurs ont atteint près de 2,9 milliards en 2006.

En effet, les marchés d'aujourd'hui sont de plus en plus exigeants et demandent des produits intelligents, multifonctionnels, communicants, propres, portables, légers et autonomes. Les biocapteurs répondent parfaitement à ces exigences en ayant des vitesses de réaction accrue (généralement moins d'une minute) et étant facilement utilisables. De plus, les biocapteurs peuvent facilement détecter des analytes dans l'ordre du micromole allant jusqu'au nanomole et parfois jusqu'au picomole.[77] Les biocapteurs peuvent servir exceptionnellement bien dans les situations d'urgence ou pour des applications de terrain sur le site.[78, 79] De plus, le micro-usinage permet la production de biocapteurs avec un haut degré de miniaturisation.[80, 81] Sur le front technologique, les biocapteurs ont évolué pour être de plus en plus basés sur l'optique[82] et l'électrochimie.[83] Au cours du début des années 2000, la direction de la R&D sur les biocapteurs a changé de manière significative en réponse à de nouvelles innovations en biotechnologie,[84] en chimie bio-complémentaire,[85] en caractérisation de la

surface,[86, 87] en marqueurs moléculaires ainsi qu'en nanotechnologie.[88, 89] En plus de permettre une détection orthogonale,[90] l'utilisation de biocapteurs permet la production de systèmes de détection portables et jetables rivalisant l'efficacité des techniques connues de laboratoire.[91-94]

2.3 Le Principe des biocapteurs

Les biocapteurs sont des appareils d'analyse indépendants qui sont capables de fournir des résultats à la fois qualitatifs et quantitatifs. En effet, ils combinent la sélectivité de la biologie avec la puissance de traitement de la microélectronique et l'optoélectronique moderne pour offrir de nouveaux outils analytiques puissants. (Figure 2.9) Un biocapteur est un dispositif d'analyse qui convertit une réponse biologique en un signal électrique. Le terme biocapteur est souvent utilisé pour couvrir les capteurs utilisés pour déterminer la concentration de substances et d'autres paramètres d'intérêt biologique, même s'ils n'utilisent pas un système biologique directement.

Les biocapteurs sont constitués de systèmes de bio-reconnaissance, généralement des enzymes ou des protéines de liaison, tel que des anticorps, immobilisés sur la surface de capteurs physico-chimiques. Ils sont composés de trois parties principales. Le premier est le biorécepteur, le premier maillon du biocapteur, il permet l'identification de l'espèce à détecter grâce à son site particulièrement sélectif en assurant la reconnaissance moléculaire, en utilisant par exemple des protéines de liaisons telles des enzymes ou des anticorps. Le deuxième est le transducteur, un dispositif permettant la mise en évidence de la réaction assurée par le biorécepteur, où celui-ci sera immobilisé. Son choix dépendra des substances libérées ou consommées par la réaction ainsi que de l'application qui sera faite par le capteur. Le but étant d'avoir une compatibilité maximale pour obtenir un signal sensible avec un minimum de bruit de fond. Finalement, il y a des éléments électroniques ou des microprocesseurs de signaux qui sont principalement responsables de l'affichage des résultats d'une manière conviviale et facilement quantifiable.[95, 96]

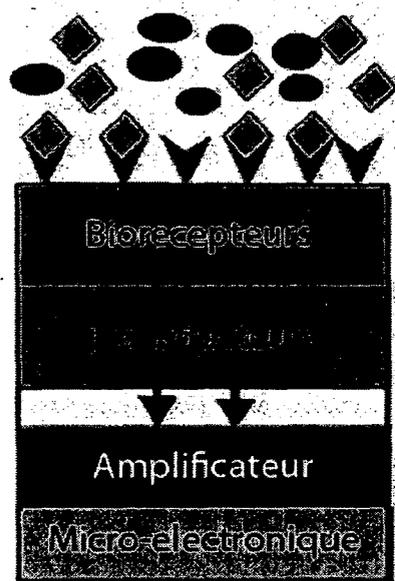


Figure 2.9 : Schéma des composantes d'un dispositif biocapteur.
[modifié de http://dipcia.unica.it/superf/researchsensors_0.html]

2.3.1 Les biorécepteurs

La spécificité d'un biocapteur vient de la spécificité du biorécepteur utilisé.[97] Il existe de nombreuses sources de biorécepteurs dans la nature pour les produits biochimiques d'intérêt en matière de biotechnologie et de la biomédecine. Aussi, ces biorécepteurs peuvent être modifiés et produits en grandes quantités en utilisant des techniques biotechnologiques modernes. Les caractéristiques du biocapteur peuvent également être raffinées en modifiant la structure de ces molécules.[98] Plusieurs molécules peuvent être utilisées en tant que biorécepteurs.[99] Il y a entre autres, les enzymes qui ont été les molécules bioréceptrices le plus largement utilisées dans les applications de biocapteurs puisqu'elles possèdent dans leur structure tridimensionnelle un site actif, dans lequel peut venir se fixer le substrat de forme complémentaire, présentant ainsi une grande spécificité par rapport aux substrats et vis-à-vis les réactions qu'elles catalysent.[100] L'utilisation de protéines réceptrices est fréquente et permettant l'étude des signaux chimiques de la communication cellulaire.[101] Les acides nucléiques, où la sélectivité de l'interaction entre deux chaînes de nucléotides complémentaire est importante et souvent exploitée, permettent l'étude de

l'expression d'un gène ou la recherche des mutations ponctuelles responsables de certaines maladies génétiques.[102] Les organites ou encore les cellules entières, possédant de nombreuses enzymes membranaires, sont souvent simples à mettre en œuvre; ne nécessitent pas ou très peu de purification et sont génétiquement modifiables.[103]

Dans le cadre de ce projet, les anticorps ont été principalement utilisés comme biorécepteurs. Les anticorps représentent l'une des principales classes de protéines, ils constituent environ 20 % des protéines plasmatiques totales et sont collectivement appelés immunoglobulines (Ig), ils sont utilisés par le système immunitaire pour identifier et neutraliser les corps étrangers, tels que les bactéries et les virus. En effet, leur but est de lier et neutraliser les substances étrangères « antigènes » afin de les supprimer du système. L'anticorps a une structure de base composée de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes légères et deux chaînes lourdes. Elles sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule. De plus, les anticorps les plus simples sont généralement décrits comme des molécules en forme d'Y avec deux sites identiques de liaison pour l'antigène.(Figure 2.10.a) Ces deux sites sont identiques, d'où la possibilité de lier deux molécules d'antigène par anticorps. En effet, les molécules étrangères qui induisent la production d'anticorps sont appelées antigènes et les molécules antigéniques ont chacune un ensemble de déterminants antigéniques communément appelés épitopes.(Figure 2.10.b) Les épitopes sur un antigène sont généralement différents de ceux retrouvés sur un antigène différent, par contre, certains antigènes ont parfois une série d'épitopes répétés. Les épitopes sont des formes moléculaires reconnues par les anticorps et les cellules du système immunitaire adaptatif. Les anticorps sont fabriqués par une cellule dérivée de lymphocytes B appelés plasmocytes, un plasmocyte produit des anticorps contre un seul épitope. Même les micro-organismes simples ont de nombreux antigènes différents. Les anticorps se lient de façon réversible et spécifique avec un antigène (bactéries, virus, protéines, toxines). Il existe des anticorps polyclonaux et des anticorps

monoclonaux. Les anticorps polyclonaux sont constitués de protéines dirigées contre le même antigène, mais peuvent cibler des sites différents (épitopes différents), alors que les anticorps monoclonaux, ne contenant qu'un seul paratope (la partie d'un anticorps qui reconnaît un antigène; le site de fixation antigénique d'un anticorps), sont dirigés contre un seul et même épitope de l'antigène. Il existe plusieurs types de forces d'attraction intermoléculaires de fixation d'antigènes à anticorps. L'affinité avec laquelle l'anticorps se lie à l'antigène résulte d'un équilibre entre les forces attractives et répulsives.[104]

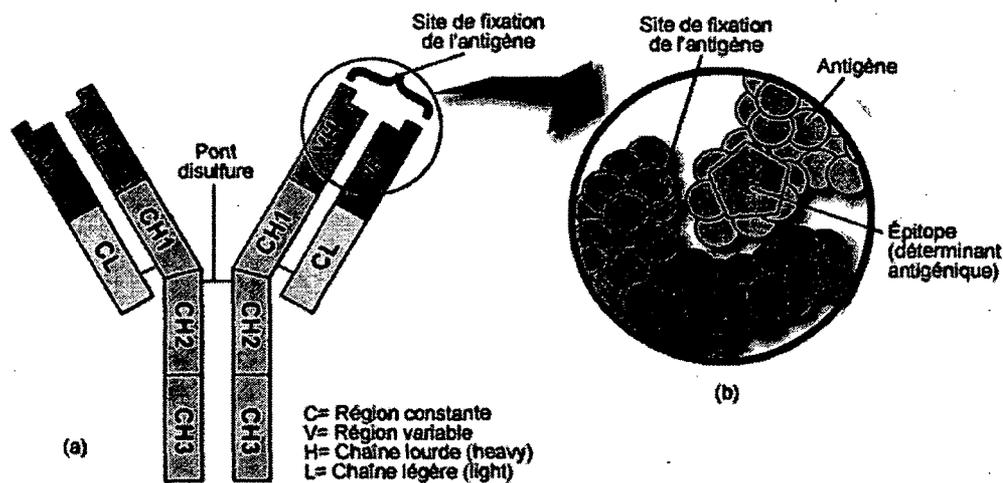


Figure 2.10: (a) Structure fondamentale d'un anticorps; (b) Vue rapprochée d'un site de fixation d'un antigène.

[modifié de <http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/702/chapitre5b.htm>]

Par exemple, la liaison entre un anticorps et son antigène dépend des forces de Van der Waals, par exemple, la formation de ponts hydrogène; liaison physique non covalente, de type dipôle dipôle qui est de basse intensité (vingt fois plus faible que liaison covalente classique), et relie des molécules en impliquant un atome d'hydrogène, il y a aussi les forces électrostatiques qui sont dues à l'attraction des groupes de charges opposées situées sur deux chaînes latérales des protéines. La distance de séparation entre les groupes en interaction produisant une liaison optimale varie pour les différents types de reconnaissance.

Finalement, le terme immunocapteur est souvent utilisé pour décrire les biocapteurs qui utilisent prioritairement des anticorps comme système de bio-reconnaissance.

2.3.2 Les transducteurs

Les interactions spécifiques entre l'analyte cible et la couche de bio-reconnaissance complémentaires produisent un changement physico-chimique qui est détecté et peut être mesuré par le transducteur. Le transducteur peut prendre plusieurs formes selon les paramètres mesurés.[105] Il existe plusieurs types de transducteur tels qu'entre autres les transducteurs électrochimiques où un changement chimique est mesuré en tant que paramètre d'entrée et est converti à la sortie en un signal électrique variable en fonction de la grandeur à mesurer. [106] Les transducteurs impédimétriques, quant à eux, combinent à la fois l'analyse des propriétés résistives et capacitives des matériaux et sont basés sur la perturbation d'un système à l'équilibre par une faible amplitude de signal d'excitation sinusoïdal.[107] Les transducteurs de variation thermique reposent sur la transformation d'un signal biochimique correspondant à la réaction entre le biorécepteur et la molécule cible en un signal thermique. Le composé biologique immobilisé est relié à un microcalorimètre ou à une résistance thermique capable de mesurer les changements de température liés à la réaction.[108] Les transducteurs acoustiques sont des dispositifs gravimétriques qui mesurent la masse d'un échantillon déposé sur la surface d'un matériau par l'intermédiaire de la fréquence de résonance caractéristique.[109]

Le transducteur utilisé lors de la réalisation de ce projet est un transducteur optique. Les transducteurs optiques sont des dispositifs où le paramètre mesuré est la lumière; les photons se propageant. Ils peuvent utiliser différents types de spectroscopie (l'absorption, la fluorescence, la phosphorescence, Raman, SERS, la réfraction, etc.) avec différentes propriétés spectrochimiques enregistrées. Les méthodes classiques « indirectes » de quantification des réactions d'affinité nécessitent l'utilisation de molécules marquées, les marqueurs étant soit

radioactifs, fluorescents ou des enzymes. Par contre, l'utilisation de méthodes de détection directe « sans marquage » est préférable dans certains domaines d'application : (1) lorsque des informations sur la dynamique (informations cinétiques) sont nécessaires; (2) où le temps de détection est limité et que l'incubation jusqu'à l'atteinte de l'équilibre soit trop longue; (3) chaque fois que le marquage des composés doit être évité, afin de prévenir la modification de l'activité du composé en plus de fournir la capacité de sonder des surfaces et des films d'une façon non destructive.[110] Pour ces raisons, ce type de capteur est devenu de plus en plus populaire au cours des dernières années.[111, 112]

Parmi les techniques immunologiques de transduction optique directe, on distingue principalement la résonance plasmonique de surface (Surface Plasmon Resonance, SPR) où l'excitation de plasmons de surface par la lumière produit une résonance plasmonique de surface sur le long de l'interface entre deux milieux, où l'un est un métal et l'autre un diélectrique. Une conséquence énergétique de cette résonance est visible en analysant l'intensité du faisceau réfléchi qui présente une chute d'intensité à un angle défini. Cet angle d'intensité minimum est l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. Les guides d'ondes optiques constituent une autre classe de détection directe couramment utilisée. En effet, les fibres optiques transmettent la lumière grâce au principe de réflexion totale interne (TIR). Lorsque ce phénomène se produit, les rayons lumineux sont guidés à travers le noyau de la fibre avec très peu de pertes, l'onde se propageant de cette manière pourrait donc interagir avec des biomolécules disposées soit à l'intérieur ou sur la périphérie de la fibre. En suivant de près la variation de l'intensité de l'onde optique se propageant, il sera ainsi possible de détecter certaines interactions s'y produisant.

Dans le cadre de ce projet, la méthode de détection directe qui a été utilisée est la PL émise par le GaAs, celle-ci est employée pour la caractérisation de deux types d'architectures présentés pour la production d'un biocapteur optique visant la détection de micro-organismes dans un milieu aqueux.

2.4 L'Arséniure de Gallium

L'arséniure de gallium (GaAs) est un représentant d'un semi-conducteur de type III-V (combinaisons d'élément provenant de la 3^e et 5^e colonne de la table périodique des éléments) qui est couramment utilisé dans la fabrication de dispositifs tels que des circuits intégrés hyperfréquence, des diodes infrarouges électroluminescentes, des diodes laser et des les cellules solaires.[113, 114] Un semi-conducteur est un matériau qui a une conductivité électrique (par opposition à la conductivité ionique) qui est intermédiaire entre celles d'un conducteur et d'un isolant.[115] (Figure 2.11) Ceci se situe à peu près dans la gamme de 10^3 à 10^{-8} Siemens par centimètre, dépendamment du semi-conducteur en question.[116] Dans un conducteur métallique, le courant est transporté par le flux d'électrons. Tandis que dans les semi-conducteurs, le courant est souvent schématisé comme étant effectué soit par le flux d'électrons ou par le flux de charge positive (trous) dans la structure électronique du matériau. En réalité, cependant, dans les deux cas, seuls les mouvements des électrons ne sont en cause.[117]

En physique des solides (*solid-state physics*), la structure de bande électronique d'un solide décrit les gammes d'énergie qu'un électron est interdit ou autorisés à avoir. La structure de bande d'un matériau détermine plusieurs caractéristiques, notamment ses propriétés électroniques et optiques.[118] Ici, le terme bande interdite réfère à la différence d'énergie entre le haut de la bande de valence et le bas de la bande de conduction; les électrons sont capables de sauter d'une bande à une autre. Par contre, la bande interdite constitue une gamme d'énergie dans un solide où les états électroniques ne peuvent exister. Pour qu'un électron puisse passer de la bande de valence à la bande de conduction, il faut fournir une certaine quantité minimale d'énergie pour permettre la transition. L'énergie nécessaire varie avec différents matériaux et différentes températures.[119] Les électrons peuvent ainsi gagner suffisamment d'énergie pour passer à la bande de conduction par absorption soit d'un phonon « chaleur » ou d'un photon « lumière ». Dans un graphe de la structure de bande électronique d'un solide, la largeur de bande se réfère généralement à la différence d'énergie (en électron

volts) entre le haut de la bande de valence et le bas de la bande de conduction qui se trouve dans les isolants et les semi-conducteurs. Dans le cas du GaAs, cette énergie est de 1.43 eV à 300°K, c'est la quantité d'énergie nécessaire pour libérer un électron de l'enveloppe extérieure de son orbite autour du noyau afin de devenir une charge mobile en mesure de se déplacer librement au sein de la matière solide.[120, 121]

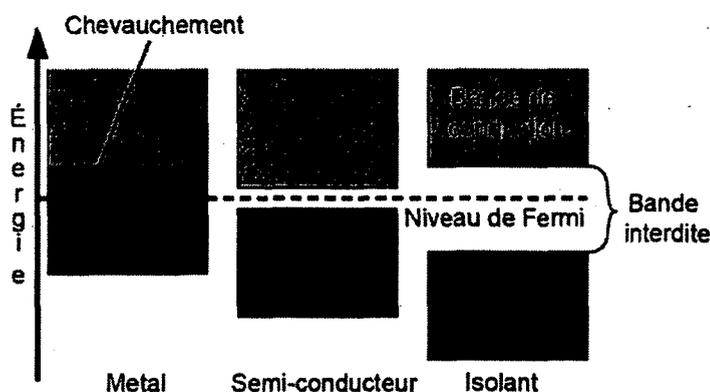


Figure 2.11 : Comparaison de la disposition des bandes d'un métal, d'un semi-conducteur et d'un isolant. [modifié de <http://solarpower.e-bookz.info/?p=80>]

Le GaAs est composé d'une combinaison de propriétés physiques qui en font un candidat intéressant pour de nombreuses applications électroniques. De la comparaison des différentes propriétés physiques et électroniques du GaAs avec celles du silicium (Si), souvent utilisé pour la production de biocapteurs, les avantages du GaAs peuvent être facilement établis. Le GaAs possède certaines propriétés électroniques qui sont supérieures à celles du Si. Entre autres, le GaAs possède une mobilité d'électrons (electron mobility) plus élevée, ceci étant une grandeur relative de la vitesse de dérive des électrons dans le champ électrique appliqué à travers un matériau. Il a également une vitesse saturée d'électron (saturated electron velocity) plus élevée; la vitesse de saturation étant la vitesse maximale qu'atteint un porteur de charge dans un semi-conducteur, généralement un électron, en présence de champs électriques très élevés.[122, 123] Aussi, contrairement aux jonctions de Si, des dispositifs en GaAs sont relativement insensibles à la chaleur. En outre, les dispositifs en GaAs génèrent moins de bruit que les appareils de Si, lorsqu'ils fonctionnent à des fréquences élevées. Ils

peuvent également être exploités à des niveaux de puissance plus élevée que les dispositifs en Si équivalent parce qu'ils ont des tensions de claquage supérieures. Ces propriétés expliquent l'usage du GaAs pour la production, entre autres, de lasers, de circuits de GaAs dans les téléphones mobiles, les communications par satellite, les liens micro-ondes point à point, et certains systèmes de radar.[124]

Malheureusement, les nombreuses propriétés souhaitables de GaAs sont compensées par un certain nombre de propriétés indésirables, qui ont limité les applications des dispositifs à base de GaAs à ce jour. Par exemple, le gradient thermique et, par conséquent, le stress généré lors de la fonte de cristaux ont limité le diamètre maximal des plaquettes de GaAs (actuellement de 6" comparativement à plus de 12" pour le Si), et puisqu'avec un diamètre élevé de plaquettes de GaAs on augmente la densité des dislocations (défauts cristallins) générées dues au stress thermique ceux-ci finissent par devenir inacceptables pour certaines applications.[125, 126] Aussi, les monocristaux de GaAs sont très fragiles, exigeant que les substrats soient beaucoup plus épais que ceux employés pour les dispositifs silicium. Finalement, l'oxyde natif de GaAs, qui est un mélange de gallium non stœchiométrique, d'oxydes d'arsenic et d'arsenic élémentaire, perturbe de façon significative la structure de la bande électronique entraînant donc une rupture dans le comportement du GaAs.[127] La passivation de la surface du GaAs est donc une question clé lors de l'utilisation de celui-ci. La signification de passivation dans ce contexte est : la notion de réduction des états de bande mi-gap qui détruisent les propriétés semi-conductrices du matériau. En outre, cela signifie aussi la production d'un revêtement chimiquement inerte qui empêche la formation de nouveaux états réactifs, qui peuvent influencer les propriétés du périphérique. Enfin, le plus grand obstacle à la réussite de l'utilisation pratique du GaAs est le coût élevé d'un substrat monocristallin de GaAs. En revanche, un autre avantage important du GaAs, c'est qu'il a une bande interdite directe (Figure 2.12.a) la transition entre la bande de valence et bande de conduction n'implique pas un changement de quantité de mouvement et donc ne nécessite pas l'interaction de particules de collaboration (phonons). Ce qui

signifie qu'il peut être utilisé pour émettre de la lumière de façon efficace. [122] La génération de photons par recombinaison radiative (PL) est donc possible et plus efficace dans le GaAs.

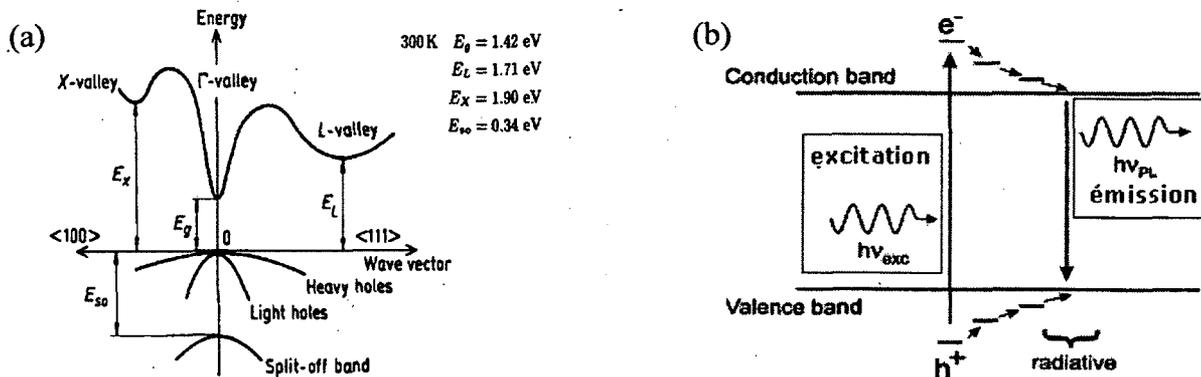


Figure 2.12. Diagramme de bandes d'énergie d'un semi-conducteur montrant (a) la disposition des maximums et des minimums de la bande de valence et de conduction en fonction de l'énergie et du vecteur d'onde de la structure cristalline et (b) la photo-excitation et la recombinaison radiative des porteurs de charge. [modifié de http://people.seas.harvard.edu/~jones/ap216/images/bandgap_engineering/bandgap_engineering.html]

2.4.1 La Photoluminescence

La photoluminescence (PL) est un processus dans lequel une substance absorbe des photons puis réémet des photons. En d'autres termes, ceci peut être décrit comme l'excitation d'un électron, se trouvant dans la bande de valence, à un état d'énergie plus élevé (dans la bande de conduction du substrat) puis un retour à un état inférieur s'accompagnant de l'émission d'un photon par le biais d'une recombinaison électron-trou.[128] (Figure 2.12.b) Le retour à l'équilibre, aussi connu sous le nom de recombinaison, peut impliquer à la fois des processus radiatifs et non radiatifs. C'est l'une des nombreuses formes de luminescence qui existe et se distingue par la photoexcitation d'où le préfixe *photo-*. La PL est une méthode spectroscopique sans contact et non destructive, généralement utilisée afin de sonder la structure électronique des matériaux. L'intensité et le contenu spectral de PL sont une mesure directe de diverses importantes propriétés des matériaux.[129] De plus, elle dépend grandement de l'intensité de photo-

excitation et de la température. Aussi, dans le régime linéaire de l'absorption de photon unique, l'énergie de PL est inférieure à celle d'excitation.

En prolongeant le rapprochement avec le silicium, celui-ci possède une bande interdite indirecte; c'est-à-dire que la recombinaison radiative est lente dans ce matériau. Ce qui signifie également que, dans la plupart des circonstances, le taux de recombinaisons radiatives sera minime comparativement au taux de recombinaisons totales, puisque la plupart des recombinaisons seront non-radiatives et auront lieu aux points de défauts ponctuels ou aux jonctions de grains. Bref, ce processus est trop inefficace pour être d'utilisation dans la production d'un biocapteur basé sur la PL.[130] La capacité de convertir l'énergie électrique en lumière constitue une caractéristique de base lors de l'utilisation du GaAs, et de ses alliages en optoélectronique. De plus, une des principales caractéristiques des semi-conducteurs III-V, tel le GaAs, est le rendement quantique de PL qu'ils possèdent, soit une augmentation de la sensibilité à la lumière.[131] Le GaAs est un semi-conducteur à bande interdite directe qui émet des photons à $\lambda \approx 872\text{nm}$. Enfin, dans le but de maximiser le rendement de PL obtenu, une hétérostructure, contenant des puits quantiques de GaAs, a été utilisée.

2.4.2 Les puits quantiques

Un puits quantique (QW) est une structure de potentiel qui confine les particules, étant initialement libres de se déplacer dans trois dimensions, à deux dimensions les forçant ainsi à occuper une région plane. Les effets de confinement quantique ont lieu uniquement lorsque l'épaisseur du QW devient comparable à la longueur d'onde de de Broglie des porteurs de charges (typiquement quelques dizaines de nanomètres). Le confinement des électrons et des trous entraînent la formation de niveaux d'énergie appelées niveaux d'énergie sous-bandes (*energy subbands*), c'est-à-dire que les porteurs ne peuvent avoir que des valeurs d'énergie discrètes.[132]

Les QW sont formés dans les semi-conducteurs en ayant un matériau, par exemple le GaAs en sandwich entre deux couches d'un matériau avec une plus grande bande interdite, comme l'arséniure d'aluminium (AlAs) ou l'arséniure de gallium aluminium (AlGaAs). (Figure 2.13) La raison pour l'utilisation d'AlAs est que ce matériau semi-conducteur possède presque la même constante de réseau que le GaAs et l'AlGaAs et l'écart de bande interdite est plus large que celle du GaAs. En effet, l'assortiment de constantes de réseau entre deux matériaux semi-conducteurs différents est important lors de la fabrication de puits quantiques, car cela permet la formation d'une région de changement de bande interdite sans toutefois introduire un changement dans la structure cristalline. Ceci permet la construction de dispositifs optiques tels des diodes électroluminescentes et des diodes lasers plus performantes.[133]

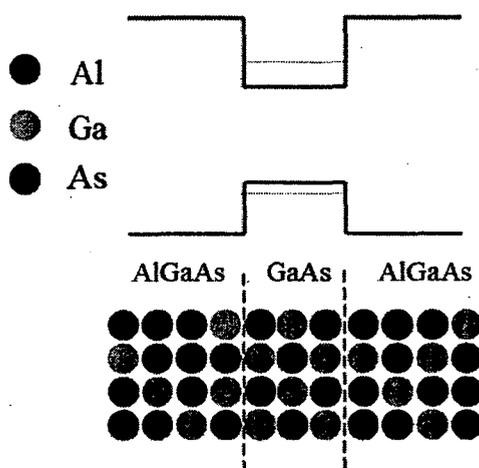


Figure 2.13 Un schéma de la structure de bandes et l'épitaxie d'un puits quantique formé d'aluminium, de gallium et d'arsenic. [modifié de <http://www.intenseco.com/technology/>]

Par exemple, le GaAs et l'AlGaAs ont des constantes de réseau à peu près égales, ce qui rend possible la croissance de couches d'épaisseur arbitraires de l'un sur l'autre. Ces structures peuvent être déposées par épitaxie par jets moléculaires ou par dépôt chimique en phase vapeur avec le contrôle de l'épaisseur allant jusqu'à la monocouche.[134]

D'ailleurs, il a été démontré que le confinement en deux dimensions induit une amélioration de l'interaction électron-trou et donc le rendement de PL.[135-137] En effet, la présence de puits quantiques augmente plusieurs fois en l'intensité de

la PL émise comparativement à une homostructure de GaAs.[136] C'est pourquoi l'hétérostructure utilisée pour ce projet contient des puits quantiques. (Figure 2.14) Enfin, afin d'éviter la diffusion d'impuretés provenant de la couche de GaAs situé au bas de l'échantillon au couches épitaxiales situés au dessus de celui-ci, un superréseau (superlattice) a été ajouté à la structure. Ceci est possible en alternant des nanocouches de matériaux avec des constantes élastiques faibles et élevés. [138]

	Comment	Material	x	d [Å]	reps
Z ↓	(a)				
	Semiconductor GaAs				
	Buffer 1	GaAs		1000.0	1
	SL1			24.0	20
	SL1	GaAs		24.0	20
	GSB	GaAs		3000.0	1
	Barrier	AlGaAs	0.33	500.0	1
	Well A	GaAs		30.0	1
	Barrier	AlGaAs	0.33	900.0	1
	Well A	GaAs		55.0	1
	Top Barrier	AlGaAs	0.33	250.0	1
GaAs	GaAs		50.0	1	
	(b)				
Semiconductor GaAs					
Buffer 1	GaAs		2000	1	
SL1			24	20	
SL1	GaAs		24	20	
GaAs	GaAs		5000	1	
Bottom Barrier	AlGaAs	0.35	1000	1	
Well A	GaAs		60	1	
Top Barrier	AlGaAs	0.35	100	1	
GaAs	GaAs		100	1	

Figure 2.14 Configuration géométrique des structures de GaAs utilisées contenant plusieurs puits quantiques. Provenant de la série (a) V0729 et (b) V0802

2.5 Les méthodes de passivation du GaAs

Passiver le GaAs est nécessaire afin de protéger sa surface contre la dégradation chimique et électronique, en raison de l'oxydation. De plus, il est important de réduire la densité des états de surface électroniquement actifs. Ces états de surface, possédant des liens ballants (*dangling-bonds*), sont d'une importance prédominante pour la chimie, l'électronique et les propriétés spectrales des surfaces semi-conductrices.[139] Une liaison chimique covalente est composée d'une paire d'électrons partagés entre deux atomes. Un atome portant un seul électron (non apparié) a une liaison chimique incomplète et est nommé radical libre. Quand un radical libre existe dans un environnement immobilisé, par exemple, un solide, il est dénommé radical libre immobilisé ou lien ballant. (Figure 2.15.a) Les radicaux libres et immobilisés présentent des caractéristiques chimiques très différentes des atomes et des molécules ne contenant que des liaisons complètes : en général, ils sont extrêmement réactifs. Les radicaux libres

immobilisés ont une réactivité chimique semblable à celle des radicaux libres, par contre leur réactivité apparente est considérablement réduite suite à une mobilité réduite et un encombrement stérique. Les radicaux libres sont généralement de courte durée. Tandis que les radicaux libres immobilisés présentent souvent une plus longue durée de vie en raison de cette réduction de réactivité.[140] Bref, les états de surface sont des états électroniques générés à l'intérieur de la bande interdite, dus à des effets structurels à la surface de ceux-ci. Les liaisons pendantes peuvent donc générer des états (*defect states*) électroniquement actifs d'où la nécessité pour la passivation. (Figure 2.15.b) L'objectif de la passivation de surface est de réduire la densité des états de surface ou, de préférence, les retirer complètement de la bande interdite afin de maximiser la recombinaison radiative en utilisant des matériaux ou molécules biochimiques comportant des éléments qui ont une affinité pour Ga et/ou l'As.

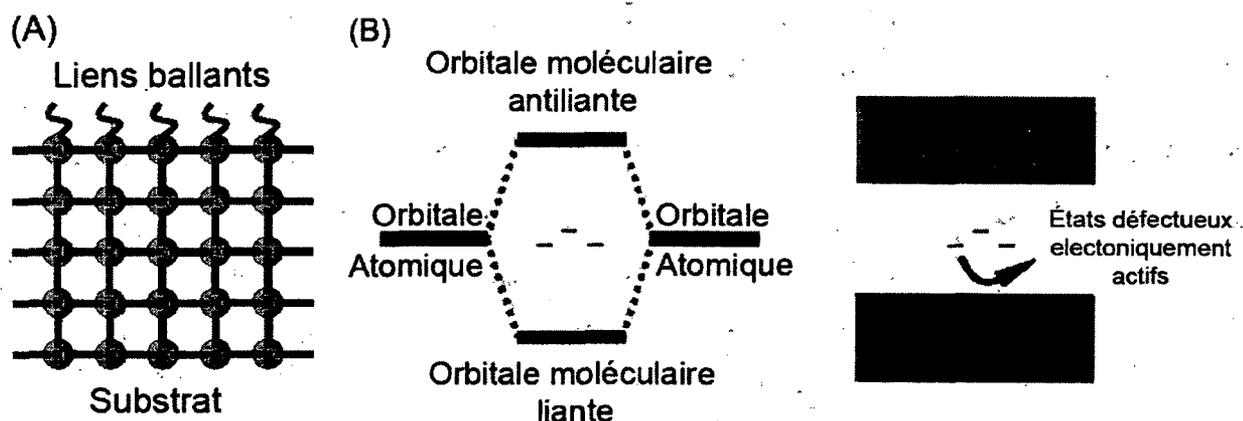


Figure 2.15 Représentations schématiques de (a) liaisons ballantes à la surface cristalline d'un substrat (vue latérale) et (b) de la disposition d'états défectueux en termes d'énergie.

2.5.1 Thiol et SAM

Il a été démontré que le traitement au soufre de la surface de GaAs, avec, par exemple une solution de sulfure d'ammonium ((NH₄)₂S), résulte, suite au dégagement de la couche d'oxyde natif, en la formation de liaisons covalentes telles que As-S et Ga-S.[141, 142] Ces processus sont accompagnés par une réduction marquée de la vitesse de recombinaison de surface qui est indiquée, par une amélioration spectaculaire de la PL émise par le GaAs passivé avec du

soufre.[143] Aussi, il a été démontré que le sulfure possède une affinité accrue pour la face cristalline (001) du GaAs.[144]

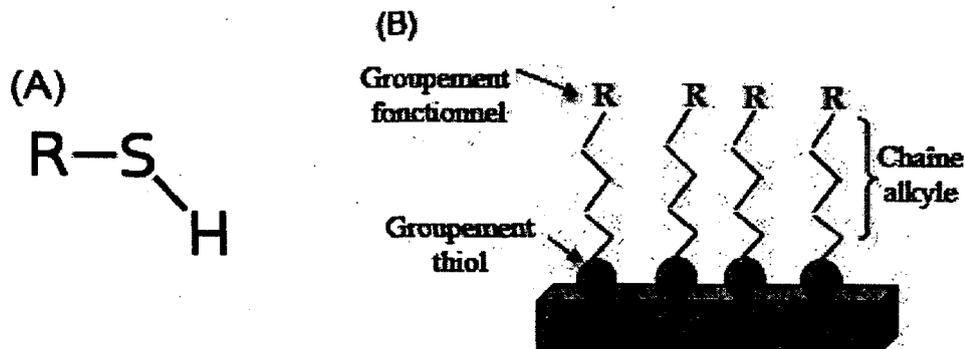


Figure 2.16 Structures (a) chimiques générales du groupement thiol et (b) d'une molécule de thiol complète contenant un groupement fonctionnel, un groupement thiol ainsi qu'une chaîne alkyle. [modifié de http://en.wikipedia.org/wiki/Self-assembled_monolayer]

Lors du développement de biocapteurs, l'immobilisation de biomolécules sur les surfaces de substrats requiert la présence de molécules liantes qui répondent à un ensemble de critères bien définis. Les thiols répondent à ces critères puisqu'ils sont non seulement en mesure de passiver la surface du GaAs par l'entremise de leur groupement thiol « groupe de tête », ils possèdent également un groupement fonctionnel terminal qui peut être variable et réactif afin de fonctionnaliser la surface du GaAs.[145] En chimie organique, un thiol est un composé organosulfurique (*organosulfur*) qui contient une liaison soufre-hydrogène (SH). (Figure 2.16.a) Les thiols sont l'analogue sulfurique d'un alcool et le groupement fonctionnel SH est dénommé soit un groupement thiol ou un groupe sulfhydryle.[146] En effet, les thiols sont composés de trois parties majeures (Figure 2.16.b) le groupe de tête thiol qui possède une affinité pour le GaAs, la chaîne alkyle et le groupement fonctionnel.

Un autre avantage de l'utilisation de thiols est que lorsque ces molécules sont mises en suspension dans un milieu isotrope, elles s'organisent entre elles pour former une couche ordonnée; ce qu'on appelle monocouche auto-assemblée ou

self-assembled monolayer (SAM).[147] Les SAM sont créés par la chimisorption de groupement thiol hydrophile sur un substrat à partir soit de la phase vapeur ou de la phase liquide suivie par une organisation lente en deux dimensions des chaînes alkyles hydrophobes.[148, 149] Au départ, les molécules de thiol de la solution s'adsorbent facilement sur l'or ou le GaAs, puisqu'elles abaissent l'énergie de surface du substrat et sont stables en raison de la forte chimisorption des groupes de tête.(Figure 2.17.1) Par contre, les molécules sont soit sous forme d'une masse désordonnée ou adoptent une conformation « couchée » [149](Figure 2.17.2) puis sur une période de quelques heures, elles commencent à former des structures cristallines ou semi-cristallins sur la surface du substrat. (Figure 2.17.3)[150, 151] Tandis que le groupe de tête assure l'attachement des molécules sur le substrat, les groupements terminaux s'apparient pointant vers l'extérieur de la surface. Les régions où la formation de domaines serrés se déroule servent à la nucléation et la croissance d'une monocouche unique jusqu'à ce que celle-ci couvre la surface entière du substrat. De plus, la présence de chaînes organiques aliphatiques contribue à la stabilisation de la monocouche, car la proximité de celles-ci promeut l'occurrence de réactions inter-chaîne telles les forces de Van des Waal, aussi connues en tant que réactions intrafilm. Les réactions inter-chaîne peuvent ainsi conduire à la stabilisation de liaison hydrogène, à la dimérisation ou polymérisation des chaînes.[152, 153]

Ainsi, il y a formation d'une monocouche auto-assemblée de manière ordonnée et dense. (Figure 2.17.4) Enfin, la magnitude de l'importance de cette contribution est simultanément proportionnelle à la longueur et la proximité des chaînes.[147, 148] C'est pour ces raisons que les monocouches ainsi créés sont plus stables que les liens physisorbés se produisant lors de la formation de films de Langmuir-Blodgett.[154, 155]

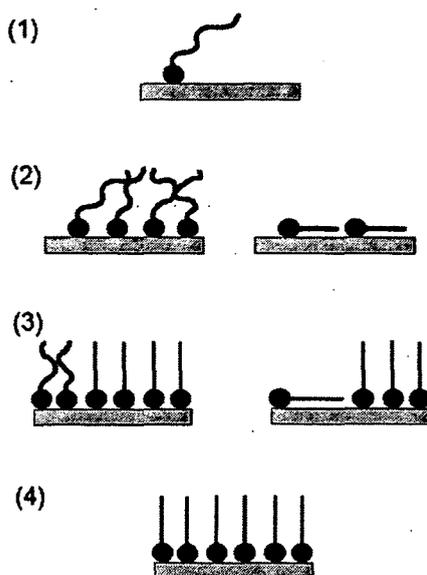


Figure 2.17 Formation d'une monocouche auto-assemblée sur un support solide.
[modifié de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Self_assembled_monolayer.png]

Finalement, différents types de molécules peuvent être utilisés lors de la création d'une monocouche. En effet, en faisant varier le groupement fonctionnel terminal de ces molécules organiques, la fonctionnalité chimique de surface résultante peut varier à l'intérieur de larges limites. C'est-à-dire que le groupement fonctionnel terminal de la chaîne de thiol pourra être varié au gré de l'expérimentateur afin de réaliser des surfaces hydrophobes ($R-CH_3$) ou hydrophiles ($R-NH_2$, $R-COOH$) ou encore pour le greffage de certaines molécules (NHS-biotin).

2.5.2 Nitrure de silicium

Une autre méthode de passivation étudiée dans ce travail est le recouvrement de la surface du GaAs avec le nitrure de silicium (Si_3N_4) qui est matériel plus stable que les thiols.[156] Le Si_3N_4 est souvent utilisé comme un isolant et barrière chimique dans la fabrication de circuits intégrés, pour isoler électriquement les différentes structures ou comme un masque de gravure en micro-usinage. De plus, il est supérieur au dioxyde de silicium (SiO_2), comme couche de passivation de puces puisqu'il s'agit d'une barrière de diffusion plus dense et très efficace contre les molécules d'eau, d'oxygène et des ions de sodium, trois sources majeures de la corrosion et à l'instabilité dans la microélectronique.[157] En plus d'avoir de nombreux usages industriels, tout comme le silicium (Si) il possède, à sa surface,

un oxyde naturel qui est stable et qui le passive de façon efficace. C'est pour cette raison que ce matériau a été utilisé, comme deuxième méthode de passivation, dans le cadre de ce travail. Le dépôt de couches de Si_3N_4 sur la surface de substrats semi-conducteurs se fait généralement selon deux méthodes.[158] La première avec l'utilisation de la technologie de dépôt chimique en phase vapeur sous basse pression (LPCVD) cette méthode fonctionne à une température assez élevée allant jusqu'à 600°C , [159] à des pressions sub-atmosphériques et se fait dans un four à tube soit en position verticale ou horizontale, le résultat obtenu est le dépôt d'une couche très dense et uniforme. La deuxième méthode est le dépôt chimique en phase vapeur amélioré par plasma (PECVD), c'est un procédé qui utilise du plasma pour améliorer les taux de réaction chimique des précurseurs utilisés lors du dépôt. Le traitement par PECVD, fonctionnant sous vide, permet le dépôt à basse température, qui est souvent décisif dans la fabrication et l'utilisation de semi-conducteurs.[160] En effet, la température maximale pour la plupart des technologies GaAs est 300°C ou moins. À des températures supérieures à 300°C , il y a une dégradation significative du GaAs à l'interface où se rencontrent le métal de support pour l'épitaxie et le GaAs. Le Ga diffuse hors du substrat et le métal diffuse dans le GaAs.[157]

De plus, le Si_3N_4 a fait l'objet d'un grand nombre d'études, car il est facile de le modifier chimiquement afin de produire des surfaces biochimiquement sensibles soit pour la production de biocapteur ou pour la caractérisation de surface.[161, 162] En effet, il est possible d'exploiter, entre autres, la réactivité des liaisons silicium-hydrogène (Si-H_x) et azote-hydrogène (N-H_x) de surface qui se forment suite à la gravure à l' HF . [163, 164]

2.6 Les techniques de caractérisation

Différentes techniques peuvent être utilisées pour la caractérisation et le contrôle des couches constitutives du biocapteur. Parmi elles la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la microscopie de force atomique (AFM), la

spectroscopie de photoélectrons avec rayon X (XPS), la microscopie optique, les mesures d'angle de contact et bien sur la collection de PL peuvent être utilisés.[165, 166]

2.6.1 Spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier

Ce type de spectroscopie est une technique qui est utilisée pour obtenir un spectre infrarouge d'absorption, d'émission, photoconductivité ou encore la diffusion Raman d'un solide, d'un liquide ou d'un gaz.[167] Un spectromètre FTIR recueille simultanément des données spectrales dans une large gamme spectrale.

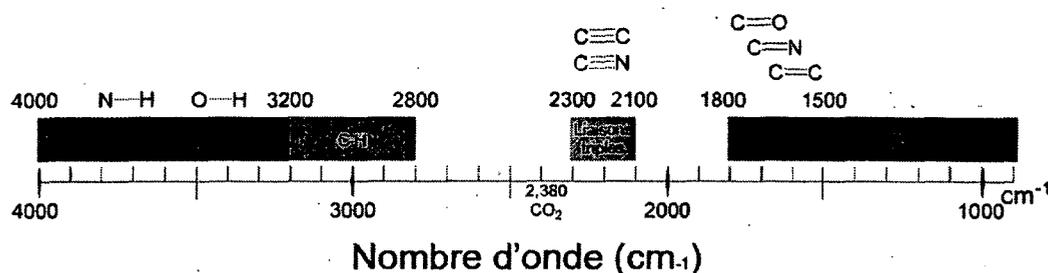


Figure 2.18 Représentation des bandes d'absorption de différents groupements chimiques en fonction de nombre d'ondes.

[modifié de http://en.wikipedia.org/wiki/File:IR_summary_version_2.gif]

Cela confère un avantage significatif sur un spectromètre à dispersion qui mesure l'intensité sur une gamme étroite de longueurs d'onde à la fois. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau.[168] Cette technique a été utilisée lors de cette étude afin de caractériser la formation de SAM à la surface du GaAs.[169] En effet, les atomes dans un groupe CH_2 peuvent vibrer de six manières différentes : par étirement symétrique et asymétrique, par cisaillement, en basculant, en remuant et en tournant; et ce, à différentes valeurs énergétiques distinctes. (Figure 2.18)

2.6.2 La spectroscopie de photoélectrons avec rayon X (XPS)

Le XPS est une technique spectroscopique qui prend des mesures quantitatives de la composition élémentaire, de la formule empirique, de l'état chimique et de

l'état électronique des éléments qui existent dans un matériau. Les spectres XPS sont obtenus en irradiant un matériau avec un faisceau de rayons X tout en mesurant l'énergie cinétique et le nombre d'électrons qui s'échappent des 10 premiers nanomètres du matériel en cours d'analyse.[170, 171] Aussi, le XPS nécessite l'utilisation de conditions de vide ultra élevé (UHV).[172] La caractérisation des états de surface a été faite à l'aide de cette technique.

2.6.3 La microscopie optique

Le microscope optique est un type de microscope qui utilise la lumière visible et un système de lentilles dans le but agrandir les images de petits échantillons. [173] L'invention du microscope n'était pas suffisamment documentée, en son temps, pour permettre une conclusion définitive en ce qui concerne la date et l'inventeur, mais la première illustration reconnaissable d'un microscope remonte à 1625.[174] Le microscope doit accomplir trois tâches : produire une image agrandie de l'échantillon, rendre les détails de l'échantillon visible dans l'image, et de rendre les détails visibles à l'œil humain ou un appareil photo. De plus, tous les microscopes optiques modernes conçus pour la visualisation des échantillons possèdent les mêmes composantes de base telles (Figure 2.19) : une source lumineuse pour un éclairage soit diascopique ou épiscopique, un diaphragme et un condenseur, un objectif, un oculaire en plus d'une porte-échantillon, d'une tourelle à objectifs et d'une roue de focalisation. Aussi, le grossissement d'un microscope optique est composé du produit des puissances de l'oculaire (oculaire) et l'objectif. Par exemple, le grossissement maximum normal de l'oculaire et l'objectif sont de 10X et 100X respectivement donnant un grossissement final de 1000X.

Enfin, un microscope à fluorescence ou épifluorescence est un microscope optique utilisé pour étudier les propriétés des substances organiques ou inorganiques, utilisant les phénomènes de fluorescence et de phosphorescence en plus de la réflexion et l'absorption. En effet, l'absorption et le rayonnement de la lumière par des spécimens organiques et inorganiques sont généralement le

résultat de phénomènes physiques bien connus décrits comme étant soit la fluorescence ou la phosphorescence.[175]

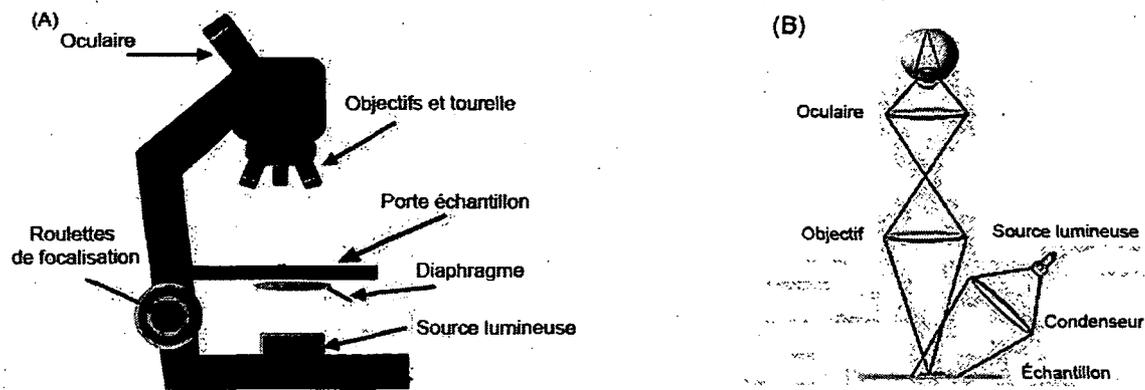


Figure 2.19 Représentations schématiques (a) d'un microscope optique classique et (b) du chemin optique dans un microscope classique avec éclairage épiscopique. [modifié de <http://www.kbears.com/sciences/microscopedefinition.html>]

L'émission de lumière à travers le processus de fluorescence est presque simultanée avec l'absorption de la lumière d'excitation ayant généralement un décalage de moins d'une microseconde. Cette méthode est d'une importance cruciale dans les sciences biologiques et médicales modernes, car elle peut être extrêmement sensible, permettant la détection de molécules uniques. Beaucoup de colorants fluorochromes différents peuvent être utilisés pour colorer les différentes structures ou des composés chimiques. Une méthode particulièrement puissante est l'utilisation d'anticorps couplés à un fluorochrome afin d'effectuer un immunomarquage. Quelques exemples de fluorochromes couramment utilisés sont à la fluorescéine ou la rhodamine.[176]

Par contre, en utilisant cette technique, aux grossissements très élevés les objets ponctuels sont vus comme des disques flous entourés par des anneaux de diffraction. Ce sont les disques d'Airy.[177] En effet, le pouvoir de résolution d'un microscope est considéré comme étant sa capacité de distinguer entre deux disques d'Airy rapprochés (ou, en d'autres termes la capacité du microscope à révéler les informations structurelles adjacentes distinctement et séparément). Ce

sont ces effets de diffraction qui limitent la capacité de résoudre des détails fins. L'étendue et l'ampleur de la figure de diffraction dépendent à la fois de la longueur d'onde de la lumière (λ), ainsi que de l'ouverture numérique (NA) de l'objectif. Il y a donc une limite finie au-delà de laquelle il est impossible de résoudre les points distincts, aussi connue comme la limite de diffraction.[178]

2.6.4 Le microscope à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM) ou microscopie à force (SFM) est un type de la microscopie à sonde de très haute résolution, avec une résolution démontrée de l'ordre de quelques fractions de nanomètres, ce qui est plus de 1000 fois mieux que la limite de diffraction optique.[179]

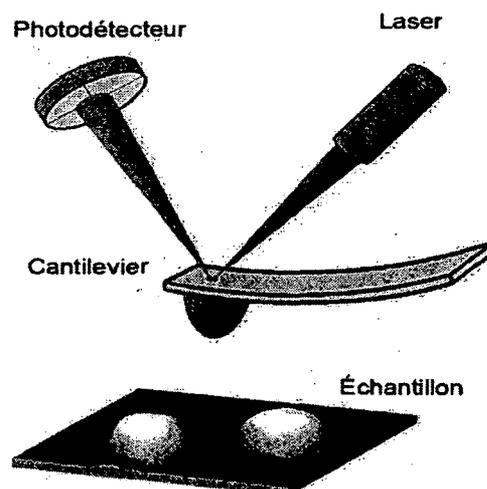


Figure 2.20. Représentation d'un système de déviation du faisceau, utilisant un laser ainsi qu'une photodiode mesurant la position du faisceau lors de la mesure d'un échantillon. [modifié de <http://www.few.vu.nl/~wroos/Research.html>]

L'AFM est l'un des outils d'avant-garde permettant l'imagerie, la mesure, et la manipulation de la matière à l'échelle nanométrique. Les informations sont recueillies en surveillant les déplacements d'une sonde mécanique en contact avec l'échantillon.(Figure 2.20) Aussi des éléments piézo-électriques facilitent le contrôle, minuscule, mais exact et précis, sur les mouvements de commande permettant le balayage de trame (raster scan) précis. De plus, l'AFM a l'avantage de donner la possibilité d'obtenir la topographie de tout type de surface, y

compris les polymères, céramiques, composites, verre, et bien sûr d'échantillons biologiques.

La plupart des appareils AFM utilisés aujourd'hui fonctionnent selon un système de déviation de faisceau laser, où un laser est réfléchi sur le dos du levier de l'AFM et cette réflexion est détectée par une photodiode sensible à la position du rayon réfléchi. (Figure 2.20) Les cantilevers AFM sont microfabriqués à partir de Si ou de Si_3N_4 et le rayon de courbure de ceux-ci est typique de quelques dizaines de nanomètres.

L'utilisation de microscopie optique et à force atomique a été faite afin de vérifier la présence et l'immobilisation des micro-organismes sur les échantillons biofonctionnalisés.

2.6.5 Mesures d'angle de contact

L'angle de contact est l'angle sous lequel une interface liquide/vapeur rencontre une surface solide. L'angle de contact est spécifique pour un système donné et est déterminée par les interactions entre ces trois interfaces.

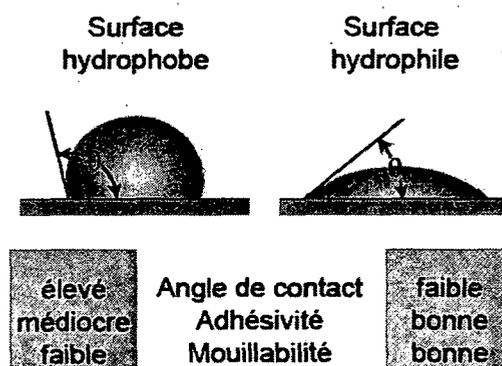


Figure 2.21 Images schématiques de l'angle de contact d'une goutte d'eau sur des échantillons hydrophobes et hydrophiles. [modifié de <http://www.ramehart.com/contactangle.htm>]

Le plus souvent, le concept est illustré par une petite goutte de liquide reposant sur une surface plane horizontale solide. (Figure 2.21) La forme de la goutte est déterminée par la relation de Young, dépendant de la relation entre les forces d'adhésion et de cohésion et qui relie donc la tension superficielle des trois

interfaces. L'angle de contact joue le rôle d'une condition limite et celui-ci est mesuré à l'aide d'un goniomètre. En effet, en cas d'une forte énergie d'interface liquide-solide, le liquide aura tendance à ne pas s'étaler sur la surface du solide et reste sous forme d'une gouttelette.

Les trois interfaces se rejoignent sur une ligne commune appelée ligne de contact et un angle de contact peut donc être mesuré.[180, 181] À partir de mesure d'angle de contact, il est possible d'estimer l'hydrophilicité, la mouillabilité et l'adhésivité des surfaces. En effet, considérons une goutte de liquide sur une surface solide. Si le liquide est très fortement attiré par la surface solide (par exemple l'eau sur un solide fortement hydrophile) la goutte sera complètement étalée sur la surface solide et l'angle de contact sera proche de 0° . Les solides moins fortement hydrophiles auront un angle de contact allant jusqu'à 90° . En général, sur de nombreuses surfaces fortement hydrophiles, les gouttelettes d'eau présentent des angles de contact de 0° à 30° . Si la surface solide est hydrophobe, l'angle de contact sera supérieur à 90° . Sur les surfaces très hydrophobes les surfaces ont des angles de contact peuvent être aussi élevées que 120° . [182] Dépendamment de l'angle mesuré, par exemple, à travers le gaz plutôt que par le liquide, l'explication ci-dessus sera inversée.

Les mesures d'angle de contact ont permis de vérifier l'hydrophilicité et la mouillabilité des surfaces produites en fonctionnalisant les échantillons recouverts de Si_3N_4 puisque ces caractéristiques permettront d'indiquer l'état de la surface avant le processus de fonctionnalisation et donc son succès.

2.6.6 Cartographe de photoluminescence; Hi-PLM

Les cartographes de PL sont des instruments basés sur l'excitation laser et sont utilisés pour générer des cartes selon plusieurs paramètres d'échantillons de pleine taille en mesurant l'émission de luminescence optique émise à partir de la matière excitée à l'aide d'une d'énergie supérieure à sa largeur de bande interdite. Les mesures de PL prises, lors de ce travail, ont été effectuées à l'aide d'un cartographe de PL fait sur mesure conçue pour prendre des cartes hyper spectrales (Hyperspectral imaging Photoluminescence Mapper; Hi-PLM).[22] Le

cartographe utilisé peut accueillir des échantillons allant jusqu'à $7 \times 7 \text{ mm}^2$ fournissant une résolution spatiale de $5 \mu\text{m}$. La zone où se trouvait l'échantillon était excitée à l'aide d'un laser émettant à 532 nm en mode continu. (Figure 2.22) L'acquisition des spectres a été faite à des longueurs d'onde entre 856 et 876 nm , celle-ci a duré environ 165 s avec un pas de 2 nm . Dans notre étude, l'interface informatique du système HI-PLM a été automatisée et la collecte d'une série chronologique de cartes de PL a été prise avec intervalles de 10 min .

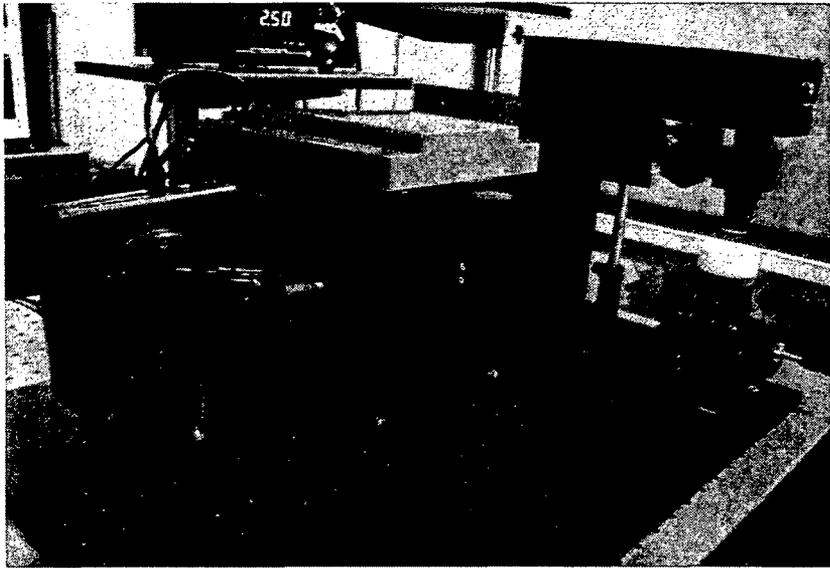


Figure 2.22 Cartographe de photoluminescence (Hi-PLM)

L'illumination des échantillons a été contrôlée par un obturateur programmé par ordinateur qui a été ouvert au cours du temps d'intégration de la PL seulement. Des cartes obscures ont été également enregistrées et utilisées pour la soustraction d'un d'arrière-plan. Une fenêtre en silice réfléchissant 4% de la source d'excitation à une photodiode de silicium a été utilisée pour la normalisation de puissance. Finalement, l'intensité calculée du spectre de PL provient de la moyenne spatiale de chaque carte collectée.

2.7 Les charges négatives et la PL

Le projet présenté sera la détection de bactéries en se basant sur l'intensité de PL émise par un substrat fonctionnalisé de GaAs suite à l'immobilisation spécifique de bactéries. Pour se faire les propriétés électriques de ces bactéries ont été

exploitées. Il a été connu pour un certain temps que les charges négatives portées à la surface des semi-conducteurs produisent une émission accrue PL. Plusieurs articles ont rapporté que l'intensité de PL est directement corrélée avec une densité d'états de surface (N_{ss}) diminuée. En effet, la densité d'états de surface affecte l'accumulation de charges à la surface, ce qui modifie en retour l'épaisseur de la couche d'appauvrissement.[183] Pour un semi-conducteur de type n, les donneurs adsorbés peuvent compenser la courbure de bande et donc changer le champ électrique présent à proximité de la surface, réduisant ainsi la région d'appauvrissement.(Figure 2.23) Une couche d'appauvrissement importante réprime le signal de PL et augmente la vitesse de recombinaison de surface (non-radiative). Il est donc normal d'observer une augmentation de la PL, suite à la fixation de charges négatives, causée par une dé-courbure de bandes et une réduction du taux de recombinaison non radiative de surface.[142]

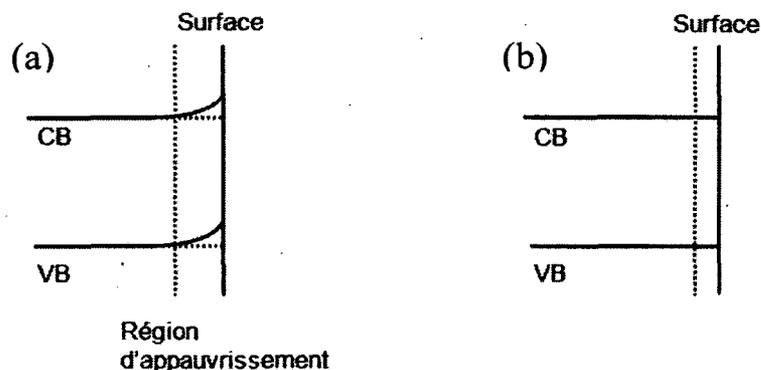


Figure 2.23 Schéma de la structure électronique d'un semi-conducteur de type n (a) ayant un haut degré de courbure de bande et (b) une dé-courbure de bande, avec la ligne verticale de droite indiquant la surface du GaAs.

[modifié de <http://www.chm.bris.ac.uk/pt/diamond/gustavothesis/chapter5.htm>]

Par exemple, une étude, menée par Hasegawa et coll., a démontré l'effet de divers traitements chimiques sur l'intensité de la PL émise par des substrats de GaAs (001). Ils ont montré que l'ajout de charges fixes modifie la position de l'énergie pour la neutralité globale de charge de surface (overall surface charge neutrality). La PL a donc été renforcée par l'oxydation photochimique et le dépôt de Na_2S car ils ont apporté des charges fixes négatives sur la surface de GaAs, diminuant ainsi par le fait même la N_{ss} . [184]

Une autre étude réalisée par Geisz et coll. rapporte les mêmes observations. Après l'absorption chimique de molécules SO_2 gazeux sur des surfaces de GaAs, il y a eu un changement dans la densité de la charge à sa surface. L'augmentation de l'intensité de PL qui a été observée lors de l'introduction de SO_2 semble donc être causée par ce changement dans la N_{ss} . [185] En effet, supposons que le semi-conducteur est d'abord de charge neutre, en considérant que la charge des trous est exactement égale à la charge négative des électrons. Si l'on introduit des charges négatives à sa surface, on peut assumer que les charges négatives ne seront plus séparées par un champ électrique et la recombinaison électron-trou sera possible. De plus, en ayant une proportion diminuée de N_{ss} on favorise ainsi l'occurrence de la recombinaison radiative.

Finalement, suite à l'étude du comportement du GaAs, en terme de PL, faite à partir de solutions ayant différents pH, il a été possible de démontrer, en laboratoire, l'effet de l'introduction de charges négatives ou positives à l'aide d'un cartographe de PL.

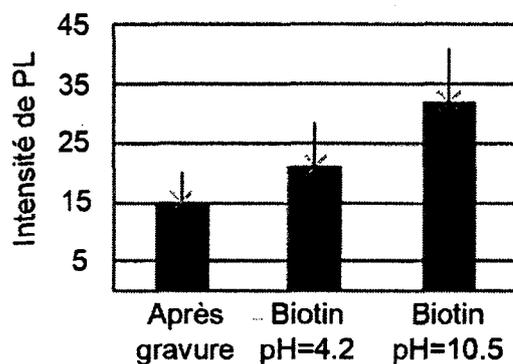


Figure 2.24 Augmentation de la PL en fonction de l'absorption non-spécifique de molécules chargées négativement

En effet, en utilisant des molécules de D-biotine, il a été possible de déterminer la magnitude de l'impact qu'ont les molécules chargées sur l'émission du GaAs. (Figure 2.24) L'adsorption non-spécifique de cette vitamine sur des substrats de GaAs a été réalisée dans différents pH pendant 2 heures à température ambiante avant de rincer et sécher les échantillons. La concentration en protéines utilisées

était de 0,2 mg/ml. La figure 2.24 montre que le signal de PL augmente de façon significative avec une augmentation de la présence de charges négatives. Puisque le point isoélectrique de la biotine est de 3,5,[186] en modifiant le pH, allant d'acide (4,2) à basique (10,5) on module la présence de charges négatives ce qui provoque une augmentation du signal de PL de plus de 2 fois par rapport au niveau initial ; sans traitement, dans le cas de l'utilisation d'une solution à un pH de 10,5.

En outre, depuis le début des années 1900 de nombreux articles parlent de la charge globale négative que les bactéries vivantes possèdent. Un certain nombre de chercheurs ont étudié la nature de la charge électrique de bactéries. Bechhold a été le premier, en 1904, à remarquer le fait que les cellules bactériennes portent une charge négative. Cernovodeanu et Henri ont étudié, en 1906, une plus grande série de bactéries et ont signalé que toutes les espèces portaient une charge négative.[187] Depuis lors, un nombre important d'articles ont appuyé cette affirmation. La paroi des cellules Gram-négatives contient, en plus de la membrane cytoplasmique et la couche de peptidoglycane, une membrane extérieure supplémentaire composée de phospholipides et des lipopolysaccharides (LPS) qui se trouvent sur la membrane externe comme indiqué sur la figure 2.25.

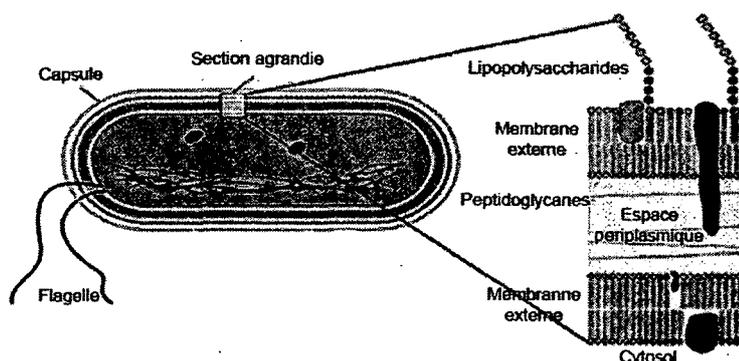


Figure 2.25 La paroi cellulaire d'une bactérie Gram-négative. [modifié de http://www.thefullwiki.org/Gram_negative_bacteria]

Puisque les lipopolysaccharides sont des molécules très fortement chargées négativement et omniprésentes sur la paroi des cellules Gram négative, elles confèrent donc une charge globale négative à ces bactéries. Aussi, la paroi

cellulaire des bactéries Gram positives est caractérisée par la présence d'une couche épaisse de peptidoglycanes. Des polyalcools sont encastrés dans cette couche et sont appelés acides téichoïques, certains d'entre eux sont liés à des lipides pour former des acides lipotéichoïques. Les acides téichoïques donnent une charge globale négative, à la paroi cellulaire des bactéries Gram positives, en raison de la présence de liaisons phosphodiester situés entre les monomères acides téichoïques. (Figure 2.26)

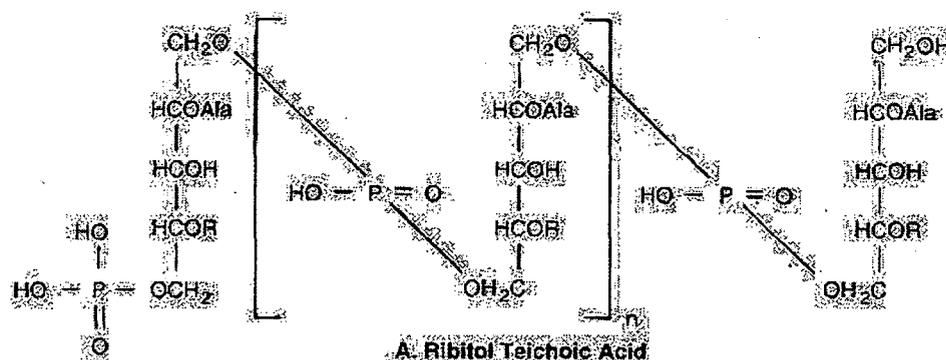


Figure 2.26 Structures chimiques d'un acide téichoïque, montrant un monomère d'acide téichoïque et une liaison phosphodiester.

[modifié de

<http://eglobalmed.com/core/MedicalMicrobiology/gsbs.utmb.edu/microbook/ch002.html>]

De plus, il a été démontré que les polycations, ont une grande affinité pour les LPS de bactéries négatives telles que *Pseudomonas aeruginosa*. [188] En effet, les résultats obtenus par Peterson et ses collaborateurs soutiennent l'idée que les charges positives sur les antibiotiques polycationiques sont attirées par les groupes chargés négativement sur la LPS. Aussi, les bactéries Gram-négatives ont la capacité de s'absorber sur des surfaces minérales. L'importance de cette interaction est due aux propriétés électrostatiques de la membrane externe, à savoir, la surface de la membrane externe couverte de LPS. [189] En effet, il a été montré que des oxydes métalliques peuvent augmenter l'adhérence des bactéries chargées négativement à la surface, principalement en raison de leur charge positive. Finalement, l'adhésion des bactéries sur des surfaces en verre recouvertes ou non d'oxydes de métal a été testée pour déterminer l'effet de ces

différents types de surfaces inorganiques sur l'adhérence bactérienne. Il a été constaté que toutes les bactéries étaient effectivement chargées négativement, avec des potentiels zêta, qu'ils postulent égaux à la charge de surface des cellules bactériennes, allant de -20 à -53 mV dans une solution faiblement ionique. [189] Ainsi, les bactéries, entre autres, *Escherichia coli* et *Legionella pneumophila* sont chargées négativement.

On peut donc postuler que l'attachement de manière spécifique de ces agents bactériens à la surface du GaAs devrait produire une émission de PL renforcée correspondant à la liaison et la quantité de bactéries liées. Cependant, il a été important de démontrer que l'augmentation de la PL est due seulement à la présence de charges négatives. En effet, il aurait été possible qu'un changement d'indice de réfraction à proximité de la surface : soit l'accumulation de bactéries ayant un indice supérieur à celui de la solution (≈ 1.33), ait un effet sur l'émission de PL.[190] Pour se faire, des microbilles recouvertes de steptavidine, ayant un indice de réfraction de 1,6, ont été achetées chez Bangs Laboratories, Inc. (Indiana, États-Unis). Des échantillons de GaAs passivés avec des thiols biotinylés ont été exposés à une concentration de 6.11×10^8 microbilles/ml. Les billes ont été dissoutes dans des solutions ayant deux pH différents, soit 4,0 et 10,3. Puisque le pI de la steptavidine est de 5 [186], en modifiant le pH, allant d'acide (4,0) à basique (10,3) on modifie la présence de charges positives ou négatives ce qui n'a aucun effet ou provoque une modulation du signal de PL en fonction du temps, respectivement. (Figure 2.27)

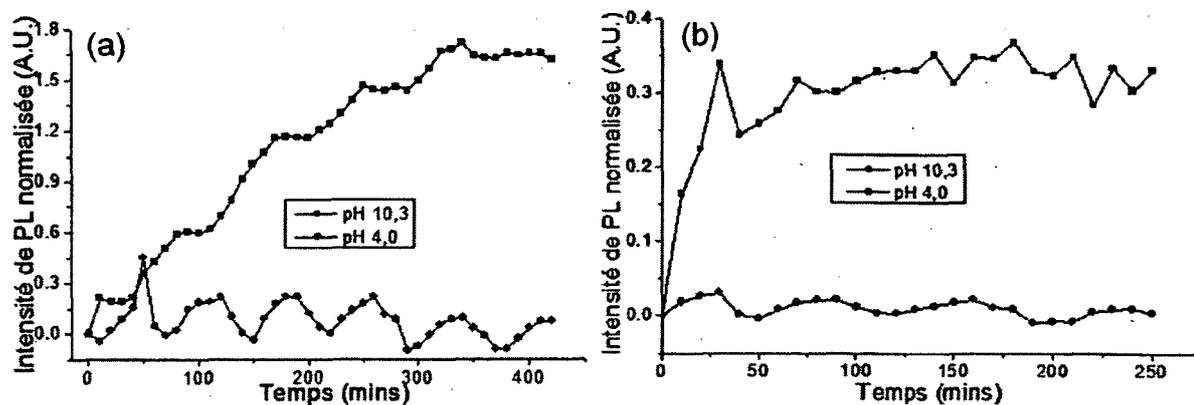


Figure 2.27 Modulation de la PL, suite à l'absorption spécifique de microbilles chargées en fonction du pH de la solution utilisée. Mesurée en temps réel à l'aide du Hi-PLM en (a) conditions stagnantes et (b) avec un chambre microfluidique.

De plus, après avoir rincé et séché les échantillons, il est possible d'observer à l'aide d'une image de microscopie optique (Figure 2.28) que les billes ont été spécifiquement immobilisées sur la surface.



Figure 2.28 Microscopie optique en champ clair obtenu après l'exposition de l'échantillon de GaAs passivé à l'aide de thiols biotine à 6.11×10^8 billes/ml.

Dans le cadre de ce mémoire, l'immobilisation spécifique de pathogènes viraux sera d'abord présentée afin de démontrer l'efficacité et la spécificité de la première architecture présentée. En second lieu, cette même architecture ainsi qu'une seconde architecture ont été utilisées afin de procéder à la détection d'*E. coli* dans un milieu aqueux ainsi que dans l'atmosphère ambiant. Enfin, la première architecture a été utilisée afin de procéder à la détection de *L. pneumophila* dans un échantillon d'eau.

Chapitre 3. IMMOBILIZATION DE MICRO-ORGANISMES

Auteurs et affiliation :

Valerie Duplan : étudiante à la maîtrise, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et informatique et Faculté des sciences de la santé, Département de microbiologie et d'infectiologie.

Yannick Miron : assistant de recherche, Université de Sherbrooke, Faculté de médecine, Département de Pharmacologie.

Eric Frost : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté des sciences de la santé, Département de microbiologie et d'infectiologie.

Michel Grandbois : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de médecine, Département de Pharmacologie

Jan J. Dubowski : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et informatique

Date d'acceptation : 25 août 2009

État de l'acceptation : Version finale publiée

Revue : Journal of Biomedical Optics

Référence : Duplan, V., et coll., *Specific immobilization of influenza A virus on GaAs (001) surface*. Journal of Biomedical Optics, 2009. 14(5): p. 054042-6.

Titre français : Immobilisation spécifique du virus de l'*influenza* A sur une surface de GaAs (001)

Contribution au document :

Cet article contribue à la thèse en élaborant sur l'enquête faite sur la production de bioarchitectures visant l'immobilisation spécifique de micro-organismes sur une surface de GaAs. Un des éléments clés dans le développement d'un biocapteur optique basé sur la PL émise par le GaAs est la possibilité d'immobiliser spécifiquement différents analytes sur celui-ci. Nous rapportons l'étude de la bio-fonctionnalisation du GaAs (001) avec des thiols polyéthylène-glycol (PEG) et l'immobilisation réussie du virus de l'*influenza A*.

Résumé français :

En vue de développer un biocapteur optique visant la détection rapide et le typage d'agents pathogènes viraux, nous avons étudié une bioarchitecture de détection qui tire parti de l'émission de la PL accrue de semi-conducteurs quantiques III-V (QS). Un des éléments clés dans le développement d'un tel biocapteur est la possibilité d'immobiliser différents analytes sur le GaAs — un matériau de choix pour le recouvrement de puits quantiques III-V de notre intérêt. Nous rapportons l'étude de la bio-fonctionnalisation de GaAs (001) avec des thiols polyéthylène-glycol (PEG) et l'immobilisation réussie du virus de l'*influenza A*. Une solution de thiols PEG biotinylés diluée avec des thiols PEG a été utilisée pour former un réseau de sites pour la fixation de neutravidine. Des anticorps polyclonaux anti-Influenza A biotinylés ont été appliqués pour étudier le processus de l'immobilisation du virus inactivé. L'immobilisation réussie a été démontrée en utilisant la microscopie à force atomique et des mesures de microscopie en fluorescence.

Note : À la suite des corrections demandées par les membres du jury, le contenu de cet article diffère de celui qui a été accepté.

Specific immobilization of influenza A virus on GaAs (001) surface

Valerie Duplan¹, Yannick Miron², Eric Frost³, Michel Grandbois², Jan J. Dubowski^{1*}

¹ Department of Electrical and Computer Engineering, Faculty of Engineering, Sherbrooke University, Sherbrooke, Québec J1K2R1, Canada

² Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Sherbrooke University, Sherbrooke, Québec J1H5N4, Canada

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Sherbrooke University, Sherbrooke, Québec J1H5N4, Canada

*To whom the correspondence should be addressed, E-mail:

Abstract. In the quest for the development of an all-optical biosensor for rapid detection and typing of viral pathogens, we have been investigating biosensing architectures that take advantage of strong PL emission from III-V quantum semiconductors (QS). One of the key elements in the development of such a biosensor is the ability to attach various analytes to GaAs – a material of choice for capping III-V QS of our interest. We report on the study of biofunctionalization of GaAs (001) with polyethylene-glycol (PEG) thiols and the successful immobilization of Influenza A virus. A diluted solution of biotinylated PEG thiols in OH-terminated PEG thiols has been used to form a network of sites for the attachment of neutravidin. Biotinylated polyclonal Influenza A antibodies were applied to investigate the process of the immobilization of inactivated Influenza A virus. The successful immobilization has been demonstrated using atomic force microscopy and fluorescence microscopy measurements.

Keywords: self assembled monolayers (SAM), polyethylene-glycol thiol SAM on GaAs (001), inactivated influenza A virus, specific immobilisation, atomic force microscopy, fluorescence microscopy, optical biosensor

3. Introduction

The need to identify rapidly and with high sensitivity different viral/bacterial pathogens, fungi and toxins is one of the major forces driving extensive research addressing development of biosensors. The conventional detection of viruses has been carried out with cell culture, [6] immunological methods [8, 9, 191] and molecular methods including polymerase chain reaction.[10] These techniques, however, require much time and expertise. [11, 12] The development of methods of detection that are specific for targeted biomolecules and are easy to carry out is necessary for medical diagnostics, clinical analysis or even field tests. [15, 16, 192] Biosensors containing organic molecules offer promising solutions due to their speed, simplicity and continuous monitoring capability. [17] Such sensors could comprise antibodies immobilized via organic molecules on glass surface, e.g., of a microstructured fiber, [193] Au surface of a semiconductor surface plasmon resonance device,[194] or Si surface. [192] Electrical properties of bacteria have also been taken advantage of in constructing an opto-electrical biosensor. [195] Optical and electronic properties of III-V and II-VI semiconductor quantum well (QW) and quantum dot (QD) microstructures are also attractive for building biosensing devices because they can be used for detecting miniscule perturbations of the semiconductor surface induced by selectively trapped biomolecules. For instance, bright PL of colloidal CdSe QD has been investigated to develop fluorescent probes in sensing, imaging, immunoassay, and some other diagnostics applications. [196-203] Recently, we have proposed that templates of epitaxial QD, such as InAs QD in a GaAs matrix could be used for constructing a family of innovative biosensors with a significant potential to address rapid detection of numerous pathogens in parallel. [204] Our interest in GaAs is driven both by its strong PL and applications as a capping material for IR emitting InAs QDs and some other quantum semiconductor microstructures. Consequently, the ability to immobilize specifically targeted biomolecules on the surface of GaAs is of high interest for the development of a proposed biosensor. We have recently reported on the successful immobilization of avidin on the surface of GaAs. [21] In this paper,

we report on the specific immobilization of inactivated Influenza A virus using an architecture based on antibody and a self-assembled monolayer (SAM) of polyethylene-glycol (PEG) thiol deposited on the GaAs (001) surface.

3.1 Experimental Methods

3.1.1 Materials

Wafers of GaAs (001), series VW 10680-53 and 54, were bought from Wafer Technology Ltd. (Milton Keynes, United Kingdom). Polyclonal antibodies against the virus of Influenza (H_3N_2) coupled with the biotin or coupled with the fluorescein isothiocyanate (FITC) were obtained from ViroStat, Inc (Portland, Me). Polyclonal antibodies against the Hepatitis B and Herpes simplex virus type 1 (HSV1) FITC conjugated were also obtained from Virostat. PBS 10X (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4) was bought from Sigma (Oakville, Canada). Neutravidin was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Burlington, Canada). Biotinylated PEG (polyethylene glycol) thiols and OH-terminated PEG thiols were obtained from Prochimia Surfaces (Gdansk, Poland). The molecular structure of these thiols is shown in Figure 3.1. Gamma ray inactivated viral particles of Influenza A (rank 2, stock Texas 1/77) were bought from Microbix Bio-Systems (Toronto, Canada). The inactivation of the virus is achieved due to the damage of its RNA genome. [205] In contrast to conventional chemical methods of inactivation that use formaldehyde, this method leaves the virus outer shell intact. Nominally anhydrous ethanol (98% v/v) was bought from Commercial Alcohols, Inc. (Brampton, Canada). To remove residual oxygen, a 500 mL flask filled with ethanol was purged for 4 hours with a 3 SCFH/cm³ high purity nitrogen stream (> 99%, Praxair Canada Inc.). OptiClear, a solvent designed to remove impurities present at the surface of optical or electric compounds, was obtained from National diagnostics (Mississauga, Canada). Acetone was bought at ACP (Montréal, Canada); isopropanol (2-propanol) was obtained from Fisher Scientific (Ottawa, Canada), acetic acid (CH_3COOH) was obtained from Fisher Scientific and ammonium hydroxide 28% (NH_4OH) was

bought at Anachemia (Richmond, Canada). All the solvents were Lab grade and all the products have been used without additional purification.

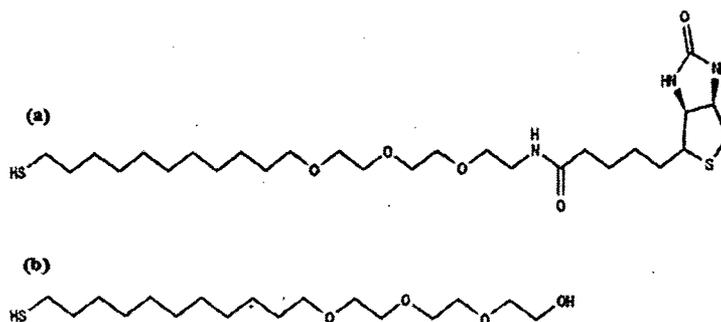


Figure 3.1 Molecular structure of a) Biotinylated PEG thiol (SH-[CH₂]₁₁-EG₃-Biotin), and b) OH-terminated PEG thiol (SH-[CH₂]₁₁-EG₃-OH).

3.2 Preparation of the Samples

A substrate of crystalline GaAs (001) was used to carry out the procedure of biofunctionalization. Samples of 4 mm x 4 mm, obtained by cleaving GaAs (001) wafers, were cleaned sequentially during 5 minutes in an ultrasonic bath of undiluted solutions of OptiClear, acetone and isopropanol, similar to a previously described procedure. [21] The samples were, thereafter, dried using a flow of compressed nitrogen and etched with a solution of concentrated ammonium hydroxide for 2 minutes at room temperature to remove surface native oxides, such as Ga₂O₃, As₂O₅, and As₂O₃. [206] The samples were then rinsed with freshly deoxygenized ethanol and immediately incubated for 20 hours at room temperature in a mixture of biotinylated PEG thiol and OH-terminated PEG thiol (1:15) diluted in the deoxygenized ethanol to a final concentration of 2mM. The production of a biosensor using GaAs substrates primarily depends on our capacity to prepare the surface of this semiconductor so that it facilitates immobilization of targeted biomolecules. However, it is also important that the substrate remains stable and resists oxidation which could modify its optical and electric properties. The use of thiols helps to address this issue as it has been demonstrated that sulphuric inorganic compounds allow passivation of GaAs surface. [145, 207, 208] Moreover, ethylene glycol groups, present on the thiol

molecules used, provide an increased affinity of the antibodies for their antigens [209] and decrease nonspecific association of the antibodies to certain molecules. [210] The role of PEG thiols is also to prevent modification of the viability of the active site of the antibodies due to the steric hindrance effect [16] that could occur when they are too close to the substrate.

After thiolation, the samples were rinsed with isopropanol to get rid of superfluous thiol molecules physically adsorbed to the substrate. Thereafter, they were immersed for 2 hours in a PBS buffer containing a concentration of 200 μ g/ml of neutravidin. This step was followed by rinsing of the samples with the PBS buffer and then with deionised water. For the immobilization of polyclonal antibodies against the Influenza A virus, samples having been exposed to neutravidin were immersed for 2 hours in a solution of biotinylated antibodies diluted (1:25) in the PBS buffer. Once the incubation was completed, the samples were placed for 2 hours in a solution containing 300ng/ml (10 HA units/ml) of inactivated viral particles. This was followed by rinsing the samples with the PBS solution and storing them in PBS for characterization or future processing.

The procedure of biofunctionalization and the exposure of samples to the viral particles are schematically illustrated in Figure 3.2. A series of samples biofunctionalized with antibodies against influenza A were prepared by exposing them to inactivated influenza A viruses. Additional samples were prepared by immersing the Influenza A virus exposed samples for 2 hours in FITC conjugated antibodies against Influenza A, Hepatitis B or Herpes simplex virus type 1 (HSV1) diluted in PBS buffer. These samples, after rinsing with PBS and water to remove residual salts from the surface, were used for fluorescence microscopy experiments.

3.2.1 Interface and Surface Characterization

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy

In order to verify the process of PEG-thiol SAMs formation on the GaAs (001) surface, FTIR absorption was investigated in the region characteristic of the CH₂ stretching vibrations (2800-3000 cm⁻¹). The spectra were collected using an

FTIR Bruker Optics Hyperion 2000 microscope coupled with a spectrometer (Bruker Optics Tensor 27). The analyzed area was approximately 2 mm in diameter and the spectral resolution was 4 cm^{-1} . A sample that was etched and incubated in ethanol was used to determine a baseline for the spectroscopy measurements.

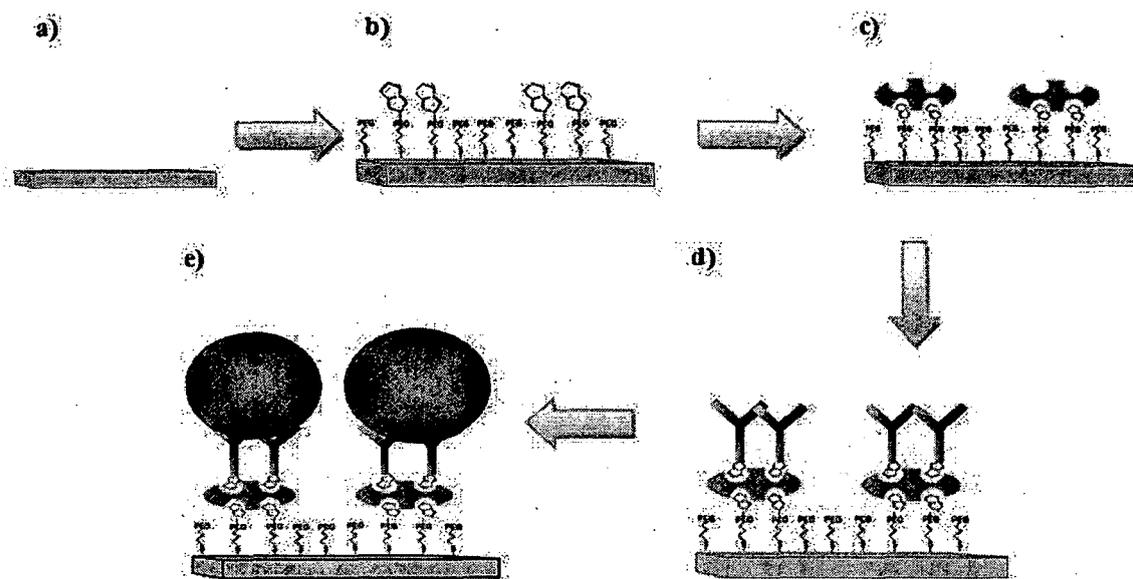


Figure 3.2. Schematic illustration of the biofunctionalization steps applied for the immobilization of the Influenza A virus on GaAs (001) substrate (a) that having been etched with NH_4OH was passivated using a 2mM solution of mixed PEG thiols (1:15) (b) and incubated in a solution of neutravidin (c). Biotinylated antibodies against Influenza A were immobilized on the neutravidin coated substrate (d), which allowed immobilizing virus particles from a solution (e).

Atomic Force Microscopy (AFM)

Surface morphology of processed samples was investigated using a Bioscope AFM (Veeco Metrology, Inc., California) operating in a contact mode. The biofunctionalized samples were never exposed to atmosphere and their characterization was carried out in a PBS buffer solution. A MLCT-AUHW type tip (Veeco Metrology, Inc.) was used with a cantilever spring constant of 0.03N/m . The AFM measurements of a reference GaAs sample (etched only) were carried out in an air ambient with contact mode using a Nanoscope E AFM (Veeco Metrology, Inc.).

Fluorescence Microscopy

The fluorescence emitted by FITC fluorochrome (518-523 nm) attached to antibodies against Influenza A was observed using fluorescence microscopy (Olympus IX71 inverted microscope with a DP71 digital camera). The excitation of the FITC fluorochrome was carried out with a blue light source emitting between 450-490 nm.

3.3 Results and Discussion

3.3.1 PEG Thiol SAM Formation on GaAs (001)

The formation of PEG thiol SAMs on the surface of GaAs (001) was investigated by examining the spectral location and intensity of the FTIR peaks corresponding to stretching vibrations of CH₂ molecules. Figure 3.3 shows the FTIR spectra obtained for three different samples fabricated under nominally the same conditions. Two peaks at 2925 ± 2 and 2852 ± 2 cm⁻¹ that correspond to absorption by asymmetrical and symmetrical stretching vibrations of CH₂, respectively, have been observed for all the investigated samples. The spectral location of these peaks approaches that reported for highly organized 11-CH₂-chain SAMs. [211, 212]

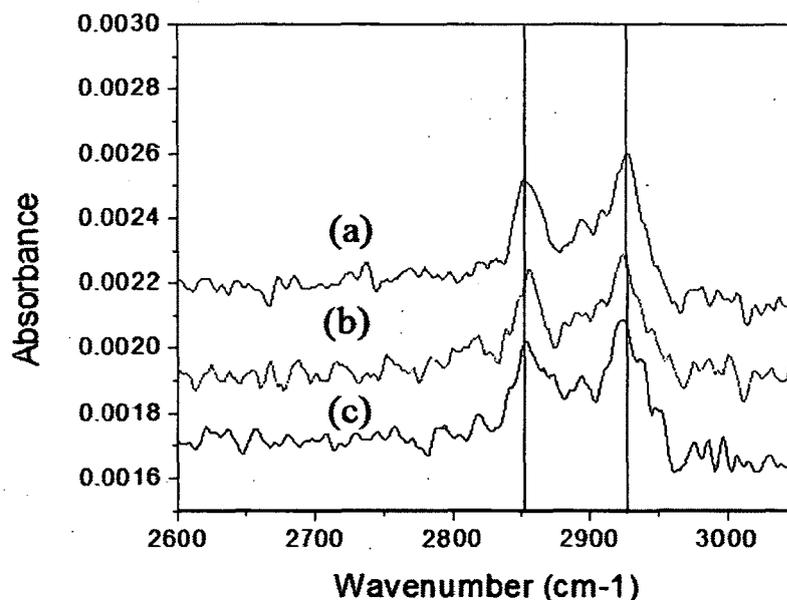


Figure 3.3. FTIR spectra of SAMs deposited on three different GaAs (001) samples (a, b, c) demonstrating the reproducibility of the thiolation process.

However, we note that the maximum peak intensity of the spectra observed in Fig. 3 is more than 2 times weaker than that observed under nominally the same experimental conditions from the 11-CH₂-chain SAMs on (001) GaAs. [213] This could indicate a fractional coverage of the GaAs substrate, although the presence of PEG molecules is also expected to augment the overall IR absorption. More study is required to address this problem.

3.3.2 Surface Morphology and Biofunctionalization

The surface morphology of an etched GaAs (001) sample is shown by an AFM micrograph in Figure 4a. The root-mean-square roughness amplitude of the investigated 3.25 μ m x 3.25 μ m area is 0.3nm. This value is expected for the high-quality GaAs (001) surface, and it is comparable to the results reported in literature. [214] Figure 4b is an AFM micrograph of the GaAs (001) surface biofunctionalized with the Influenza A antibody (as illustrated by the step represented in Fig. 3.2.d). The micrograph shows a granular microstructure composed of nanoparticles, each between 5-15nm in diameter. These could represent neutravidin, the largest size biomolecule present in the studied sample. However, we have observed that samples exposed exclusively to the PBS buffer solution exhibited qualitatively a similar surface morphology to that represented in Figure 3.4.b. This suggests that some PBS nanoparticles precipitate on the surface of samples studied by liquid phase AFM, making it difficult to distinguish nanoparticles of different origin. An AFM micrograph of a fully biofunctionalized (001) GaAs sample that was exposed to the Influenza A virus is shown in Figure 4c. A significantly different surface morphology in this case is characterized by the presence of large nanoparticles, typically 120-250nm wide at the base and 50-100 nm tall. It is known that the Influenza virus is a quasi-spherical object, approximately 100-120nm in diameter. [215, 216] Therefore, it seems reasonable to assume that the large nanoparticles in Figure 3.4.c represent either individual or clustered Influenza virus particles. The tip convolution effect makes the viral particles detected appear larger than 120nm and a higher magnification experiment would have to be carried out to view details of the viral particle. [217] The slightly reduced height of the viral particles observed in this

experiment could be explained by the possible flattening occurring due to the pressure exercised by the AFM cantilever tip.

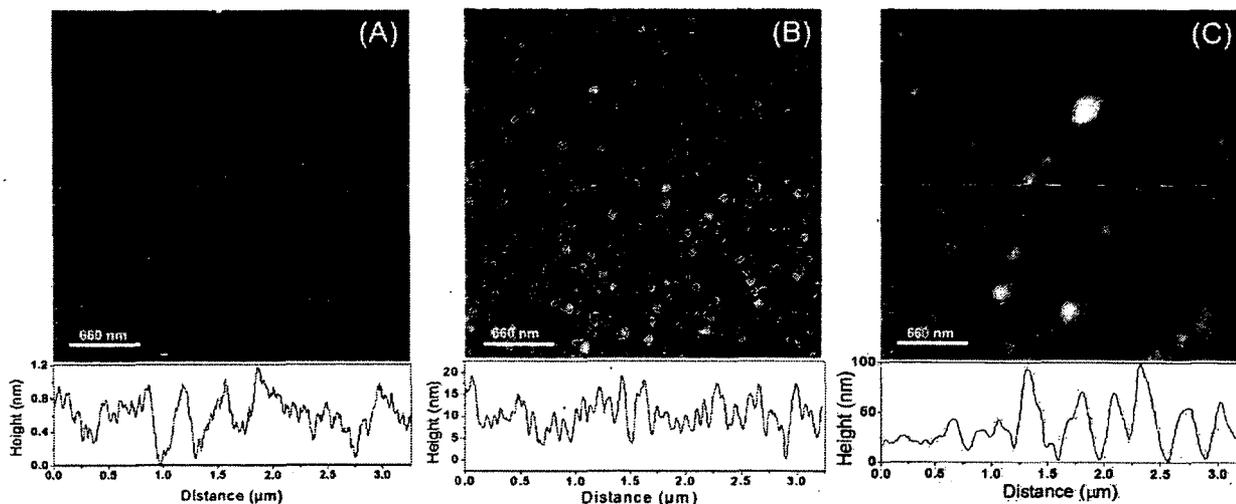


Figure 3.4. AFM images and cross-sectional scans of a reference GaAs (001) sample (a), the GaAs (001) sample biofunctionalized with PEG thiols and neutravidin (b), and the sample that following the functionalization with the Influenza A antibody was exposed to a solution of inactivated Influenza A virus (c).

Using AFM images, we have estimated that the average density of Influenza A particles covering the biofunctionalized GaAs (001) surface is approximately at 45 per $100\mu\text{m}^2$.

3.3.3 Fluorescence Tests on Virus Exposed Samples

An example of the fluorescence microscopy image from the Influenza A antibody biofunctionalized sample that was exposed to the inactivated Influenza A virus and to the FITC conjugated antibodies against influenza A is shown in Figure 3.5. A network of bright spots emitting at about 518nm can be seen in this image. In contrast, the similar experiment with samples exposed to Hepatitis B and Herpes simplex virus FITC conjugated antibodies provided images free of green fluorescence. We consider this to be evidence of the inactivated Influenza A virus immobilized at the surface of investigated GaAs (001) samples. Density of influenza A particles covering the surface has been estimated, according to the fluorescence measurements, at approximately 25 per $100\mu\text{m}^2$.

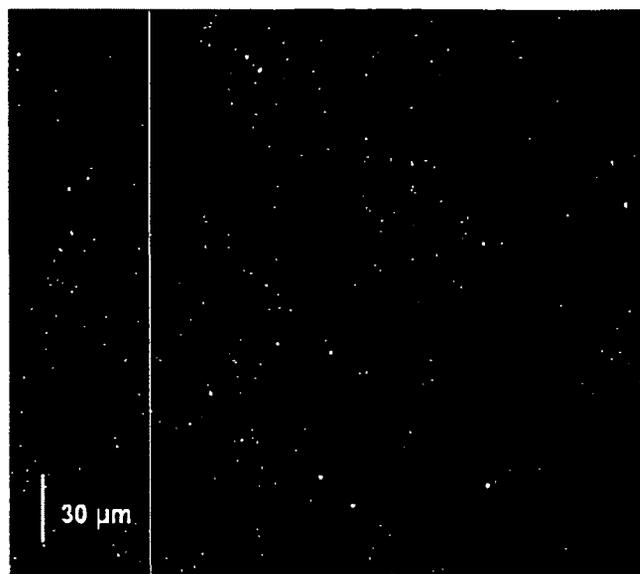


Figure 3.5. Fluorescence microscopy image of a GaAs (001) sample that following the specific immobilization of the Influenza A virus was exposed to fluorescein stained antibody against the Influenza A virus.

The reduced density of viral particles given by the fluorescence microscopy imaging in comparison to that obtained from the AFM experiments could be attributed to the lower binding efficiency of the FITC polyclonal antibodies to the viral particles. Indeed, it has been reported that biotin can be coupled to proteins, such as antibodies, with no significant loss of their binding affinity. [218, 219] However, it has been observed that labelling antibodies with fluorescent molecules, such as FITC, often results in a significant loss of immunoreactivity. [220] The spatial resolution of the fluorescence imaging is significantly inferior to that of the AFM technique. Thus, it is possible that more than one viral particle could be associated with an individual emission spot observed in Figure 3.5. Regardless of this discrepancy, it seems reasonable to expect that the optimized process of immobilization could yield even greater concentrations of viral particles specifically attached to the surface of GaAs (001).

In conclusion, we have investigated biofunctionalization of the GaAs (001) surface with the aim to immobilize influenza A virus. Samples with an

architecture comprising polyethylene-glycol (PEG) thiols, biotin and neutravidin provided surface sites suitable for the attachment of biotinylated influenza A antibodies. Following this step, the samples were exposed to a 300ng/ml solution comprising γ -radiation inactivated influenza A particles. With the AFM measurements, we have identified the presence of viral nanoparticles on such samples. The surface density of immobilized particles has been estimated as 45 per $100 \mu\text{m}^2$. Using fluorescence microscopy, we were able to verify the nature of these nanoparticles. Indeed, bright fluorescence images were observed following the exposure of samples with immobilized Influenza A virus to FITC conjugated Influenza A antibodies. No measurable fluorescence was recorded for the samples with immobilized Influenza A virus that were exposed to FITC conjugated both Herpes and Hepatitis antibodies. Based on the fluorescence microscopy measurements, the density of Influenza A particles specifically immobilized on the biofunctionalized GaAs (001) surface has been estimated as at least 25 per $100\mu\text{m}^2$. To the best of our knowledge, these results are the first evidence of controlled immobilization of viral particles on GaAs. We consider this achievement to be an important step towards demonstration of a III-V semiconductor based photonic biosensor.

3.4 Acknowledgements

We thank Greg Marshall for FTIR measurements. This research has been supported by the Canada Research Chair in Quantum Semiconductors Program and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

Chapitre 4. CONCEPTION ET RÉALISATION D'UN BIOCAPTEUR BASÉ SUR LA PL

Auteurs et affiliation :

Valerie Duplan : étudiante à la maîtrise, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et informatique et Faculté des sciences de la santé, Département de microbiologie et d'infectiologie.

Eric Frost : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté des sciences de la santé, Département de microbiologie et d'infectiologie.

Jan J. Dubowski : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et informatique

Date de soumission : janvier 2011

Revue : Sensors and actuators B

Titre français : Un biocapteur quantique à base de semi-conducteurs pour la détection rapide in situ de *Escherichia coli*.

Contribution au document :

Cet article contribue à la thèse en élaborant sur l'enquête et la description de deux nouvelles méthodes d'immobilisation d'anticorps pour le développement d'un biocapteur optique basé sur l'émission de PL du GaAs. La première méthode se basant sur la technique décrite dans le chapitre précédent, c'est-à-dire selon l'utilisation de SAM, de neutravidine et d'anticorps polyclonaux. La deuxième méthode se base sur le recouvrement du GaAs avec une fine pellicule de Si_3N_4 afin d'améliorer la stabilité de celui-ci en milieu aqueux. Le processus d'immobilisation des bactéries a été démontré et la détection de celles-ci a été faite à l'aide de mesures de PL, de substrats provenant de la série V0729. La limite de détection inférieure obtenue était de 10^4 UFC/ml dans les deux cas.

Résumé français :

Ce travail décrit une nouvelle méthode de détection d'*Escherichia coli* en utilisant l'émission de PL émise par des dispositifs faits à partir de semi-conducteurs (QS) quantiques III-V, fonctionnalisés avec deux différentes architectures à base d'anticorps. La première approche a été basée sur l'emploi de monocouches auto-assemblées (SAM) de thiols polyéthylène glycol biotinylés pour immobiliser des anticorps biotinylés via la neutravidine. Dans la seconde approche, nous avons utilisé des microstructures QS revêtues d'une fine couche de nitrure de silice (Si_3N_4). Cette fonctionnalisation a permis l'attachement direct des anticorps dirigés contre *E. coli* suite à la gravure à l'acide fluorhydrique (HF) et à la réticulation avec le glutaraldéhyde. La microscopie à force atomique, microscopie optique et des mesures de microscopie par fluorescence ont été utilisées pour évaluer le processus d'immobilisation. Selon l'architecture utilisée, la densité des bactéries immobilisées était de 0,5 à 0,7 bactérie/ $100 \mu\text{m}^2$. La détection de *E. coli* à 10^4 UFC/ml a été faite en moins de 120 min d'exposition aux bactéries. On s'attend à ce qu'un seuil de sensibilité encore meilleur pourrait être atteint après une optimisation plus poussée de la méthode.

Note : À la suite des corrections demandées par les membres du jury, le contenu de cet article diffère de celui qui a été soumis.

A photoluminescence-based quantum semiconductor biosensor for rapid *in situ* detection of *Escherichia coli*

Valérie Duplan,^{a,b} Eric Frost,^b Jan J. Dubowski^{a,*}

^a Laboratory for Quantum Semiconductors and Photon-based BioNanotechnology, Department of Electrical and Computer Engineering, Faculty of Engineering, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

^b Department of Microbiology and Infectiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

*Corresponding author: Tel.:

fax:

Email address:

URL: <http://www.dubowski.ca>

Abstract

This work describes a novel method of detecting *Escherichia coli* using photoluminescence (PL) emission from III-V quantum semiconductor (QS) devices functionalized with two different antibody-based architectures. The first approach employed self-assembled monolayers of biotinylated polyethylene glycol thiols to immobilize biotinylated antibody via neutravidin. In the second approach, we used QS microstructures coated with a thin layer of Si₃N₄ allowing direct functionalization with *E. coli* antibodies through hydrofluoric acid etching and glutaraldehyde-based reticulation. Atomic force, optical and fluorescence microscopy measurements were used to assess the immobilization process. Depending on the biosensing architecture, density of the immobilized bacteria was observed in the range of 0.5-0.7 bacteria/100 μm². The detection of *E. coli* at 10⁴ CFU/ml was achieved within less than 120 min of the bacteria exposure. It is expected that an even better sensitivity threshold could be achieved following further optimization of the method.

Keywords: Quantum semiconductors; GaAs; Photoluminescence; Optical biosensor; Self-assembled monolayers; *Escherichia coli*;

4. Introduction

Traditional methods of pathogenic bacteria detection require the use of sophisticated analytical laboratories, often in centralized facilities, which require considerable capital and a highly skilled workforce [11, 12, 16, 221]. However, there are many cases where this approach is inadequate, mainly due to the long time-to-result period. For example, some standard methods, such as, the ISO 11731:1998 and ISO 6222:1999 for the detection of *Legionella pneumophila* require up to 10 days to yield results, as they rely on the ability of microorganisms to multiply to visible colonies [222]. Molecular detection methods such as polymerase chain reaction (PCR), although more rapid than culture based approaches, again require highly qualified personnel in central laboratory facilities. New, easy to use, technologies capable of rapid, selective and sensitive detection are needed for the detection of various pathogens [60, 94, 223]. Examples of methods studied for detection of food-borne and water-borne pathogens include surface plasmon resonance (SPR), electrochemical, impedimetric and piezoelectric [94, 224-226]. Due to the potentially rapid response of optical effects to surface located biochemical reactions, this approach has increasingly been investigated for detection of biological molecules such as DNA, bacteria, and other proteins or pathogens [227-230]. We have proposed that bright photoluminescence (PL) of epitaxial quantum dots (QD) could be used to study biochemical reactions on surfaces of III-V semiconductors [204]. Recently, we have demonstrated that optically confined GaAs/AlGaAs epitaxial microstructures could also be used to monitor surface effects related to the formation of a self-assembled monolayers (SAM) of alkanethiol [22] and decomposition of thimerosal [231]. Generally, the functioning of such a semiconductor biosensing device depends not only on its sensitivity, but also on the ability to maintain its stable response over an extended period of time. Indeed, the exposure of bio-functionalized, but unprotected III-V surfaces to oxygen and air atmosphere could degrade their electrical and optical properties [232]. Two different bio-architectures have been investigated in our laboratory to

produce a biosensor. Firstly, the sensor surface (GaAs) was functionalized with polyclonal antibodies using biotinylated polyethylene-glycol (PEG) hexadecanethiol (HDT) and neutravidin. The use of thiols helps to address the surface stability issue as it has been demonstrated that sulphuric inorganic compounds allow passivation of GaAs surface [24, 145, 207, 232]. A thiol-based architecture has recently been reported by us for the successful immobilization of influenza A virus [233]. Secondly, the sensor surface was coated with silicon nitride (Si_3N_4) prior to functionalization using glutaraldehyde. The GaAs surface covered with Si_3N_4 is protected from environmental exposure, while maintaining the functionalization ability [27, 28].

Here we report on the development of an optical biosensor based on PL emitted by a (001) GaAs/AlGaAs epitaxial microstructure biofunctionalized for detection of *E. coli*.

4.1 Experimental procedure

4.1.1 Materials

Quantum semiconductor (QS) wafers (V0729) used in this study comprised a 300 nm thick epilayer of GaAs separated from the surface by 3 $\text{Al}_{0.33}\text{Ga}_{0.67}\text{As}$ barriers (50, 90 and 25 nm thick) and 2 GaAs wells (3.0 and 5.5 nm thick). The microstructure was capped with a GaAs layer (5 nm thick) that was functionalized for specific immobilization of investigated biomolecules. Polyclonal antibodies against *E. coli* coupled with biotin or coupled with fluorescein isothiocyanate (FITC) were obtained from ViroStat, Inc (Portland, Me). D-PBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, pH 7.4) was bought from Wisent Bioproducts Inc. (Quebec, Canada). Neutravidin was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Burlington, Canada). Biotinylated PEG thiols were obtained from Prochimia Surfaces (Gdansk, Poland). An HDT solution was purchased from Sigma-Aldrich (Ontario, Canada). *E. coli* and *Lactococcus lactis* bacteria were obtained from the Department of Biology of Université de Sherbrooke (Quebec, Canada). Their culture was performed in Luria Bertani (LB) or Brain Heart Infusion (BHI) agars, respectively. Bacterial growth was performed in liquid medium and followed by

regular seeding on a solid-type LB or BHI agar. The bacteria were aliquoted and stored at - 26 ° C. Nominally anhydrous ethanol (98% v/v) was bought from Commercial Alcohols, Inc. (Brampton, Canada). To remove residual oxygen, a 250 mL flask filled with ethanol was purged for 4 hours with a 0.084 Nm³/hr high purity nitrogen stream (> 99% pure nitrogen, Praxair Canada Inc.). OptiClear, a solvent designed to remove impurities present at the surface of optical or electric compounds, was obtained from National diagnostics (Mississauga, Canada). Acetone was bought at ACP (Montréal, Canada); isopropanol (2-propanol) was obtained from Fisher Scientific (Ottawa, Canada), acetic acid (CH₃COOH) was obtained from Fisher Scientific and ammonium hydroxide 28% (NH₄OH) was bought from Anachemia (Richmond, Canada). A solution of hydrofluoric acid and gluteraldehyde were purchased from Sigma-Aldrich. All the solvents were Lab (suitable general laboratory applications) and A.C.S. (high quality) grade and all the products have been used without additional purification.

4.1.2 Biofunctionalization of the GaAs (001) surface

In the first approach, the QS samples of 4 mm x 4 mm x 0.63mm dimensions were cleaned etched and thiolated according to the procedure described in Supporting Information (Annex A). After thiolation, the samples were thoroughly rinsed with IPA and dried with N₂. PEG-based thiols were incorporated in the functionalization procedure as they are known to offer a decreased nonspecific association of the antibodies to certain molecules and, in addition to preventing steric hindrance, [16, 210] they possess the ability to sustain stretching which allows the recognition with several antibodies of a large size antigen, such as a bacterium. The samples with biotin terminated SAMs were immersed for 2 hours in a degassed PBS solution containing 3.33 μM of neutravidin, at room temperature. This step was followed by rinsing of the samples with PBS and then with deionised (DI) water. The biotin/neutravidin system was incorporated into the procedure due to the known strong affinity of these molecules and, thus, the increased specificity of the functionalized architecture as compared to other approaches, e.g., including NHS treatment [234, 235]. The neutravidin-coated

samples were exposed to 1 μM of biotinylated polyclonal antibodies against *E. coli* diluted in degassed PBS solution. This step was carried out at 4 °C for overnight hours. The samples were then rinsed, sequentially, in PBS and DI water, similar to a previously described procedure [233].

The second biofunctionalization approach involved working with QS wafers coated with a thin film of Si_3N_4 . The advantage of using Si_3N_4 is in protecting the GaAs surface more efficiently than with SAMs of PEG thiols against surface degradation in the water solutions of bacteria. The samples of dimension 5 mm x 5 mm x 0.63 mm were cleaned as previously stated and etched in concentrated (49%) hydrofluoric acid (HF) for 15 seconds to remove all native oxides and other surface contaminants [236]. This step was followed by rinsing with DI water and drying with an N_2 gun. A 40 nm thick Si_3N_4 layer was deposited on such prepared surface using the PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition) technique. The resulting Si_3N_4 surfaces were cleaned with Opticlear, acetone and IPA as previously stated. Chemical modification of the Si_3N_4 surface and fabrication of the aldehydized surface was carried out according to the procedure described in Supporting Information material (Annex A). The aldehydized surfaces were incubated for 1 hour in 1 μM of unconjugated polyclonal antibodies against *E. coli* in PBS solution and then rinsed with PBS followed by rinsing with DI water. To prevent non-specific adsorption, the functionalized substrates were incubated for 30 min at room temperature in a 1% bovine serum albumin (BSA) solution.

The procedures of SAM- and glutaraldehyde-based biofunctionalization of samples are schematically illustrated in Figure 4.1. The exposure of antibody-functionalized samples to varying concentrations of bacteria was monitored by in-situ measurements of the PL signal, as discussed further in this paper. Negative control tests were carried out for both detection architectures with *E. coli* antibody-functionalized samples exposed to *L. lactis* at 10^6 CFU/ml.

4.1.3 Transducer effect and detection of bacteria using PL emission

The presence of high-density surface states on semiconductor surfaces is known to lead to band bending of the semiconductor bulk bands approaching the surface. This results in the formation of a space charge depletion layer that for a lightly n-doped GaAs with a density of electrons of 10^{16} cm^{-3} extends 130 nm into the bulk [237]. The depletion layer related electric field separates electrons (e) and holes (h) generated in the space charge region and, thus, it reduces the radiative rate of the e-h recombination, contributing to the reduced intensity of PL emission from such a material. We have recently demonstrated that formation of the interfacial dipole layer (IDL) takes place near the surface of GaAs upon chemisorption of thiol [238]. It is the electrostatic field of IDL that interact with the space charge depletion layer and leads to a large reduction of carrier surface recombination velocity (SRV) and decrease in the hole/electron ratio of surface carrier capture cross-section. The argument has been made that in contrast to the so-called dead-layer model [183], it is the reduction of SRV that is responsible for the increased PL intensity [238]. The presence of negatively charged molecule contacting the thiol SAM is expected to increase the potential of IDL, resulting in further reduction of SRV. Thus, negatively charged molecules trapped on thiolated, or biofunctionalized surface of GaAs could lead to the additionally increased PL intensity from such semiconductor. Both Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, and Gram-positive bacteria exhibit significant negative surface charge formed as a result of the dissociation of related chemical groups present on the bacterial surface. Depending on the pH of the bacterial solution, this negative surface charge can be counterbalanced, partially or entirely, by ions of the opposite charge (counter-ions) present in the liquid [239]. However, for a net negative charge present on the bacterial surface of *E. coli* and other negatively charged bacteria, the increased PL emission is expected following the attachment of such bacteria to the biofunctionalized surface of an intrinsic or lightly n-doped GaAs.

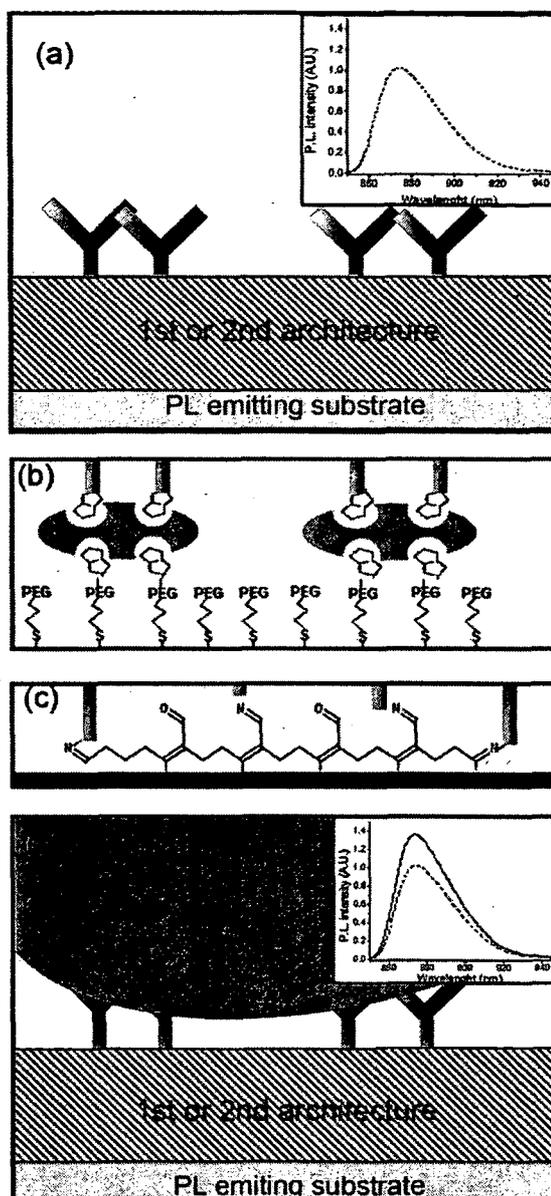


Figure 4.1. Schematic illustration of the detection process of a sample (a) functionalized with either (b) SAM and biotin conjugated antibodies, or (c) Si_3N_4 and reticulation of unconjugated antibodies to achieve (d) immobilization of bacteria. The inset schematically depicts the concept of PL-based detection.

4.1.4 Interface and Surface Characterization

The validation of the PEG-thiol SAM architecture for biofunctionalization of GaAs was carried out previously using Fourier Transform Infrared transmission measurements [233]. The FTIR transmission measurements, however, are not suitable for studying Si_3N_4 coated samples. For that reason, to evaluate the

effectiveness of surface modification and monitor the reproducibility of the biofunctionalization process applied to Si_3N_4 surfaces, we employed the contact angle measurements using a custom made contact angle goniometer (Department of Electrical Engineering, Université de Sherbrooke Quebec, Canada). A 2 μl droplet of deionized water was gently placed onto the surface. The contact angle measurements were made within 15 seconds after placing the drop of water. The inner angle between the edge of the droplet and the surface was photographed and analysed using the QCapture Pro software (QImaging, Surrey, Canada). The measurements were repeated in 3 different regions on the surface, giving an accuracy of $\pm 1^\circ$. All the measurements were performed in ambient atmosphere at room temperature.

4.1.5 Optical microscopy

Optical microscopy was used to estimate the density of bacteria immobilized on samples functionalized with 160 $\mu\text{g/ml}$ (1 μM) of antibodies against *E. coli*. Images were obtained using an Eclipse TI microscope (Nikon Instruments, Inc). With a 1000X magnification, it was feasible to resolve individual bacteria required for these measurements. Each sample was imaged at three different regions to provide a more reliable statistics.

4.1.6 Atomic Force Microscopy (AFM)

Surface morphology of processed samples was investigated using a Nanoscope IIIa microscope (Digital Instruments, Inc.) operating in contact mode. A MLCT-B type tip (Veeco Metrology, Inc.) was used with a cantilever spring constant of 0.03 N/m. The bacteria exposed samples were rinsed, dried and fixed with a 3.7% formaldehyde solution in water. All the AFM measurements were carried out in an air environment. The AFM images were analysed with WSxM 3.0 software [240]. The root-mean square roughness (RMS) values of the investigated surfaces refer to an area of 2.5 μm x 2.5 μm .

4.1.7 PL signal detection

The collection of PL signal was carried out using a custom designed (Photon Etc., Montreal) Hyperspectral Imaging PL mapper (HI-PLM) described elsewhere [22]. The presence of bacteria was monitored by collecting PL maps over a period of up to 5 hours. The PL intensity was averaged over the sample area, normalized by subtracting the value for PBS without bacteria, and plotted to demonstrate the dynamics of detection. Each run was repeated 3 times in order to produce error bars as indicated on the respective plots. Additional details concerning the PL data collection procedure are provided in the supplementary information (Annex A) of the Supporting Information. For static measurements, the functionalized samples were placed in a sealed Teflon chamber. We investigated biofunctionalized samples that were exposed to *E. coli* concentrations ranging from 10^4 to 10^8 CFU/ml. A solution of 10^6 CFU/ml of *L. lactis* was also used to carry out control experiments.

Additional experiments were carried out to verify the intensity of the measured PL signal after the bacteria exposed samples were washed *in-situ* with PBS solvent. This served to eliminate a possible contribution to the PL signal due to non-specific sedimentation of bacteria from the solution. A 200- μ l volume custom made micro-fluidic chamber was employed for these experiments. Only the samples with alkane thiol SAM based architectures were investigated, but it is reasonable to expect that qualitatively similar results would be obtained with the Si_3N_4 coated samples as well. Each sample was, first, exposed to a fixed concentration of bacteria in PBS, ranging from 10^4 to 10^8 CFU/ml. This exposure time was assumed to be sufficient to allow the antibody-antigen reaction at the liquid/solid interface [241]. Subsequently, the samples were washed *in-situ* with PBS. Negative control experiments were carried out in a similar way using *L. lactis*. at 10^4 and 10^6 CFU/ml.

4.2 Experimental Results and discussion

4.2.1 Static contact angle measurements

A large contact angle typically signifies hydrophobic surfaces, while a smaller angle indicates better wettability of the surface that is hydrophilic. As expected, before etching Si_3N_4 was rather hydrophobic [27] with a contact angle of $50^\circ \pm 3^\circ$, while after etching, and consequently after removing the surface oxides, the surface became more hydrophobic with a contact angle of $72^\circ \pm 7^\circ$. The increase in standard deviation may indicate here an increase in surface roughness. The contact angle then went from 72° to $34^\circ \pm 5^\circ$ after crosslinking the surface with glutaraldehyde, suggesting an improvement in the wettability of the surface [242]. This is consistent with a high surface density of aldehyde groups [243].

4.2.2 Density of immobilized bacteria

Optical microscopy images were taken to estimate the density of bacteria immobilized on samples functionalized by both methods and exposed to varying concentrations of *E. coli* bacteria (10^2 , 10^4 and 10^6 CFU/ml) and 10^6 CFU/ml of *L. lactis* as a negative control. The images obtained show the presence of bacteria measuring approximately 2 to 3 microns long and between 0.8 and 1 micron in diameter. An example of the bright field image obtained for the thiol SAM based architecture and 10^6 CFU/ml of *E. coli* is shown in Figure 4.2. The inset in this figure confirms the negligible efficiency of the applied architecture in the immobilization of *L. lactis*. Both architectures gave qualitatively similar results although for the 10^6 CFU/ml *E. coli* solution, a slightly higher surface coverage was achieved for the Si_3N_4 -based functionalization method (0.7 bacteria/ $100 \mu\text{m}^2$) in comparison to the SAM-based method (0.55 bacteria/ $100 \mu\text{m}^2$).

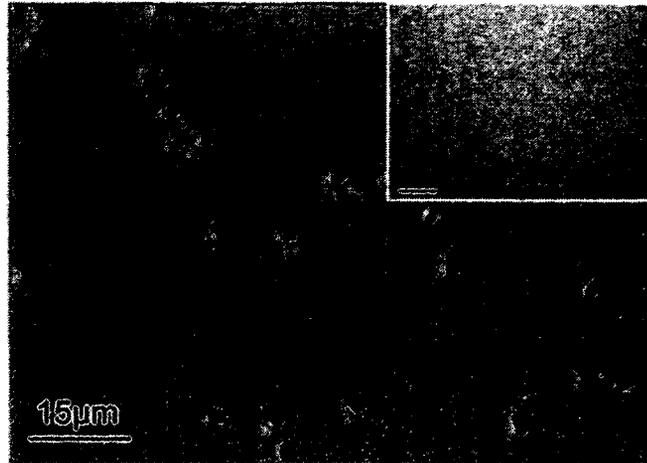


Figure 4.2. Example of a bright field optical microscopy image obtained after exposure of the antibody functionalized GaAs samples to 10^6 CFU/ml *E. coli* (inset: a negative control showing an image of a sample exposed to 10^6 CFU/ml *L. lactis*)

4.2.3 Surface morphology

The AFM measurements carried out at various stages of sample functionalization revealed details of surface morphology consistent with applied etching steps and constructed bioarchitectures (see Annex A, Supporting Information). Figure 4.3 shows an AFM picture of a selected area GaAs/Si₃N₄ sample functionalized with *E. coli* antibodies that was exposed to 10^6 CFU/ml of *E. coli* solution. A micro-object of approximately $2 \mu\text{m} \times 0.8 \mu\text{m} \times 0.35 \mu\text{m}$ can clearly be seen in this picture. The dimensions of the micro-object correspond to the dimensions of an *E. coli* bacterium that is known to be a cylindrical object, measuring approximately $2 \mu\text{m}$ in length and $0.8 \mu\text{m}$ in diameter [54, 244]. The slightly reduced height of the bacterial cell observed in this experiments could be explained by the possible flattening occurring due to the pressure exercised by the AFM cantilever tip as well as shrinking of bacteria due to the drying and fixing procedure [245].

4.2.4 Dynamics of bacteria detection observed by PL

Figure 4.4a shows time-dependent PL data obtained with SAM-based biosensor architectures exposed to different concentrations of bacteria. The net PL signal increased with time; consistent with the expected increase of the concentration of negative electric charge delivered by the bacteria immobilized on the biosensing surface. The PL signal reached a plateau value at $t \sim 200$ min for 10^4 CFU/ml of

E. coli, but continued to rise slightly for the 10^5 CFU/ml and, substantially, for the 10^6 CFU/ml solution. A series of time-dependent PL data obtained for samples functionalized according to the second method is shown in Figure 4.4b.

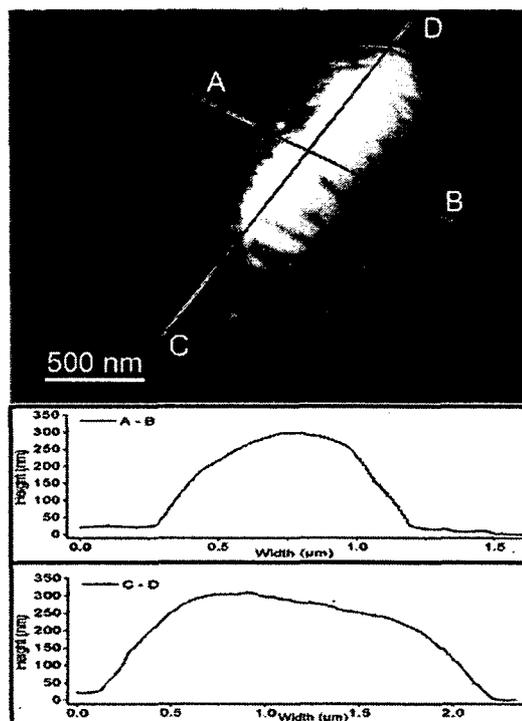


Figure 4.3. Selected area of the antibody functionalized Si_3N_4 -GaAs/AlGaAs sample that, after the exposure to 10^6 CFU/ml of *E. coli* solution, shows a bacterium immobilized on the surface.

The PL signal again reached a plateau at $t \leq 200$ min for 10^4 and 10^6 CFU/ml of *E. coli*. The negative control tests carried out with *L. lactis* at 10^6 CFU/ml for both architectures indicated that the detection of *E. coli* at concentrations exceeding 10^4 CFU/ml was specific. However, this approach required verification as the *in situ* data collection in a stagnant bacterial environment could also include a PL component related to bacteria sedimentation on the biosensor surface. To address this problem, we carried out a series of experiments involving PL measurements with *in situ* PBS washing of samples following their 30 min exposure to different bacterial solutions of *E. coli* and *L. lactis*. Figure 4.5 shows the results obtained for samples exposed to a PBS solution, 10^6 CFU/ml of *L. lactis* (control experiment) and *E. coli* at 10^4 , 10^6 and 10^8 CFU/ml. It can be seen that, following the washing step, the PL signal from the samples exposed to 10^4

and 10^6 CFU/ml of *E. coli* solutions decreases by approximately 35 and 15 %, respectively.

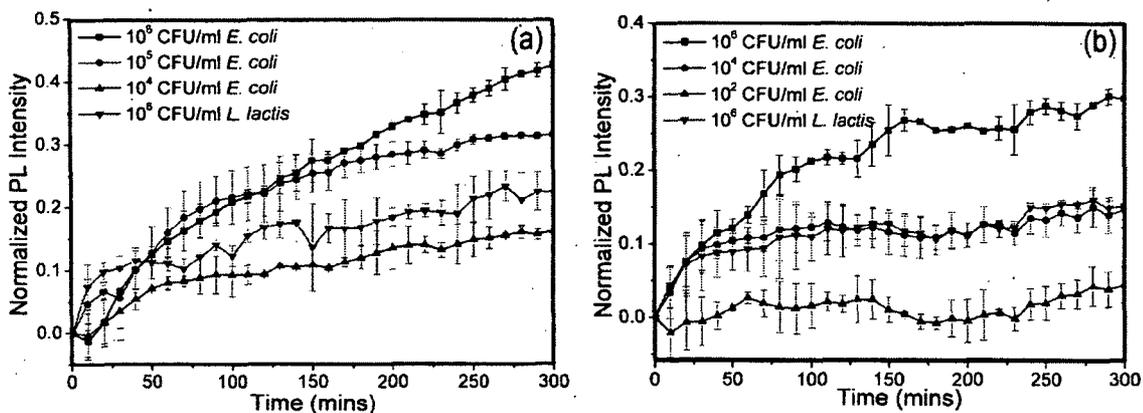


Figure 4.4. Normalized PL intensity dependence observed for different concentrations of bacterial solutions as a function of time for (a) thiol SAM based architectures, and (b) of Si₃N₄ with glutaraldehyde crosslinking architectures.

No measurable change in the PL signal was observed for the run corresponding to 10^8 CFU/ml of *E. coli*, which likely indicates the saturation of the biosensing surface with the bacteria. A 35% decrease of the PL signal was also observed following the washing step for the control experiment using *L. lactis*. However, in contrast to the 10^4 CFU/ml *E. coli* data, this signal continued to decay in the same manner as the experiment with no bacteria and only PBS, confirming the negligible response of the biosensing surface to a non-specific interaction.

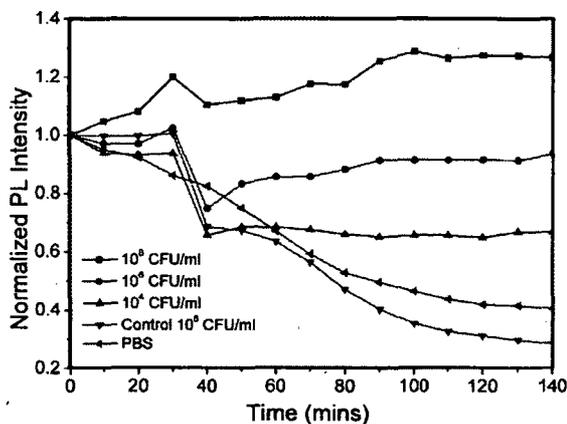


Figure 5. Normalized PL intensity dependence for different concentrations of bacterial solutions observed in-situ with SAM-based architectures. The samples were rinsed after 30 minutes of exposure to the bacteria. The results are shown without subtracting the PBS related signal.

The results indicated that the investigated method allowed detection of *E. coli* at 10^4 CFU/ml within less than 120 min. Nonetheless, it seems feasible that even better sensitivity and shorter time to detection could be achieved with optimized biosensing GaAs/Al_{0.33}Ga_{0.67}As microstructures.

4.3 Conclusion

We have investigated a novel method of detecting *E. coli* using PL emission from GaAs/Al_{0.33}Ga_{0.67}As microstructures capped with a 5-nm thick GaAs layer. The functionalization of the samples was achieved by using either alkanethiol SAMs, or glutaraldehyde-based aldehydization of the surface of a thin Si₃N₄ film deposited atop the GaAs surface. The negative electric charge of the bacteria immobilized on the surface of antibody-functionalized microstructures contributed to the increased PL emission from GaAs. The samples exposed to different concentrations of bacteria allowed monitoring the dynamics of the bacteria immobilization observed over a period of several hours. The results indicate that the investigated method allows detection of *E. coli* at 10^4 CFU/ml within less than 120 min.

4.4 Acknowledgements

Funding for this research was provided by the Canada Research Chair in Quantum Semiconductors Program and the joint NanoQuébec (NQ)-Canadian Institute for Photonic Innovation (CIPI)-Canadian Space Agency (CSA) Support Program for Integrative Biosensor Research. We thank Zbigniew Wasilewski of National Research Council of Canada for providing us with epitaxial microstructures used in this study. We express our gratitude to Magnor Inc. for supporting this project. Help provided by the technical personnel of the Centre de recherche en nanofabrication et nanocaractérisation (CRN2) of the Université de Sherbrooke during the realization of this project is also greatly appreciated.

Chapitre 5. DÉTECTION PHOTONIQUE EX-SITU D'ESCHERICHIA COLI BASÉ SUR LA PHOTOLUMINESCENCE D'HÉTÉRO-STRUCTURES ÉPITAXIALES.

Auteurs et affiliation :

Valerie Duplan : étudiante à la maîtrise, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et informatique et Faculté des sciences de la santé, Département de microbiologie et d'infectiologie.

Eric Frost : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté des sciences de la santé, Département de microbiologie et d'infectiologie.

Jan J. Dubowski : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie électrique et informatique

Date de soumission : janvier 2011

Revue : Biosensors

Titre français : Une méthode photonique pour la détection faite *ex situ* d'*Escherichia coli* basé sur l'émission de photoluminescence de microstructures épitaxiale de GaAs/Al_{0.33}Ga_{0.67}As

Contribution au document :

Cet article contribue à la thèse en élaborant sur l'utilisation des deux méthodes d'immobilisation d'anticorps, précédemment présentées pour le développement d'un biocapteur optique capable de détecter *E. coli* après que l'échantillon ait été séché, afin de faciliter la prise de mesures à des stations éloignées. La première méthode se base sur l'utilisation de SAM, de neutravidine et d'anticorps polyclonaux. La deuxième méthode se base sur le recouvrement du GaAs avec une

fine pellicule de Si_3N_4 afin de diminuer la diffusion de l'oxygène vers la surface du substrat. Le processus d'immobilisation des bactéries a été démontré par microscopie optique et microscopie de fluorescence; la détection de celles-ci a été faite à l'aide de mesures de PL de substrats provenant de la série V0802, dans l'atmosphère ambiante et à température pièce. La limite de détection inférieure obtenue était de 10^4 UFC/ml dans les deux cas.

Résumé français :

La photoluminescence émise par une hétéro-structure semi-conductrice III-V a été utilisée pour réaliser la détection d'*Escherichia coli* dans des échantillons d'eau. Deux différentes architectures à base d'anticorps ont été utilisées pour la fonctionnalisation efficace et la passivation des substrats. La première architecture est basée sur les propriétés des monocouches auto-assemblées (SAM) et sur la formation de complexes biotine et neutravidine pour la fixation de l'anticorps biotinylé utilisés pour la détection spécifique des bactéries ciblées. Dans la seconde architecture, nous avons utilisé une fine couche de recouvrement de Si_3N_4 pour protéger la microstructure quantique contre la dégradation, tout en conservant ses propriétés de fonctionnalisation. Ceci a été fait par réticulation avec du glutéraldéhyde et l'immobilisation d'anticorps a été faite par la formation de liaisons imine. Des mesures de microscopie optique et de microscopie par fluorescence ont été utilisées pour démontrer l'immobilisation réussie de bactéries et a permis d'estimer la densité des bactéries immobilisés. Des mesures de photoluminescence ont été faites pour réaliser la détection de bactéries spécifiquement liées et une limite de détection de 10^4 UFC / ml de *E. coli* a été déterminée pour les deux méthodes de fonctionnalisation.

A photonic method for *ex situ* detection of *Escherichia coli* based on photoluminescence emission from GaAs/Al_{0.33}Ga_{0.67}As epitaxial microstructures

Valérie Duplan,¹ Eric Frost,² Jan J. Dubowski,¹ *

^a Department of Electrical and Computer Engineering, Faculty of Engineering, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K 2R1, Canada

^b Department of Microbiology and Infectiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

E-Mails:

* Author to whom correspondence should be addressed: Tel.:

Fax:

Abstract Photoluminescence (PL) emission from III-V semiconductor heterostructures was employed for detection of *Escherichia coli* by monitoring perturbation of the GaAs surface induced by electric charge of the bacteria. Immobilization of the bacteria on the semiconductor surface was achieved with antibody-based architectures. Self-assembled monolayer-biotin-neutravidin, as well as capping with Si₃N₄, followed by reticulation with glutaraldehyde, architectures were used to functionalize GaAs with *E. coli* antibodies. Optical and fluorescence microscopy measurements demonstrated the successful immobilization of bacteria. Photonic detection was achieved by comparing PL signal from antibody-functionalized samples with that of the functionalized samples that were exposed to different concentration bacterial solutions. In all cases, the PL measurements were conducted *ex situ* on dried samples. As expected for the investigated heterostructures, enhanced PL emission was observed from bacteria-exposed samples. Detection sensitivity was achieved at 10⁴ CFU/ml of *E. coli* for both functionalization methods.

Keywords: GaAs; Photoluminescence; Optical immunosensor; Biofunctionalization; *Escherichia coli*;

5. Introduction

The detection of pathogenic organisms in water and foods remains important and challenging problem. For example, *Escherichia coli* O157:H7, the most common serotype of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), is responsible for numerous food-borne and water-borne infections worldwide [246, 247]. Conventional detection of this pathogen is carried out using dry weight measurement, viable counting and turbidity measurements [248, 249]. However, these methods require up to several days to produce the results as they rely on the ability of micro-organisms to multiply to visible colonies. Thus, a rapid, sensitive and reliable screening for bacterial contamination in drinking water, food, industrial waste and clinical samples is very important for the prevention of infections and epidemics. In this context, a large number of detection methods have been developed relying on micro-organisms optical, electrochemical, biochemical and physical properties [60, 94, 223]. Examples of such methods include a surface plasmon resonance and electrochemical, impedimetric and piezoelectric based spectroscopy techniques [94, 224-226]. Optical biosensors are minimally invasive for *in-vivo* measurements and are of particular interest due to their potential to yield rapid results with high signal to noise ratios. We have proposed that bright photoluminescence (PL) of an epitaxial quantum well (QW) could be used to study biochemical reactions on surfaces of III-V semiconductors [204, 250]. Optically confined GaAs/AlGaAs epitaxial microstructures have already been used to monitor surface effects related to the formation of self-assembled monolayers (SAM) of alkanethiols [251] and decomposition of thimerosal [252]. Generally, the functioning of such semiconductor biosensing devices depends not only on their specific sensitivity, but also on the ability to maintain a stable response over an extended period of time. Indeed, the exposure of bio-functionalized, but unprotected III-V surfaces to oxygen and air atmosphere could degrade their electrical and optical properties [208, 253]. Recently, we tested the proposed method for *in situ* detection of *E. coli* in liquid solutions [254]. Here, we report on the use of photoluminescence (PL) emission from GaAs/Al_{0.33}Ga_{0.67}As epitaxial microstructures for *ex situ* detection of *E. coli*

carried out on samples that were dried following their exposure to different bacterial solutions.

5.1 Experimental Section

5.1.1 GaAs/AlGaAs semiconductor microstructures

The semiconductor wafer used in this study was a GaAs/AlGaAs microstructure comprising a 300 nm thick epilayer of GaAs separated from the surface by 3 GaAs/Al_{0.33}Ga_{0.67}As barriers (50, 90 and 25 nm thick) and 2 GaAs wells (3.0 and 5.5 nm thick). The microstructure was capped with a 5 nm thick layer of GaAs that was chemically processed before functionalization for specific immobilization and detection of bacteria. Samples with typical dimensions of 4 mm x 4 mm x 0.63 mm were used in this study.

5.1.2 Chemicals

Biotinylated PEG (polyethylene glycol) thiols were obtained from Prochimia Surfaces (Gdansk, Poland). A hexadecanethiol (HS-(CH₂)₁₅-CH₃) solution was purchased from Sigma-Aldrich (Ontario, Canada). The molecular structure of these thiols is shown in Figure 5.1. Neutravidin was obtained from Molecular Probes (Invitrogen, Burlington, Canada). Polyclonal antibodies against *E. coli* unconjugated, coupled with biotin or coupled with the fluorescein isothiocyanate (FITC) were obtained from ViroStat, Inc (Portland, Me). D-PBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, pH 7.4) was bought from Wisent bioproducts Inc. (Quebec, Canada). Nominally anhydrous ethanol (98% v/v) was bought from Commercial Alcohols, Inc. (Brampton, Canada). To remove residual oxygen, a 250 mL flask filled with ethanol was purged for 4 hours with a 0.084 Nm³/hr high purity nitrogen stream (> 99% pure nitrogen, Praxair Canada Inc.). OptiClear, a solvent designed to remove impurities present at the surface of optical or electric compounds, was obtained from National diagnostics (Mississauga, Canada). Acetone was bought at ACP (Montréal, Canada); isopropanol (2-propanol) was obtained from Fisher Scientific (Ottawa, Canada), acetic acid (CH₃COOH) was obtained from Fisher Scientific and ammonium hydroxide 28% (NH₄OH) was bought at Anachemia (Richmond, Canada). A solution of hydrofluoric acid and

gluteraldehyde were purchased from Sigma-Aldrich. All the solvents were Lab (suitable general laboratory applications) and A.C.S. (high quality) grade and all the products have been used without additional purification.

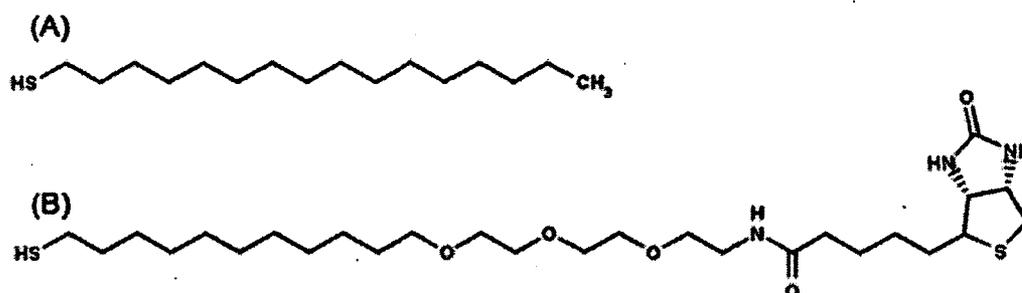


Figure 5.1. Molecular structure of (a) Hexadecanethiol (HDT) and (b) Biotinylated PEG thiol (SH-[CH₂]₁₁-EG₃-Biotin) used to fabricate biotin-terminated SAMs.

5.1.3 Preparations

Passivation of the GaAs/AlGaAs transducer with a SAM

The samples were processed similar to a previously described procedure [21]. Prior to passivation, the samples were cleaned sequentially, for 5 minutes each, in an ultrasonic bath undiluted solutions of OptiClear, acetone and isopropanol (IPA). The cleaning procedure was carried out in an ultrasonic bath at room temperature. The samples were, then, dried using a flow of compressed N₂ and etched. The wet chemical etch was carried out in ammonium hydroxide for 2 minutes as previously described [18], designed to remove surface native oxides, such as Ga₂O₃, As₂O₅, and As₂O₃ [206]. The samples were rinsed with freshly deoxygenized ethanol prior to immediately incubating them for 20 hours at room temperature in a mixture of biotinylated PEG thiol (SH-[CH₂]₁₁-EG₃-Biotin) and HDT (1:15) diluted in deoxygenized ethanol to a final concentration of 2 mM. After thiolation, the samples were thoroughly rinsed with IPA and dried with N₂. PEG-based thiols were incorporated in the functionalization procedure as they are known to offer a decreased nonspecific association of the antibodies to certain molecules [210] and, in addition to preventing steric hindrance [16], possess the ability to sustain stretching which allows the recognition with several antibodies of a large size antigen, such as a bacterium.

Coupling of antibodies to samples passivated with a SAM

To achieve functionalization of the samples terminated with biotin SAMs, they were first immersed for 2 hours in a room-temperature degassed PBS solution containing 200 $\mu\text{g/ml}$ of neutravidin (3.33 μM). This step was followed by rinsing of the samples with PBS and then with deionised (DI) water. The biotin/neutravidin system was incorporated into the procedure due to the known strong affinity of those molecules and, thus, the increased specificity of the functionalized architecture as compared to other approaches, e.g., including NHS [234, 235]. The neutravidin-coated samples were exposed to 1 μM (160 $\mu\text{g/ml}$) of biotinylated antibodies against *E. coli* diluted in degassed PBS solution. This step was carried out overnight at 4 °C. The samples were then rinsed, sequentially, in PBS and DI water and dried with a N_2 gun.

Functionalization of GaAs/AlGaAs capped with Si_3N_4

The advantage of using Si_3N_4 compared to SAMs of PEG thiols is in protecting the GaAs surface more efficiently against surface degradation in the water solutions of bacteria. The samples used for this procedure were cleaned as previously stated. However, wet chemical etching involved a 15 second treatment with a concentrated (49%) hydrofluoric acid (HF) solution to remove all native oxides and other surface contaminants [236]. This step was followed by rinsing with DI water and drying with a N_2 gun. A 40 nm thick Si_3N_4 layer was deposited on such prepared surface using the PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition) technique. The resulting Si_3N_4 surfaces were cleaned with Opticlear, acetone and IPA. Chemical modification of the Si_3N_4 surface was achieved through wet chemical etching with a dilute (2.5%) solution of HF for 15 seconds [26]. The etching rate of Si_3N_4 , as determined by ellipsometry measurements, was at 89.5 ± 4.8 nm/min, which is comparable to other reported etching rates of PECVD deposited Si_3N_4 [255]. The resulting H-terminated Si_3N_4 films were approximately 15 nm thick. Further functionalization was achieved through the exploitation of the reactivity of surface silicon-hydrogen bonds (Si-H_x) [163].

Coupling of antibodies to samples capped with Si₃N₄

The H-terminated samples were dipped in aqueous glutaraldehyde (25%) for 1 hour to allow covalent immobilization of polyclonal antibodies to the sensor surface through the formation of imine bonds [164]. The samples were rinsed twice with PBS to remove excess glutaraldehyde and the aldehydized surfaces were incubated for 1 hour in 1 μ M of unconjugated polyclonal antibodies against *E. coli* in PBS solution. This step was followed by sequential rinsing with PBS and DI. The antibody immobilization was achieved through the formation of imine bonds between the CHO group of glutaraldehyde and NH₂ terminated antibodies. To prevent non-specific adsorption, the functionalized substrates were incubated for 30 min at room temperature in a 1% bovine serum albumin (BSA) solution.

5.1.4 Bacterial cultures

All strains used in this study, both *E. coli* and *Lactococcus lactis* (*L. Lactis*) bacteria used as a negative control, were obtained through the biology department of the Sherbrooke University (Quebec, Canada). They were routinely grown in Luria Bertani (LB) or Brain Heart Infusion (BHI) broth or agar at 37°C or 30°C, respectively. Briefly, bacterial growth was performed in liquid medium and followed by regular seeding on a solid-type LB or BHI agar. Cells in growth phase were chosen as samples and they were aliquoted and stored at - 26 ° C before use.

5.1.5 Optical microscopy

Optical microscopy was used to estimate the density of bacteria immobilized on samples functionalized with 160 μ g/ml (1 μ M) of antibodies against *E. coli*. Images were obtained using an Eclipse TI microscope (Nikon Instruments, Inc). With a 1000X magnification, it was feasible to resolve individual bacteria required for these measurements. Each sample was imaged at three different regions to provide more reliable statistics.

5.1.6 Fluorescence Microscopy

Fluorescence images were taken in order to assess the efficiency of bacteria immobilization. For that purpose, GaAs samples were functionalized for the detection of *E. coli* and exposed to different concentrations of *E. coli* and *L. lactis* as previously mentioned. Next, the samples were incubated in 160 $\mu\text{g/ml}$ of FITC conjugated antibodies against *E. coli*. The fluorescence (518-523 nm) emitted by FITC fluorochrome attached to the antibodies was observed using Olympus IX71 inverted microscope with a DP71 digital camera. The microscope was equipped with a 200X objective and a 12-bit 1280 X 1024 pixel CCD camera. The excitation of the FITC fluorochrome was carried out with a blue light source emitting between 450-490 nm.

5.1.7 Transducer effect

It is known that the near surface electric field associated with the electron (e) and hole (h) band bending leads to the spatial separation of charge carriers and, consequently, to a reduced photoluminescence emission [237]. It is expected that bacteria that carry negative electric charge, following their immobilization on the surface, or while found in a close proximity of the surface, could modify band bending of the semiconductor band structure. Both Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, and Gram-positive bacteria exhibit significant negative surface charge formed as a result of the dissociation of related chemical groups present on the bacterial surface. Depending on the pH of the bacterial solution, this negative surface charge can be counterbalanced, partially or entirely, by ions of the opposite charge (counter-ions) present in the liquid [239]. Thus, for an n-type semiconductor, the immobilization of bacteria is expected to reduce both band bending and near-surface electric field. This should lead to an increase rate of e-h recombination and enhanced PL emission should be observed in such a case.

5.1.8 Biosensing architectures and PL-based detection

Schematic of the detection procedure using a SAM-based architecture is shown in Figure 5.2. Following the immobilization of bacteria, the increased PL intensity is expected as it is illustrated by the insets in this figure. The analogous principle

of detection was employed for the bacteria detection based on the Si_3N_4 glutaraldehyde-based crosslinking architectures. Samples functionalized, according to the two methods, were exposed to varying concentrations of bacteria (PBS, 10^2 , 10^4 and 10^6 CFU/ml *E. coli* bacteria and 10^2 and 10^4 CFU / ml of *L. lactis* as a negative control).

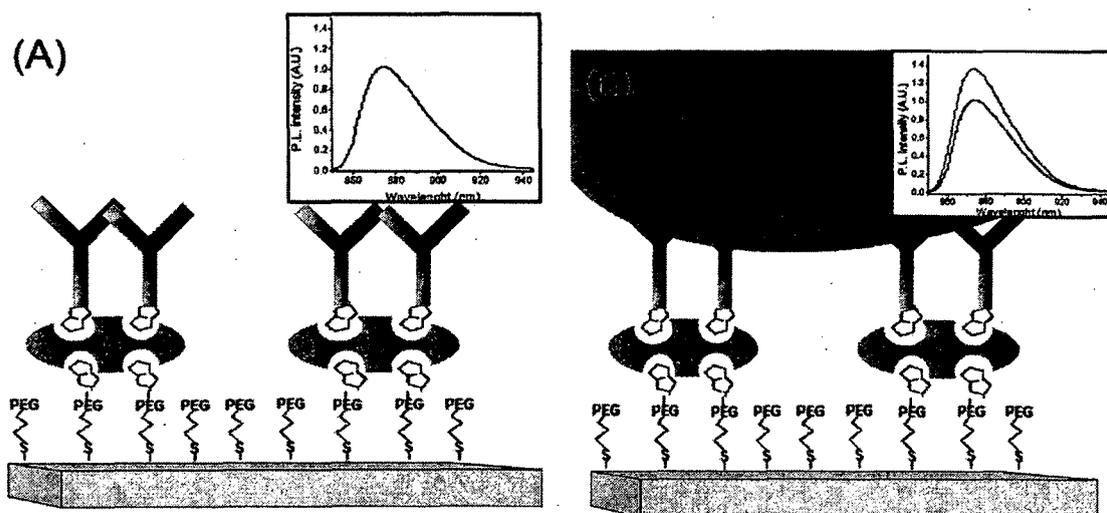


Figure 5.2. Schematic of the detection procedure of immobilized bacteria on biofunctionalized GaAs substrates for the SAM-based architecture. (a) Initial PL intensity measured following functionalization and (b) PL intensity enhanced following bacteria immobilization.

PL measurements were carried out in the emission region of GaAs (between 856 and 876 nm) using a custom made Hyperspectral Imaging PL mapper (HI-PLM, Photon Etc., Montreal) described elsewhere [251, 254]. The system is equipped with a 532 nm laser excitation source and a CCD detector (Apogee Instruments). An excitation power of 30 mW/cm^2 was used to excite the samples. The HI-PLM instrument can collect PL maps of samples measuring up to $7 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$, with a spatial resolution of approximately $5 \mu\text{m}$. For the purpose of this experiment, the intensities of PL spectra derived from each map were averaged over the surface area they were collected from. The detection was carried out by comparing room-temperature PL maps of antibody-functionalized samples exposed to a PBS solution with antibody-functionalized samples exposed to different bacterial solutions. The PL enhancement factor (X) was calculated using the following formula:

$$X(t) = \frac{\text{PL intensity after exposure to bacteria}}{\text{PL intensity after exposure to PBS (functionalization)'}}$$

where t corresponds to the time elapsed in hours.

Three different concentrations of *E. coli*; 10^2 , 10^4 and 10^6 CFU/ml, were used for this experiment. Also two different concentrations of *L. lactis*; 10^2 and 10^4 CFU/ml, were used as negative controls. The functionalized samples were exposed for 5h either to PBS or a specific bacterial solution. After the exposure, the samples were rinsed with PBS and DI water and dried with a N_2 gun. All experiments were carried out immediately after drying the samples.

5.2 Results and Discussion

5.2.1 Coverage density

The optical microscopy images revealed the presence of bacteria measuring approximately 2 to 3 microns long and between 0.8 and 1 micron in diameter [254]. For both biofunctionalization methods, a semi-logarithmic correlation was found between the number of bacteria exposed to the sample and the number of immobilized bacteria. The average concentration of *E. coli* immobilized from the 10^6 CFU/ml solutions was found at 0.55 bacteria/100 μm^2 and 0.7 bacteria/100 μm^2 for the SAM and Si_3N_4 functionalization methods, respectively. Moreover, when performing the negative control, only a fraction of the bacteria were found non-specifically attached to the substrate, indicating the high specificity of the sensor. The results of the estimated coverage density versus concentration of bacterial solutions used to expose the investigated samples are summarized in Figure 5.3.

The error bars indicated in Fig. 2 a) and b) were obtained as a result of carrying out 3 independent experiments. The result indicate that the Si_3N_4 -based biofunctionalization method gives a slightly greater average coverage with bacteria.

5.2.2 Analysis of specificity

Fluorescence images were taken in order to assess the efficiency and specificity of bacteria immobilization for both biofunctionalization methods. Figure 5.4 shows a fluorescence image obtained after an *E. coli* SAM-based antibody functionalized sample was exposed to 10^6 CFU/ml of *E. coli* and then, to FITC conjugated antibodies against *E. coli*.

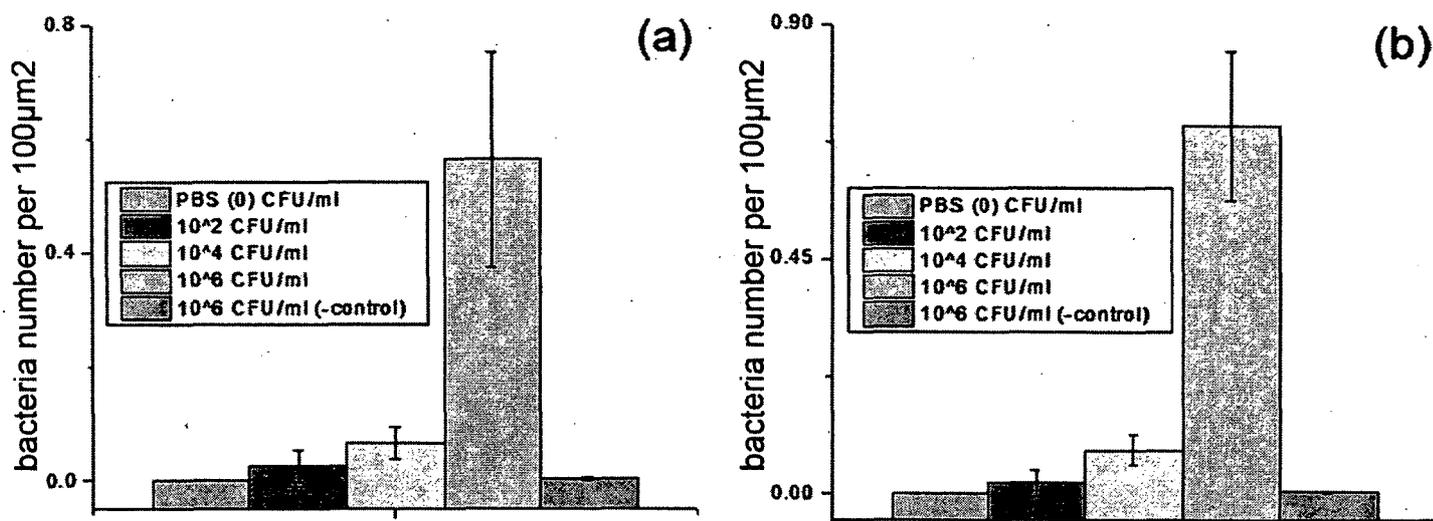


Figure 5.3. Estimated surface density of bacteria immobilized on an *E. coli* antibody-functionalized GaAs using (a) SAM- and (b) Si₃N₄ plus gluteraldehyde-based crosslinking architectures.

The inset shows a negative control fluorescence image observed following the exposure of a sample made for the detection of *E. coli* to 10^6 CFU/ml of *L. lactis* and to FITC conjugated antibodies against *E. coli*. The negligible presence of fluorescing spots confirms the specificity of a biosensing architecture designed for the detection of *E. coli* bacteria. From these experiments, we were also able to estimate that the average concentration of *E. coli* immobilized on the GaAs surface exposed to the 10^6 CFU/ml solution of bacteria was at 0.5 bacteria/100 μm^2 . For the GaAs surface exposed to 10^6 CFU/ml of *L. lactis* (the negative test), an average concentration of bacteria was observed at 3.3×10^{-5} bacteria/100 μm^2 , which furthermore indicates the negligible non-specific interaction. Thus, the fluorescence microscopy results provide a reasonable

corroboration of the optical microscopy measurements, as well as they confirm the reproducibility of the procedure applied for the immobilization of *E. coli* on the GaAs surface.

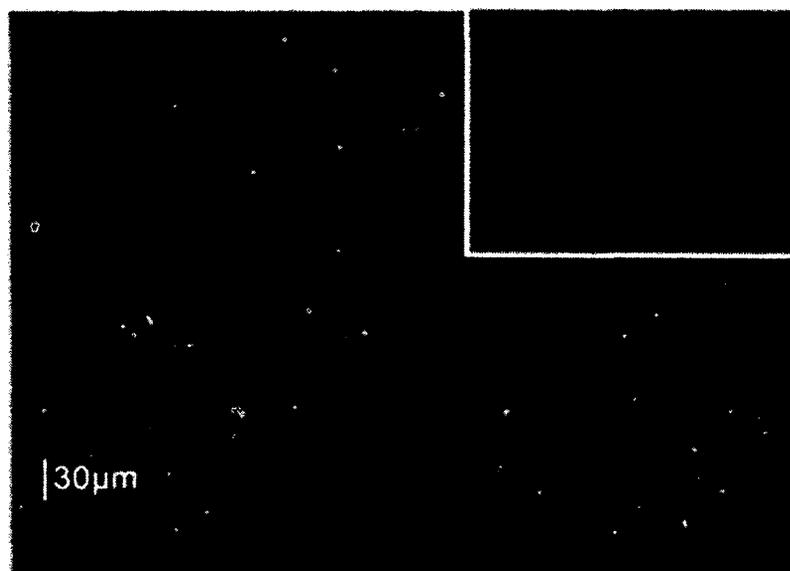


Figure 5.4. Fluorescence microscopy image obtained after an *E. coli* SAM-based antibody functionalized sample was exposed to 10^6 CFU/ml of *E. coli* and then, to FITC conjugated antibodies against *E. coli*. (200X Magnification). Inset: an image of a sample exposed to 10^6 CFU/ml *L. lactis* (the bar indicates a 30 μm length).

5.2.3 Bacteria detection

The response of biofunctionalized samples exposed to different bacterial solutions for SAM- and Si_3N_4 -gluteraldehyde-based crosslinking architectures is summarized in Figure 5.5. The PL intensity results are normalized to the intensity measured from the PBS only exposed samples. It can be seen that for the SAM-based architectures, the exposure to 10^6 CFU/ml of *E. coli* gives a net PL enhancement of approximately 45 %. This compares to the 36 % enhanced PL signal observed for the Si_3N_4 -gluteraldehyde-based architectures. The slightly reduced biosensing response in this case could be related to the increased distance between immobilized bacteria and the GaAs surface. Also, a lower electrical conductivity of Si_3N_4 , in comparison to that of thiol SAM, could contribute to a reduced charge transfer from bacteria to the GaAs surface. We note that the GaAs- Si_3N_4 interface, while provides potentially better protection

against deterioration of the semiconductor surface in PBS and/or water environments, has allowed also achieving a slightly enhanced bacterial coverage (see Fig. 5.3). However, more experimental data are required to conclude about the overall advantage of this approach for biosensing. As it can be seen in fig. 5.5, the presence of 10^2 CFU/ml of *E. coli* changes the intensity of the PL signal by less than 18 and 8 %, respectively, for the SAM- and Si_3N_4 -based architectures. Also, the exposure to *L. lactis* at 10^2 CFU/ml causes only a slight increase of the net PL signal, while the exposure to 10^4 CFU/ml of these bacteria exceeds the PL signal measured for 10^2 CFU/ml of *E. coli*. Thus, the current experiment demonstrates the detection sensitivity of *E. coli* at least at 10^4 CFU/ml.

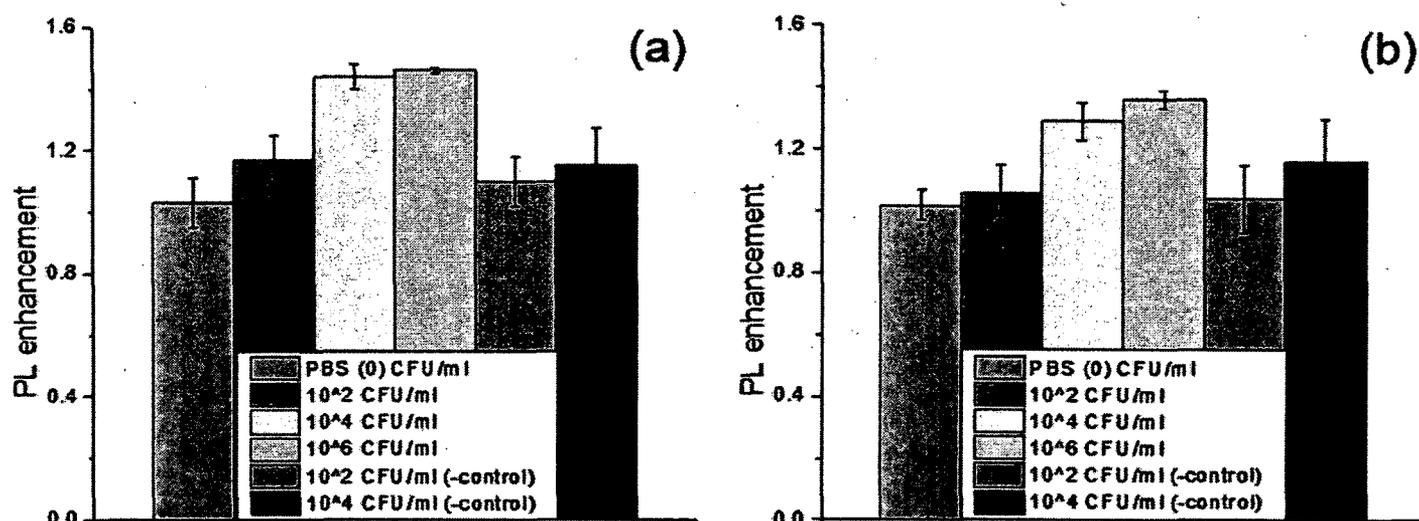


Figure 5.5. PL intensity observed *ex situ* for *E. coli* antibody functionalized samples following their exposure to PBS and different bacterial solutions for (a) SAM- and (b) of Si_3N_4 plus glutaraldehyde-based crosslinking based architectures.

5.3 Conclusion

We have presented in this study the development of a specific and sensitive biosensor for the detection of *E. coli* using samples exposed to liquid solutions of bacteria. All samples, after the exposure to bacteria solutions were dried and characterized with a PL mapping system. Negligible PL signal was measured for test carried out for *E. coli* functionalized samples that were exposed to *L. lactis*

bacteria. The biosensor's detection sensitivity been estimated at 10^4 CFU/ml of *E. coli*. Further optimization of this photonic method could include: a filtration step in order to investigate larger sample volumes (up to 1L) and, e.g., combining the detection chamber with a bacteria selecting external electric field. Optimizing the functionalization procedure, in order to significantly diminish non specific detection, is an important point that has to be addressed. The selection of good antibodies and the development of stringent washing procedures will greatly improve the detection capabilities of the biosensor for practical applications.

5.4 Acknowledgements

Funding for this research was provided by the Canada Research Chair in Quantum Semiconductors Program and the joint NanoQuébec (NQ)-Canadian Institute for Photonic Innovation (CIPI)-Canadian Space Agency (CSA) Support Program for Integrative Biosensor Research. Support provided by Magnor Inc. is also acknowledged. We express our gratitude to Zbigniew Wasilewski from the National Research Council of Canada for providing us with the GaAs/Al_{0.33}Ga_{0.67}As epitaxial microstructures.

Chapitre 6. DÉTECTION DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* INACTIVÉ

6 Résumé

Ce chapitre est consacré à l'élaboration d'un immunocapteur de bactéries basé sur le système de monocouches auto-assemblées. Une couche mixte de thiol PEG biotinylés et de thiol HDT est formée sur un substrat de GaAs et des anticorps polyclonaux conjugués à la biotine contre *Legionella pneumophila* y sont fixés par l'intermédiaire d'une couche de neutravidine. La détection des bactéries a été faite à l'aide de mesures de PL afin de quantifier l'effet de leur immobilisation sur la PL. La surface de ce biocapteur est caractérisée par AFM et microscopie optique afin de surveiller la présence de bactéries et de fragments immobilisés à la surface du capteur. L'utilisation de bactéries inactivées a été nécessaire, car il n'a pas été possible de travailler avec des micro-organismes de niveau de biosécurité 2 dans le laboratoire où se trouvait l'appareil de détection. Donc afin de valider cette méthode de détection avec la bactérie d'intérêt, les tests présentés dans ce chapitre ont été effectués avec un échantillon inactivé.

6.2 Introduction

Depuis des décennies, plusieurs travaux de recherches ont été consacrés à la détection des bactéries pathogènes qui menacent continuellement notre vie. Les industries agricoles et agroalimentaires luttent toujours contre ces bactéries en mettant en œuvre de nouveaux outils de contrôle de qualité pour la traçabilité et la détection bactérienne. De même, la détection des bactéries pathogènes dans l'environnement (eau, sol, plantes...) est indispensable pour prévenir tous risques de contamination. *L. pneumophila* est un parasite intracellulaire capable de causer une maladie pulmonaire chez l'homme en infectant les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires. [256, 257] Les infections humaines se manifestent dans l'une de trois formes principales : la maladie du légionnaire, la fièvre de Pontiac et de la pneumonie communautaire (community-acquired pneumonia). Par contre,

les méthodes classiques de détection de *L. pneumophila*, incluant la culture, les méthodes immunologiques et les méthodes moléculaires, sont des procédures compliquées. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des méthodes de détection pour *L. pneumophila* qui sont rapides et simples.

6.3 Matériel et méthodes

6.3.1 Matériel

Des échantillons provenant de substrats ayant la configuration géométrique de la série V0802 (voir figure 2.14.b) ont été utilisés dans cette étude. Ils étaient composés d'une couche épitaxiale de GaAs de 500 nm d'épaisseur séparé de la surface par deux barrières d' $\text{Al}_{0.33}\text{Ga}_{0.67}\text{As}$ (ayant 100 et 10 nm d'épaisseur) et 1 puits quantique de GaAs (ayant 6 nm d'épaisseur). La microstructure a ensuite été recouverte d'une couche de GaAs (ayant 10nm d'épaisseur) qui a été fonctionnalisée pour l'immobilisation spécifique des biomolécules étudiées. Des anticorps polyclonaux contre *L. pneumophila* couplés à la biotine ont été obtenus de ViroStat, inc. (Portland, Maine). Du D-PBS 1X (Dulbecco Phosphate Buffered Saline, pH 7,4), de la neutravidine et des thiols PEG biotinylés (polyéthylène glycol) ont été achetés aux mêmes endroits que mentionné dans la section 3.1.1 et une solution d'hexadecanethiol a été achetés au même endroit que mentionné dans la section 4.1.1. Un échantillon d'eau, provenant d'une tour de refroidissement, contenant la bactérie *L. pneumophila* ayant été concentré et inactivé (à 70°C pendant 5 minutes) a été obtenu par l'entremise de Magnor (Québec, Canada). La concentration en UFC/ml a été estimée à l'aide de PCR quantitative et une concentration de 2×10^5 Unité Génome/ml où une Unité Génome (UG) est définie en fonction de la séquence spécifique recherchée et amplifiée lors de l'analyse PCR en temps réel. De l'éthanol anhydre (98 % v/v) a été acheté à Alcools de Commerce inc. (Brampton, Canada). Pour éliminer l'oxygène résiduel, un flacon de 250ml rempli avec d'éthanol a été purgé pendant 4 heures avec un jet d'azote de 0,084 Nm³/h (mètre cube par heure) de haute pureté (> 99 % d'azote pur, Praxair Canada, inc.) OptiClear, un solvant conçu pour éliminer les impuretés présentes à la surface de composés optiques ou électriques, a été obtenue de National diagnostics (Mississauga, Canada). De l'acétone, de l'isopropanol (2-

propanol) et de l'hydroxyde d'ammonium à 28 % (NH₄OH) ont été achetés aux mêmes endroits que mentionner dans la section 3.1.1. Tous les produits ont été utilisés sans purification supplémentaire.

6.3.2 Préparation des échantillons

Pour effectuer les différents tests, des échantillons ayant des dimensions de 4 mm x 4 mm x 0.63mm ont été nettoyés et gravés comme mentionné dans la section 3.2. Les échantillons ont été fonctionnalisés comme mentionner dans la section 4.1.2. Ils ont ensuite été rincés avec du PBS et de l'eau DI, semblable à la procédure décrite précédemment. Les échantillons fonctionnalisés ont ensuite été exposés à des concentrations variables de bactéries.

6.3.3 Microscopie optique

La densité en bactéries ainsi que la composition en fragments immobilisés sur des échantillons fonctionnalisés ont été estimées en utilisant la microscopie optique. Les images optiques ont été obtenues en utilisant un microscope Eclipse (Nikon). Brièvement, un échantillon fonctionnalisé selon la méthode de fonctionnalisation préalablement mentionnée a été incubé avec 1 µM/ml d'anticorps polyclonaux contre *L. pneumophila* pendant la nuit comme mentionner dans la section 4.1.2. L'échantillon a ensuite été exposé à une concentration estimée par PCR de 2×10^5 UG/ml pendant 1 heure et demie, a été rincé et séché à l'aide d'un jet d'azote avant d'être observé.

6.3.4 Microscopie à force atomique

La morphologie de la surface des échantillons traités a été étudiée en utilisant un appareil AFM Nanoscope III (Digital instruments, Californie), précédemment présenté, fonctionnant dans un mode de contact. Les échantillons fonctionnalisés ont été exposés à une concentration estimée de 2×10^5 UG/ml pendant 1 heure et demie, ont été rincés et séchés avant leur caractérisation réalisée dans l'atmosphère ambiante. Une pointe de type MLCT (Veeco probes, inc.) a été utilisée avec une constante de ressort de 0,03 N/m.

6.4 Résultats expérimentaux et discussion

6.4.1 Microscopie optique

Les images obtenues montrent la présence de bactéries mesurant environ 1 à 2 microns de long et entre 0,5 et 0.8 micron de diamètre.



Figure 6.1 Microscopie optique en champ obtenu après l'exposition de l'échantillon de GaAs fonctionnalisé à l'aide d'anticorps à 2×10^5 UFC/ml de *L. pneumophila*

Cependant, la figure 6.1 montre également la présence de plus petites particules caractéristiques qui pourraient être des bactéries fragmentées et disposées uniformément sur la surface du capteur. Afin de confirmer cette hypothèse, des mesures d'AFM ont été effectuées afin d'obtenir des images ayant une plus haute résolution. La densité des particules bactériennes recouvrant la surface a été estimée, selon les images de microscopie optique, à environ 0.0001 par $100 \mu\text{m}^2$. La densité réduite de bactéries immobilisées est expliquée par le fait que la majorité d'entre elles ont été fragmentées d'où la présence d'un nombre accru de petites particules caractéristiques.

6.4.2 Topographie de surface

La micrographie présentée à la figure 6.2.a montre la surface du GaAs (001) bio-fonctionnalisée et exposé à la solution contenant une concentration estimée de 2×10^5 UFC/ml de *L. pneumophila*. La micrographie montre une microstructure granulaire constituée de nanoparticules, chacune entre 5-15 nm de diamètre. Celles-ci représentent la neutravidine immobilisée sur le substrat. La

micrographie montre aussi la présence de particules de tailles variables allant de 0.5 à 1 micron correspondants ici à la présence abondante de fragments de bactéries. La figure 6.2.b montre l'exemple d'une bactérie de *L. pneumophila* individuelle immobilisée sur un échantillon de GaAs bio-fonctionnalisé. La morphologie de la surface globale est la même, mais dans ce cas, elle est caractérisée par la présence de deux particules différentes, les plus petits (10 nm) correspondent à la présence de neutravidine et la plus grosse correspond à une bactérie immobilisée, mesurant approximativement $1.3\mu\text{m} \times 0.5\mu\text{m} \times 250\text{nm}$. La bactérie semble déformée toutefois cela peut être attribuable à l'inactivation de celle-ci. Enfin, la hauteur légèrement réduite de la particule bactérienne observée dans cette expérience pourrait être expliquée par l'aplatissement possible de celle-ci en raison de la pression exercée par la pointe de l'AFM lors des mesures.

6.4.3 Mesures de photoluminescence

Tout d'abord, afin de vérifier l'effet de l'inactivation de l'échantillon, une solution contenant 10^8 UFC/ml de *E. coli* a été inactivé de la même manière que *L. pneumophila* (70°C pendant 5 minutes). Le résultat obtenu suite à l'exposition d'un échantillon fonctionnalisé à la solution contenant des bactéries inactivées a été comparé à celui d'un échantillon exposé à la même concentration de bactéries intactes (vivantes). Afin de voir la variation de PL causé par l'attachement spécifique de bactéries, les échantillons ont été exposés pendant 30 minutes aux solutions le temps nécessaire pour la réaction antigène-anticorps,[241] puis rincé pour éliminer les bactéries ou les fragments attachés non spécifiquement.

Le signal résultant peut donc être attribué à des bactéries ou fragments de bactéries spécifiquement attachés sur l'échantillon. (Figure 6.3) Aucune différence significative n'a pu être observé lors de ce test, démontrant ainsi la validité des mesures effectuées avec l'échantillon inactivé de *L. pneumophila*.

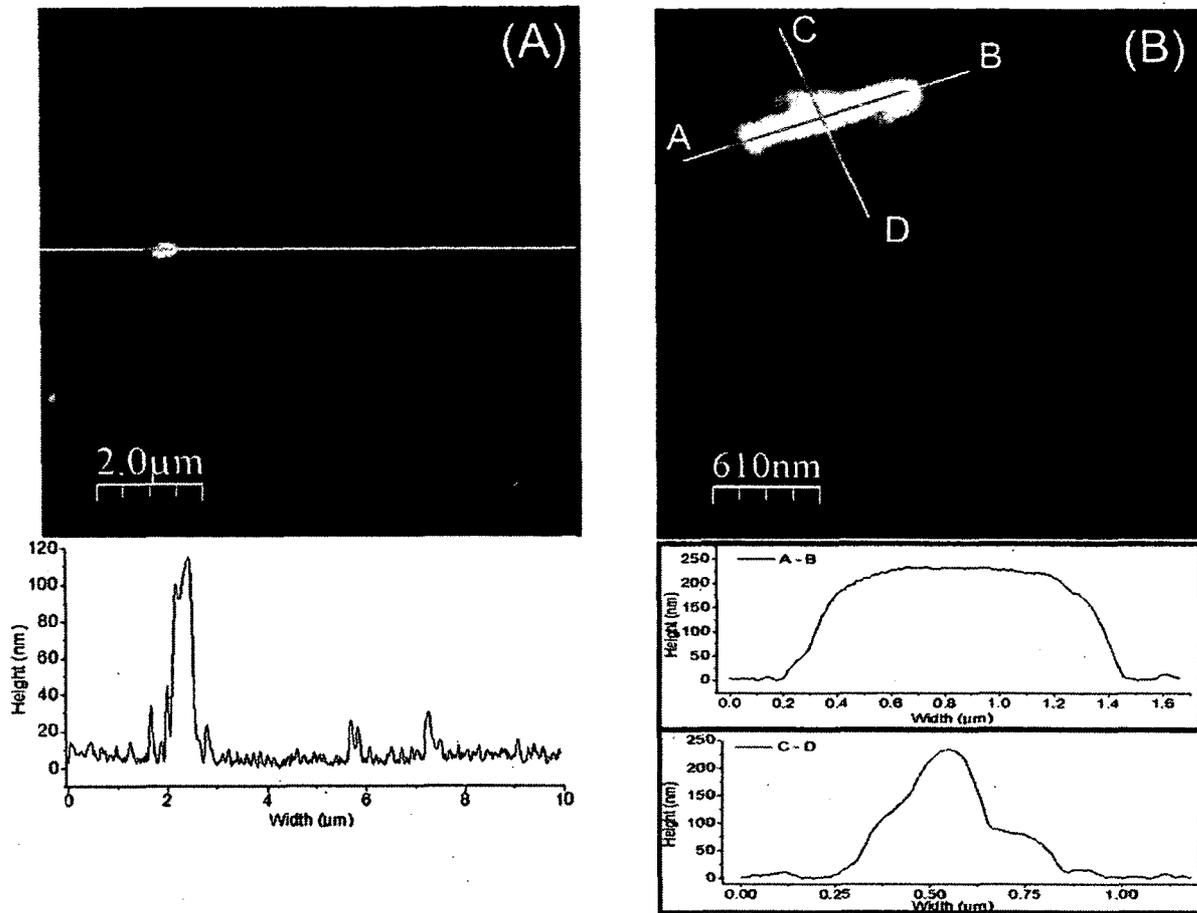


Figure 6.2 Topographie AFM et profil de (A) un échantillon de GaAs (001) bio-fonctionnalisé suite à l'exposition à 10^5 UFC/ml de *L. pneumophila* et (B), le même échantillon montrant une bactérie immobilisée sur la surface.

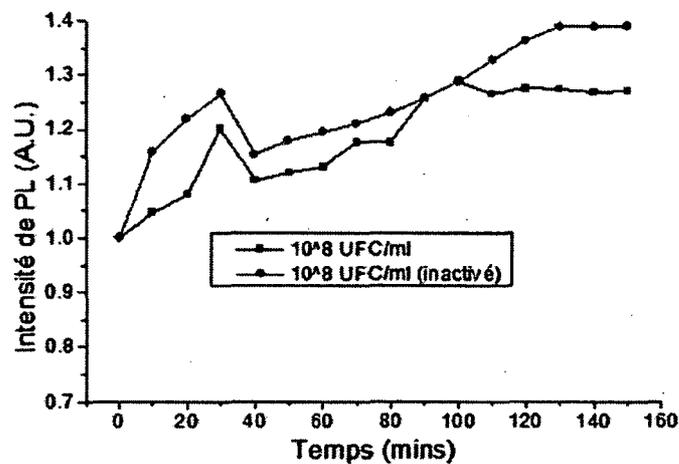


Figure 6.3 Évolution de la PL en fonction du temps suite à l'exposition *in situ* d'échantillons fonctionnalisés à 10^8 UFC/ml d'*E. coli* morts ou vivants. Les échantillons ont été rincés après 30 minutes d'exposition, les résultats sont présentés sans normalisation.

Pour les mesures statiques, les échantillons fonctionnalisés ont été placés dans une enceinte étanche en Teflon remplie avec la solution d'intérêt et mesurés pour une période allant jusqu'à 2 heures et demie. Au cours de ce processus, 15 cartes ont été recueillies. La valeur de l'intensité moyenne de la PL, sur la zone de l'échantillon, a été tracée afin de démontrer la dynamique de détection et de l'effet de l'accumulation de charge en utilisant la première architecture de fonctionnalisation. Une série d'échantillons qui ont été fonctionnalisés selon l'approche mentionnée, ont été incubées, en présence de différentes concentrations de *L. pneumophila*, allant de 2×10^3 à 2×10^5 UG/ml. (Figure 6.4)

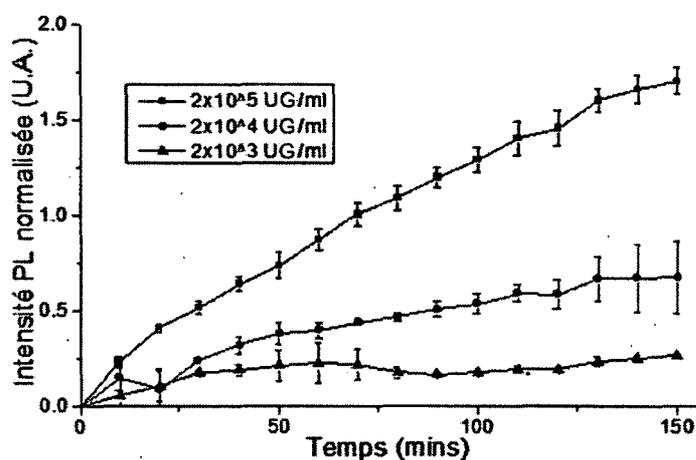


Figure 6.4 dépendance intensité PL de différentes concentrations de bactéries en fonction du temps.

Des échantillons ont été conservés dans la solution fournie, exempte de bactéries, ont été utilisés comme référence. Chaque échantillon a été exposé à une concentration différente de bactéries (10^3 , 10^4 et 10^5 UG/ml) pendant 2 heures et demie.

Afin d'être en mesure de séparer l'effet de la sédimentation de celle de l'immobilisation spécifique, une chambre micro-fluidique faite sur mesure a été utilisée. Elle était composée d'une entrée et une sortie afin d'éliminer toutes les bactéries non-liées lors de lavages et de mesurer l'effet net de l'immobilisation de bactéries. Pour ce faire, les échantillons fonctionnalisés, selon la première méthode, ont été exposés à des concentrations variables de bactéries soit : 10^3 et 10^5 UG/ml de bactéries *L. pneumophila*. La PL a été mesurée en temps réel et

après une exposition de 30 minutes les échantillons ont été rincés 3 fois avec du PBS dégazé et les mesures ont été poursuivies pendant 120 minutes, afin d'obtenir un signal stable. Une fois de plus, la concentration croissante des bactéries a eu un effet positif sur l'émission PL. (Figure 6.5)

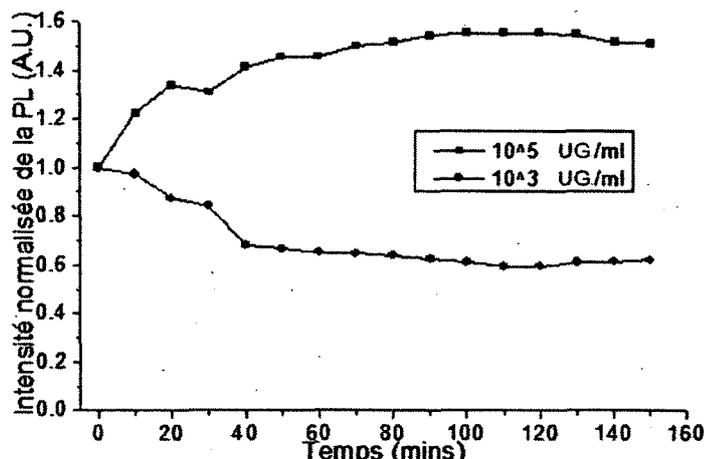


Figure 6.5 Dépendance de l'intensité de PL de différentes concentrations de bactéries en fonction du temps. Les échantillons ont été rincés après 30 minutes d'exposition au bactéries, les résultats sont présentés sans normalisation.

6.5 Conclusion

Nous avons préparé un biocapteur spécifique à *L. pneumophila* à partir d'un substrat de GaAs fonctionnalisé à l'aide de SAM de thiol PEG et d'HDT. Nous avons exposé ce biocapteur à une solution de *L. pneumophila* inactivé Et par la suite évalué la capture de bactéries. Il a été démontré par des mesures de microscopie optique et par AFM que la majorité des cellules ont été fragmentées quoique certaines cellules soient restées intactes. En effectuant des mesures de PL, il a été démontré que ce biocapteur est sensible à la solution inactivée avec une limite de détection de 10^4 UG/ml. De plus, en se fiant aux résultats obtenus avec *E. coli*, l'inactivation ne semble pas incommoder la détection. Au contraire, les résultats obtenus ont été faiblement améliorés par la fragmentation de celles-ci. Par contre, il est incertain si l'interaction entre les fragments inactivés de bactéries et la surface fonctionnalisée est toujours aussi spécifique qu'auparavant, car le processus d'inactivation peut avoir modifié ou encore dénaturé les protéines antigéniques que possèdent les bactéries.

Chapitre 7. CONCLUSION

Le biodiagnostic présente une occasion importante et un défi de taille pour une société moderne travaillant sur l'amélioration des systèmes de santé et de sécurité. L'interaction entre les différentes sciences (biologie, chimie, physique et génie des matériaux) est nécessaire pour l'obtention de résultats significatifs. Ce mémoire a été consacré à l'élaboration et à la caractérisation d'un biocapteur optique basé sur la PL émise par une hétérostructure de GaAs. Ce concept n'a jamais été rapporté, pour la détection de bactéries, auparavant. Deux méthodes de bio-fonctionnalisation ont été étudiées afin de produire un capteur stable et sensible en solution aqueuse.

7.2 Rappel des objectifs du projet

Dans ce travail, on a étudié la conception, l'élaboration et la caractérisation d'un immunocapteur pour la détection bactérienne. La détection a été faite par mesure de PL et la démonstration de l'immobilisation spécifique des micro-organismes étudiés a été faite par mesure de microscopie optique, de mesures de fluorescence indirecte ainsi que par AFM. Une concentration de 10^4 UFC/ml a pu être détectée par mesure de PL montrant que ce mode de détection donne une sensibilité comparable à certaines méthodes connues. Deux approches de fonctionnalisation ont été étudiées pour la détection de bactéries en employant soit des SAM ou une couche de recouvrement de Si_3N_4 . Les résultats préliminaires obtenus pour *Influenza*, *E. coli* et *L. pneumophila* montrent l'intérêt de cette nouvelle stratégie d'élaboration d'un immunocapteur d'autant plus que ce mode de détection est direct et ne nécessite donc aucun marquage des molécules d'intérêt. Il est donc facile à mettre en œuvre et ne nécessite que la préparation de la surface du transducteur. En effet, le biocapteur présenté a le potentiel de fournir des résultats en moins de 2 heures et demie ce qui est une nette amélioration comparativement au temps requis (jusqu'à 10 jours) lors de la détection de *L. pneumophila* en utilisant les méthodes de culture. De plus, le capteur produit serait plus aisément utilisé par du personnel, car il ne requiert aucune

manipulation spéciale de l'échantillon comparativement à celle requises lors de l'utilisation d'un appareil à PCR. Aussi, il serait facile d'automatiser la collecte et l'analyse d'échantillons puisque la détection se fait dans une chambre fermée qu'il est aisé d'intégrer dans un circuit de circulation.

7.3 Choix et mise au point du biocapteur

Le premier volet du projet consistait à choisir et à préparer les échantillons qui ont été utilisés afin de fournir une capture et une immobilisation spécifique des antigènes visés. L'architecture choisie devait posséder les caractéristiques suivantes : 1) être stable en solution aqueuse 2) permettre l'immobilisation d'anticorps de façon à ce qu'ils soient disponibles pour la reconnaissance 3) reconnaître et immobiliser de manière spécifique les antigènes voulus. À l'aide du virus de l'influenza A inactivé, il a été possible de démontrer qu'il est possible d'immobiliser spécifiquement des pathogènes, à l'aide d'anticorps, sur des substrats de GaAs. En second lieu, deux méthodes de fonctionnalisation ont été sélectionnées afin d'évaluer l'efficacité de la détection. La première était basée sur la passivation du GaAs en utilisant une monocouche auto-assemblée de thiols biotinylés et la fonctionnalisation à l'aide de neutravidine. La seconde était basée sur la passivation du GaAs par recouvrement à l'aide de Si₃N₄ et fonctionnalisation par réticulation. Dans un troisième temps, des solutions contenant une concentration connue ont été préparées à partir d'un stock préalablement fait. Ces solutions ont été utilisées afin de déterminer la limite de détection obtenue à l'aide de chacune des méthodes. Chacun des paramètres de l'immobilisation (c.-à-d. les temps et températures d'incubation, les concentrations utilisées) ont été ajustés afin que les résultats obtenus soient les plus reproductibles possible. En effet, la détection a été optimisée de manière à séparer le plus nettement possible les résultats positifs des résultats négatifs. Lors de l'ajustement des paramètres, il a été possible de constater que les deux méthodes utilisées ne permettaient pas de faire la distinction entre les concentrations intermédiaires et les concentrations élevées.

7.4 Validation du biocapteur

Le capteur à bases de monocouche auto-assemblée a prouvé son efficacité. En effet, il a été possible de détecter l'immobilisation spécifique de bactéries à l'aide de cette méthode. De plus, la gamme dynamique obtenue avec cette méthode est meilleure que celle obtenue avec la deuxième méthode, une variation totale de 46 % contre 36 % respectivement. Cependant, ce type de capteur peut présenter un certain nombre de limites puisque la stabilité en milieu aqueux procurée par cette méthode de passivation est moindre. Ceci est causé par la faible maîtrise de la densité et l'organisation de la monocouche sur la surface du transducteur, L'utilisation de support de fonctionnalisation ayant le recouvrement au Si_3N_4 permet de régler certains de ces problèmes en améliorant la passivation du GaAs et donc la stabilité du senseur face à l'oxydation. Le capteur à base de Si_3N_4 présenté possède une meilleure stabilité ainsi que requiert un temps plus court de saturation. Cependant, la gamme dynamique de détection qu'il possède est plus faible. Bref, l'utilisation d'une couche de recouvrement a permis d'améliorer la stabilité du capteur, mais demande de faire un compromis en termes de sensibilité.

7.5 Optimisations futures

Tout d'abord, les résultats présentés au cours de ce mémoire ayant des barres d'erreurs ont été reproduits au moins trois fois. Cependant, certaines améliorations importantes restent à apporter afin d'améliorer (1) la stabilité (2) la sensibilité et (3) la spécificité du capteur.

Premièrement, la passivation des substrats doit être optimisée afin d'améliorer les performances analytiques (sensibilité et stabilité) du biocapteur final. Puisque les résultats obtenus avec la deuxième méthode montrent une stabilité accrue, ceci nous permet de réaliser qu'on pourra essayer d'améliorer la stabilité de la première méthode. Il serait possible d'augmenter le pourcentage de couverture du capteur en faisant une « double passivation ». C'est-à-dire qu'après le procédé de thiolation normale, une incubation dans une deuxième solution contenant des plus petites molécules ayant un groupement thiol tel du sulfure d'ammonium. Ces

molécules pourraient, en théorie, venir se fixer aux atomes qui n'ont pas été passivés par la thiolation et par le fait même permettre de mieux protéger la surface. Une autre méthode qu'il est possible d'envisager serait d'appliquer un champ électrique lors de la thiolation. En faisant ceci, on pourrait s'assurer que les molécules soit dans une orientation propice à la formation d'une couche auto-assemblée afin de maximiser la passivation ainsi que l'organisation de molécules. Aussi, afin d'améliorer la sensibilité du senseur il faut tout d'abord essayer de réduire la distance entre les biomolécules d'intérêt et la surface du capteur puisque le phénomène de transduction dépend grandement de la proximité des molécules chargées à la surface du substrat. Il serait possible, dans le cas de la première méthode, d'utiliser une méthode de fonctionnalisation demandant moins de biomolécules tel l'attachement de fragment F_{ab} directement à thiols ayant un groupement terminal d'acide carboxylique. Malgré le fait que le complexe biotine/avidine procure une spécificité de fonctionnalisation, une architecture plus simple pourrait améliorer le rendement du capteur. Dans le cas de la deuxième méthode, il serait impératif de réduire l'épaisseur du Si_3N_4 utilisé, ceci pourrait être fait en utilisant une méthode de déposition différente, le PECVD basse fréquence. En effet, en faisant la déposition à basse fréquence il est possible d'obtenir une couche beaucoup plus dense et donc l'épaisseur nécessaire serait considérablement réduite.

De plus, afin de diminuer le temps de détection requis, il serait possible d'appliquer un champ électrique lors de la détection. En attirant toutes les molécules chargées négativement à la surface du capteur, il serait possible d'accélérer la reconnaissance entre les bactéries contenues dans la solution et les anticorps fixés sur la surface.

En couplant l'utilisation d'un champ électrique à un système micro-fluidique, il sera possible de détecter une faible concentration de bactéries en un temps court (Figure 7.1) Aussi, pour améliorer la détection, il faudrait améliorer la résolution spatiale de l'appareil. En effet, en ayant une résolution de 1-2 μm , il sera possible

de détecter l'immobilisation spécifique d'une bactérie individuelle. Ceci permettrait donc de détecter une très faible quantité de bactéries.

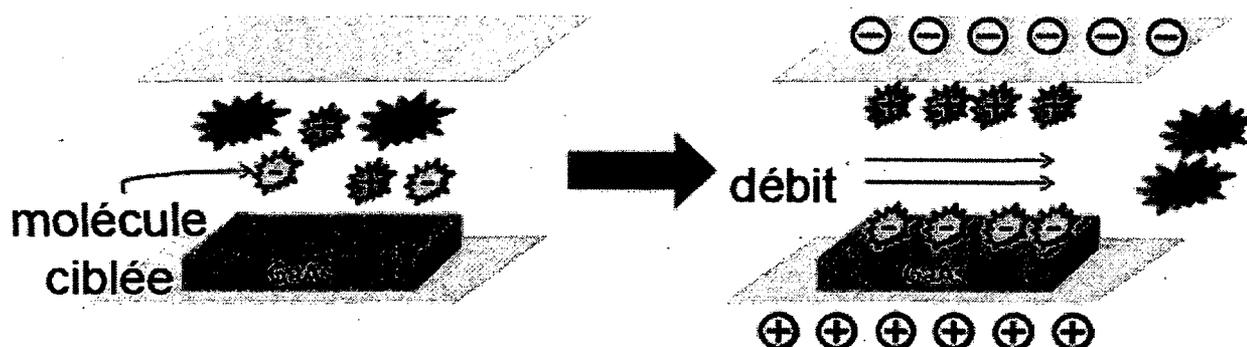


Figure 7.1 Illustration schématique d'un système micro-fluidique avec un champ électrique intégré.

En but d'améliorer la spécificité du capteur, il est essentiel d'utiliser des molécules spécifiques aux pathogènes visés. Lors de cette étude, des anticorps polyclonaux ont été utilisés afin de démontrer la validité de l'approche utilisée. Par contre, il est maintenant inévitable d'utiliser des anticorps ou fragments F_{ab} monoclonaux. Ceci permettrait à la fois d'améliorer la spécificité du capteur et de minimiser l'immobilisation de molécules non-spécifiques. Enfin, il serait utile d'utiliser une source d'excitation produisant le moins d'effets nocifs sur les bactéries, comme par exemple une source ayant une longueur d'onde plus longue que 532nm. Afin d'évaluer l'effet de l'exposition des bactéries, à différentes longueurs d'onde de lumière visible, dans du PBS et à température ambiante, une analyse de survie a été faite. En bref, une solution contenant 10^6 UFC/ml, de *E. coli* a été exposé à deux différentes longueurs d'onde 532nm et 633 nm sur une période de 24 heures. Comme contrôle, une même concentration de bactéries a été conservée à température pièce pendant la même période.

L'étalement des solutions a été fait en triplicata dans chaque cas, une fois au début et une fois après l'incubation de 24 heures afin d'être en mesure de calculer le taux de survie des bactéries suite à l'irradiation. Le laser rouge (633 nm) semble être moins dommageable pour les bactéries, comme prédit par contre il faudrait optimiser la puissance du laser afin de réduire davantage l'effet néfaste

de l'irradiation continue. En effet, selon les résultats obtenus, il serait possible de changer la source d'irradiation afin de minimiser les dommages causés aux micro-organismes et donc de minimiser les possibilités de faux résultats. Ceci est faisable en utilisant un laser émettant à 633 nm puisque celui-ci est encore en mesure d'exciter le GaAs.

Tableau 7.1 : Taux de survie des bactéries *E. coli* exposées à la lumière laser 30mW/cm²

Traitement	Temps	UFC/mL	Pourcentage de survie
Aucun traitement	0 h	1.40 x 10 ⁶	100.00 %
	24 h	1.65 x 10 ⁶	117.00 %
532 nm	0 h	8.00 x 10 ⁶	100.00 %
	24 h	1.70 x 10 ⁶	21.25 %
633 nm	0 h	1.60 x 10 ⁶	100.00 %
	24 h	1.07 x 10 ⁶	66.88 %

Après avoir optimisé tous les paramètres nécessaires il serait possible de faire des tests avec des échantillons provenant directement d'une tour de refroidissement contenant *L. pneumophila* encore vivante. De plus, les résultats obtenus pourront être quantifiés et comparés à d'autres tests, telle le PCR, afin de vérifier la validité des résultats obtenus avec la technique de PL. De plus, le multiplexage serait une option intéressante, car il serait possible de tester un échantillon contenant plusieurs pathogènes lors d'une seule mesure. Par exemple, il serait possible de faire croître par épitaxie de points quantiques émettant à différentes longueurs d'onde, sur des substrats. En recouvrant ces points par une mince couche de GaAs il sera possible de fonctionnaliser la surface du substrat. (Figure 7.2.a) En contrôlant la chimie de surface par laser il sera possible d'appliquer sélectivement les anticorps voulus sur le capteur. Bref, chaque longueur d'onde sera associée à un pathogène permettant ainsi la détection sélective et spécifique de différents pathogènes en parallèle. (Figure 7.2.b)

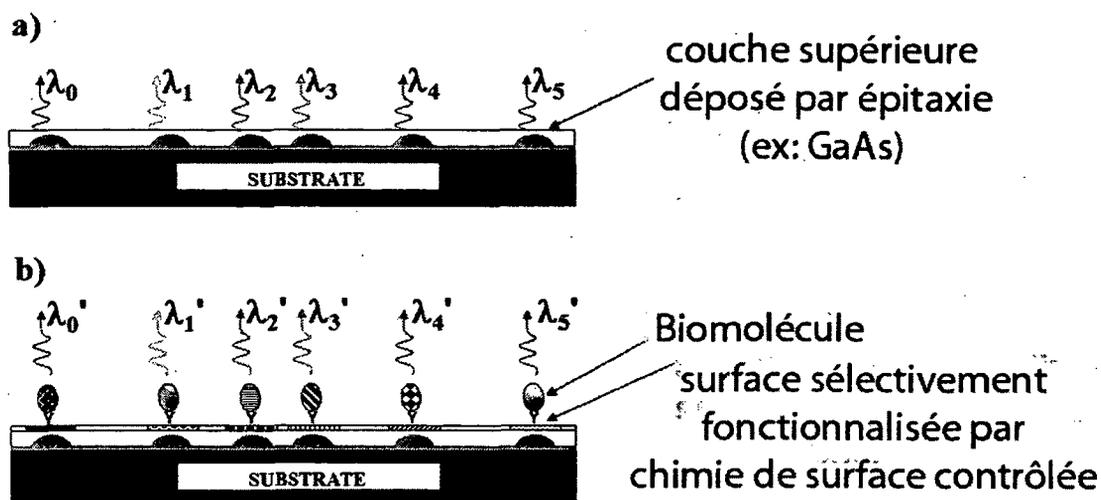


Figure 7.2. Illustration schématique d'une rangée de points quantiques épitaxiaux pour la détection parallèle et rapide de certaines molécules spécifiques.

Enfin, afin d'être en mesure d'intégrer ce type de détection en industrie, il faut être en mesure d'automatiser la collecte d'échantillons. Pour minimiser le temps de détection requis, il est nécessaire d'éliminer les étapes de collecte et de concentration du volume collecté. Ceci permettrait à la fois de réduire le temps de détection ainsi que de permettre l'installation du biocapteur sur le terrain.

Annex A. SUPPORTING INFORMATION

A. Sample preparation procedures and PL characterization

a. GaAs thiolation procedure

The samples were cleaned sequentially, for 5 minutes each, in an ultrasonic bath of undiluted solutions of OptiClear, acetone and isopropanol (IPA) at room temperature, similar to a previously described procedure [211]. The samples were, then, dried using a flow of compressed N₂ and etched. The wet chemical etch was carried out with ammonium hydroxide for 2 minutes, which served to remove surface native oxides, such as Ga₂O₃, As₂O₅, and As₂O₃ [206]. The samples were rinsed with freshly deoxygenized ethanol prior to immediately incubating them for 20 hours at room temperature in a mixture of biotinylated PEG thiol and HDT (1:15) diluted in deoxygenized ethanol to a final concentration of 2mM.

b. Aldehydization of the Si₃N₄ coated GaAs/AlGaAs microstructures

This procedure was achieved through wet chemical etching with a dilute (2.5%) solution of HF for 15 seconds. [164] Reproducible results were obtained through the well controlled preparation process of the samples. The etching rate of Si₃N₄, as determined by ellipsometry measurements, was at 89.5±4.8 nm/min, which is comparable to other reported etching rates of PECVD deposited Si₃N₄ [255]. The resulting H-terminated Si₃N₄ films were approximately 15 nm thick. Further functionalization was achieved through the exploitation of the reactivity of surface silicon-hydrogen bonds (Si-H_x) [163]. The samples were dipped in aqueous glutaraldehyde (25%) for 1 hour to allow covalent immobilization of polyclonal antibodies to the sensor surface through the formation of imine bonds [164]. The samples were rinsed twice with PBS to remove excess glutaraldehyde.

c. PL collection procedure

The HI-PLM instrument accommodates samples of up to $7 \times 7 \text{ mm}^2$ and it allows acquisition of PL maps with a spatial resolution of $5 \text{ }\mu\text{m}$ approximately. The full sample area was excited with a 532 nm CW laser, and mapping of the investigated GaAs/Al_{0.33}Ga_{0.67}As microstructures was carried out for the 871 nm emission peak. To define this peak, the spectra were taken with a 2 nm wavelength step size in the range between 856 and 876 nm. It took about 360 s to produce the whole PL map of the sample, including the time required for collection of a background. The computer-based interface of the HI-PLM instrument allowed an automated collection of a time series of PL maps in 10 min intervals. Sample illumination was controlled by a computer-programmed shutter that opened during PL integration time only (approximately 165 s per PL map). Backgrounds were also recorded and used for subtraction. A fraction of the excitation laser power was reflected by the fused silica window ($\sim 4\%$) and sent to a Centronic OSD100-7Q silicon photodiode for monitoring the laser power and normalization of the PL intensity maps. To avoid the unwanted effect of excessive visible light (400-780nm) irradiation on the bacterial cells[258], the samples were excited at power densities not exceeding 120 mW/cm^2 .

B. Macro and micro-characterization of biosensor surfaces

a. Static contact angle measurements

A large contact angle typically signifies hydrophobic surfaces, while a smaller angle indicates better wettability of the surface that is hydrophilic. As expected, before etching Si₃N₄ was rather hydrophobic [27] with a contact angle of $50^\circ \pm 3^\circ$, while after etching, and consequently after removing surface oxides, the surface became more hydrophobic with a contact angle of $72^\circ \pm 7^\circ$. The increase in standard deviation may indicate here an increase in surface roughness. After crosslinking the surface with glutaraldehyde, the contact angle was reduced from 72° to $34^\circ \pm 5^\circ$, suggesting an improvement in the wettability of the surface [242]. This is consistent with a high surface density of aldehyde groups [243].

b. Surface morphology of processed samples

The AFM measurements carried out on etched GaAs (001) samples confirmed that high-quality flat surfaces have been produced, with RMS amplitude near 0.3 nm. This is comparable with the literature results [214] as well as with our previously published data [233]. The GaAs (001) surface biofunctionalized with *E. coli* antibody via neutravidin and alkanethiol SAMs exhibited granular microstructure, composed of small nanoparticles of an average height of 4.5 nm. The dimension of these nanoparticles is consistent with the average size of neutravidin (ranging between 4 and 5 nm), the biggest molecule used in the functionalization procedure.

The surface of GaAs (001) covered with 40 nm of Si_3N_4 had a RMS amplitude equal to near 0.4 nm and an average height of the surface roughness amplitude was about 1.02 nm, indicating a slightly rougher surface than that of a freshly etched GaAs (001). After the HF etching, the RMS roughness and the average height of the surface roughness amplitude have increased to 0.9 and 4.2 nm, respectively. Following the glutaraldehydation process, the maximum height of the surface roughness amplitude increased further to approximately 16 nm.

LISTE DES RÉFÉRENCES

1. Kurtz, J.B., et al., *Legionella pneumophila* in Cooling Water Systems. Report of a Survey of Cooling Towers in London and a Pilot Trial of Selected Biocides. The Journal of Hygiene, 1982. **88**(3): p. 369-381.
2. Kusnetsov, J.M., et al., *Physical, chemical and microbiological water characteristics associated with the occurrence of Legionella in cooling tower systems*. Water Research, 1993. **27**(1): p. 85-90.
3. Türetgen, I. and A. Cotuk, *Monitoring of biofilm-associated Legionella pneumophila on different substrata in model cooling tower system*. Environmental monitoring and assessment, 2007. **125**(1-3): p. 271-279.
4. Wéry, N., et al., *Dynamics of Legionella spp. and bacterial populations during the proliferation of L. pneumophila in a cooling tower facility*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(10): p. 3030-3037.
5. Mavridou, A., M. Lambiri, and J.A. Papadakis, *A fatality resulting from a case of legionnaires' disease on hotel premises*. Water Research, 1994. **28**(11): p. 2421-2423.
6. Amano, Y. and Q. Cheng, *Detection of influenza virus: Traditional approaches and development of biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **381**(1): p. 156-164.
7. Oh, B.-K., et al., *Immunosensor for detection of Legionella pneumophila using surface plasmon resonance*. Selected papers from the Seventh World Congress on Biosensors Kyoto, Japan 15-17 May 2002, 2003. **18**(5-6): p. 605-611.
8. Zhao, Y., et al. *On-site screening of avian influenza virus (AIV) by polystyrene microfluidic chip immunoassay*. in 2007 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2007, May 20, 2007 - May 24, 2007. Santa Clara, CA, United states: Nano Science and Technology Institute.
9. Peruski, A.H. and L.F. Peruski, Jr., *Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents*. Clin.Diagn.Lab.Immunol., 2003. **10**(4): p. 506-513.
10. Ma, M., et al., *Establishment of rapid test of AIV by RT-PCR*. Gaojishu Tongxin/Chinese High Technology Letters, 2005. **15**(5): p. 77-81.
11. Bhunia, A.K. and A. Lathrop, *Pathogen Detection, Food-borne*, in McGraw-Hill 2003 Year Book of Science and Technology, Anonymous, Editor. 2003, McGraw-Hill Professional: New York, NY. p. 320-323.
12. Jae-Woo, C., A. Pu, and D. Psaltis, *Bacteria detection in a microfluidic channel utilizing electromagnetic cellular polarization and optical scattering*, in LEOS Summer Topical Meetings, 2006 Digest of the. 2006. p. 17-18.
13. Loge, F.J., D.E. Thompson, and D.R. Call, *PCR detection of specific pathogens in water: A risk-based analysis*. Environmental Science and Technology, 2002. **36**(12): p. 2754-2759.
14. Balasubramanian, A., et al. *Si-based sensor for virus detection*. in Proceedings of IEEE Sensors 2003. 2003. Piscataway, NJ, USA: IEEE.
15. Valsesia, A., et al., *Immobilization of antibodies on biosensing devices by nanoarrayed self-assembled monolayers*. Langmuir, 2006. **22**(4): p. 1763-1767.

16. Cao, T., et al., *Functionalization of AlN surface and effect of spacer density on Escherichia coli pili-antibody molecular recognition*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008. **63**(2): p. 176-182.
17. Ricci, F., et al., *Toward continuous glucose monitoring with planar modified biosensors and microdialysis*. Biosensors & bioelectronics, 2007. **22**(9-10): p. 2032-9.
18. Ding, X. and J.J. Dubowski. *Surface passivation of (001) GaAs with self-assembled monolayers of long-chain thiols*. in *Photon Processing in Microelectronics and Photonics IV*. USA: SPIE - The International Society for Optical Engineering.
19. Brust, M. and C.J. Kiely, *Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2002. **202**(2-3): p. 175-186.
20. Mrksich, M. and G.M. Whitesides, *Patterning self-assembled monolayers using microcontact printing: A new technology for biosensors?* Trends in Biotechnology, 1995. **13**(6): p. 228-235.
21. Ding, X., et al., *Immobilization of avidin on (001) GaAs surface*. Applied Physics A (Materials Science Processing), 2006. **A83**(3): p. 357-60.
22. Kim, C.-K., et al., *Formation dynamics of hexadecanethiol self-assembled monolayers on (001) GaAs observed with photoluminescence and Fourier transform infrared spectroscopies*. Journal of Applied Physics, 2009. **106**(8): p. 083518-5.
23. Lunt, S.R., et al., *Chemical studies of the passivation of GaAs surface recombination using sulfides and thiols*. Journal of Applied Physics, 1991. **70**(12): p. 7449-67.
24. Voznyy, O. and J.J. Dubowski, *Structure of Thiol Self-Assembled Monolayers Commensurate with the GaAs (001) Surface*. Langmuir, 2008. **24**(23): p. 13299-13305.
25. Frederix, F., et al., *Enhanced Performance of an Affinity Biosensor Interface Based on Mixed Self-Assembled Monolayers of Thiols on Gold*. Langmuir, 2003. **19**(10): p. 4351-4357.
26. Dong, S. and J. Li, *Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors*. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1997. **42**(1): p. 7-13.
27. Diao, J., et al., *A surface modification strategy on silicon nitride for developing biosensors*. Analytical Biochemistry, 2005. **343**(2): p. 322-328.
28. Stine, R., et al., *Formation of Primary Amines on Silicon Nitride Surfaces: a Direct, Plasma-Based Pathway to Functionalization*. Langmuir, 2007. **23**(8): p. 4400-4404.
29. Regenmortel, M.H.V., *Concept of virus species*. Biodiversity and Conservation, 1992. **1**(4): p. 263-266.
30. Schulz, H.N., et al., *Dense Populations of a Giant Sulfur Bacterium in Namibian Shelf Sediments*. Science, 1999. **284**(5413): p. 493-495.
31. Imshenetsky, A.A., S.V. Lysenko, and G.A. Kazakov, *Upper boundary of the biosphere*. Appl. Environ. Microbiol., 1978. **35**(1): p. 1-5.
32. Vorobyova, E., et al., *The deep cold biosphere: facts and hypothesis*. FEMS Microbiology Reviews, 1997. **20**(3-4): p. 277-290.
33. Parnas, H., *Model for decomposition of organic material by microorganisms*. Soil Biology and Biochemistry, 1975. **7**(2): p. 161-169.
34. Christner, B.C., et al., *Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(48): p. 18854-18859.

35. Casadevall, A. and L.-A. Pirofski, *What is a pathogen?* *Annals of Medicine*, 2002. **34**(1): p. 2 - 4.
36. Chazal, N. and D. Gerlier, *Virus Entry, Assembly, Budding, and Membrane Rafts*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2003. **67**(2): p. 226-237.
37. Thomson, B.J., *Viruses and apoptosis*. *International Journal of Experimental Pathology*, 2001. **82**(2): p. 65-76.
38. Koonin, E., T. Senkevich, and V. Dolja, *The ancient Virus World and evolution of cells*. 2006, BioMed Central.
39. Dimmock, N.J., A.J. Easton, and K. Leppard, *Introduction to modern virology*. 6 ed. 2007, Malden: Blackwell Publishing.
40. Edwards, R.A. and F. Rohwer, *Viral metagenomics*. *Nat Rev Micro*, 2005. **3**(6): p. 504-510.
41. Fauquet, C., *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses : eighth report of the International Committee on Taxonomy of viruses*. 2005, California: Elsevier Academic Press. 1259.
42. Mayo, M.A. and M.C. Horzinek, *A revised version of the international code of virus classification and nomenclature*. *Archives of Virology*, 1998. **143**(8): p. 1645-1654.
43. Thompson, W.W., et al., *Mortality Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the United States*. *JAMA*, 2003. **289**(2): p. 179-186.
44. WorldHealthOrganization, *Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **353**(13): p. 1374-1385.
45. Fisman, D.N., *Seasonality of Infectious Diseases*. *Annual Review of Public Health*, 2007. **28**(1): p. 127-143.
46. Thompson, W.W., et al., *Influenza-Associated Hospitalizations in the United States*. *JAMA*, 2004. **292**(11): p. 1333-1340.
47. Lowy, R.J., G.A. Vavrina, and D.D. LaBarre, *Comparison of gamma and neutron radiation inactivation of influenza A virus*. *Antiviral Research*, 2001. **52**(3): p. 261-273.
48. Morgan, W.F. and M.B. Sowa, *Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(40): p. 14127-14128.
49. Shapiro, J.A., *THINKING ABOUT BACTERIAL POPULATIONS AS MULTICELLULAR ORGANISMS*. *Annual Review of Microbiology*, 1998. **52**(1): p. 81-104.
50. Eagon, R.G., *PSEUDOMONAS NATRIEGENS, A MARINE BACTERIUM WITH A GENERATION TIME OF LESS THAN 10 MINUTES*. *J. Bacteriol.*, 1962. **83**(4): p. 736-737.
51. Rappé, M.S. and S.J. Giovannoni, *THE UNCULTURED MICROBIAL MAJORITY*. *Annual Review of Microbiology*, 2003. **57**(1): p. 369-394.
52. Thomson, J.R.B. and H. Bertram, *LABORATORY DIAGNOSIS OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM INFECTIONS*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2001. **15**(4): p. 1047-1071.
53. Bergey, D.H. and J.G. Holt, *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 1994, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 787.
54. Kubitschek, H.E., *Cell volume increase in Escherichia coli after shifts to richer media*. *J. Bacteriol.*, 1990. **172**(1): p. 94-101.

55. Bell, B.P., et al., *A Multistate Outbreak of Escherichia coli O157:H7--Associated Bloody Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From Hamburgers: The Washington Experience*. JAMA, 1994. **272**(17): p. 1349-1353.
56. Sharma, V., et al., *Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: nucleotide sequence and expression of the menB gene from Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1992. **174**(15): p. 5057-5062.
57. Hudault, S., J. Guignot, and A.L. Servin, *Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection*. Gut, 2001. **49**(1): p. 47-55.
58. Flint, K.P., *The long-term survival of Escherichia coli in river water*. Journal of Applied Microbiology, 1987. **63**(3): p. 261-270.
59. Dufour, A.P., E.R. Strickland, and V.J. Cabelli, *Membrane filter method for enumerating Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol., 1981. **41**(5): p. 1152-1158.
60. Lazcka, O., F.J.D. Campo, and F.X. Muñoz, *Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(7): p. 1205-1217.
61. Yamamoto, Y., *PCR in Diagnosis of Infection: Detection of Bacteria in Cerebrospinal Fluids*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2002. **9**(3): p. 508-514.
62. Mason, W.J., et al., *Multiplex PCR Protocol for the Diagnosis of Staphylococcal Infection*. J. Clin. Microbiol., 2001. **39**(9): p. 3332-3338.
63. Bej, A.K., et al., *Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes*. Appl. Environ. Microbiol., 1990. **56**(2): p. 307-314.
64. Takahashi, H., et al., *Real-time PCR and enrichment culture for sensitive detection and enumeration of Escherichia coli*. Journal of Microbiological Methods, 2009. **79**(1): p. 124-127.
65. Mackay, I.M., *Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterisation*. 2007, Norfolk: Caister Academic Press. 454.
66. Brooks, B.W., et al., *Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Campylobacter fetus in bovine preputial washing and vaginal mucus samples*. Veterinary Microbiology, 2004. **103**(1-2): p. 77-84.
67. Fratamico, P.M., *Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan Salmonella, and Transia Card Salmonella assays for detection of Salmonella spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef*. Molecular and Cellular Probes, 2003. **17**(5): p. 215-221.
68. Crowther, J.R., *ELISA: theory and practice*. 1995, New Jersey: Humana Press Inc. 223.
69. Bae, Y.M., et al., *Immunosensor for detection of Legionella pneumophila based on imaging ellipsometry*. 14th Molecular Electronics and Devices Symposium, 2004. **24**(1-2): p. 61-64.
70. Lin, H.-Y., et al., *Development and application of side-polished fiber immunosensor based on surface plasmon resonance for the detection of Legionella pneumophila with halogens light and 850 nm-LED*. Sensors and Actuators, A: Physical, 2007. **138**(2): p. 299-305.
71. Yu-Chia, T., et al. *Side-polished fiber immunosensor based on surface plasmon resonance for detection of Legionella pneumophila*. in *Optical Fibers and Sensors for*

- Medical Diagnostics and Treatment Applications VIII*. USA: SPIE - The International Society for Optical Engineering.
72. Myszka, D.G., M.D. Jonsen, and B.J. Graves, *Equilibrium Analysis of High Affinity Interactions Using BLACORE*. Analytical Biochemistry, 1998. **265**(2): p. 326-330.
 73. Scheller, F.W., et al., *Overview of Biosensor Technology*, in *Advances in Molecular and Cell Biology*. 1996, Elsevier. p. 353-363.
 74. CLARK, L.C.J., et al., *Effects of Psychotomimetic Compounds on Certain Oxidative and Hydrolytic Enzymes in Mammalian Brain*. The Journal of Nervous and Mental Disease, 1956. **124**(5): p. 466-472.
 75. Updike, S.J. and G.P. Hicks, *Reagentless Substrate Analysis with Immobilized Enzymes*. Science, 1967. **158**(3798): p. 270-272.
 76. Guilbault, G.G. and J.G. Montalvo, *Enzyme electrode for the substrate urea*. Journal of the American Chemical Society, 1970. **92**(8): p. 2533-2538.
 77. Váradi, M., *Editorial - Biosensor as a new tool in food analysis*. Acta Alimentaria, 2005. **34**(3): p. 209-210.
 78. van Bergen, S.K., et al., *On-Site Detection of Explosives in Groundwater with a Fiber Optic Biosensor*. Environmental Science & Technology, 2000. **34**(4): p. 704-708.
 79. Connolly, P., *The potential for biosensors in cardiac surgery*. Perfusion, 2004. **19**(4): p. 247-249.
 80. Lauks, I.R., *Microfabricated Biosensors and Microanalytical Systems for Blood Analysis*. Accounts of Chemical Research, 1998. **31**(5): p. 317-324.
 81. Voldman, J., M.L. Gray, and M.A. Schmidt, *Microfabrication in Biology and Medicine*. Annual Review of Biomedical Engineering, 1999. **1**(1): p. 401-425.
 82. Velasco-Garcia, M.N., *Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009. **20**(1): p. 27-33.
 83. Wang, J., *Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics*. Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**(10): p. 1887-1892.
 84. Gavrilescu, M. and Y. Chisti, *Biotechnology--a sustainable alternative for chemical industry*. Biotechnology Advances, 2005. **23**(7-8): p. 471-499.
 85. Campàs, M., B. Prieto-Simón, and J.-L. Marty, *A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009. **20**(1): p. 3-9.
 86. Jans, K., et al., *Surface Chemistry to Bridge Inorganic Biosensor Surfaces and Biological Materials*, in *Sensors for Environment, Health and Security*. 2009. p. 277-294.
 87. Hoa, X.D., A.G. Kirk, and M. Tabrizian, *Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **23**(2): p. 151-160.
 88. Wang, J., *Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review*. Electroanalysis, 2005. **17**(1): p. 7-14.
 89. Yogeswaran, U. and S.-M. Chen, *Recent Trends in the Application of Carbon Nanotubes/Polymer Composite Modified Electrodes for Biosensors: A Review*. Analytical Letters, 2008. **41**(2): p. 210 - 243.
 90. Boozer, C., et al., *DNA-Directed Protein Immobilization for Simultaneous Detection of Multiple Analytes by Surface Plasmon Resonance Biosensor*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(5): p. 1515-1519.

91. Hildebrandt, A., et al., *Development of a portable biosensor for screening neurotoxic agents in water samples*. *Talanta*, 2008. **75**(5): p. 1208-1213.
92. Nikolelis, D.P., et al., *Optical portable biosensors based on stabilized lipid membrane for the rapid detection of doping materials in human urine*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008. **130**(2): p. 577-582.
93. Wang, J., et al., *Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor*. *Talanta*, 2009. **77**(4): p. 1454-1459.
94. Alocilja, E.C. and S.M. Radke, *Market analysis of biosensors for food safety*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003. **18**(5-6): p. 841-846.
95. Vo-Dinh, T. and B. Cullum, *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000. **366**(6): p. 540-551.
96. Vo-Dinh, T., B.M. Cullum, and D.L. Stokes, *Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2001. **74**(1-3): p. 2-11.
97. Mello, L.D. and L.T. Kubota, *Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries*. *Food Chemistry*, 2002. **77**(2): p. 237-256.
98. Richman, S.A., D.M. Kranz, and J.D. Stone, *Biosensor Detection Systems: Engineering Stable, High-Affinity Bioreceptors by Yeast Surface Display*, in *Biosensors and Biodetection*. 2009. p. 323-350.
99. SCHULTZ, J.S., *Sensitivity and Dynamics of Bioreceptor-based Biosensors*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1987. **506**(Biochemical Engineering V): p. 406-414.
100. Hansch, C. and T.E. Klein, *Molecular graphics and QSAR in the study of enzyme-ligand interactions. On the definition of bioreceptors*. *Accounts of Chemical Research*, 1986. **19**(12): p. 392-400.
101. Rogers, K.R. and M.E. Eldefrawi, *Receptor biosensors based on optical detection*. 1998. p. 135-146.
102. Potyrailo, R.A., et al., *Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(16): p. 3419-3425.
103. Stenger, D.A., et al., *Detection of physiologically active compounds using cell-based biosensors*. *Trends in Biotechnology*, 2001. **19**(8): p. 304-309.
104. Van Oss, C.J., R.J. Good, and M.K. Chaudhury, *The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in "hydrophobic interactions" between biopolymers and low energy surfaces*. *Journal of colloid and interface science*, 1986. **111**(2): p. 378-390.
105. Sethi, R.S., *Transducer aspects of biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 1994. **9**(3): p. 243-264.
106. Thévenot, D.R., et al., *ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS: RECOMMENDED DEFINITIONS AND CLASSIFICATION*^{*}. *Analytical Letters*, 2001. **34**(5): p. 635 - 659.
107. Guan, J.-G., Y.-Q. Miao, and Q.-J. Zhang, *Impedimetric biosensors*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004. **97**(4): p. 219-226.
108. Ramanathan, K. and B. Danielsson, *Principles and applications of thermal biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001. **16**(6): p. 417-423.
109. Andle, J.C. and J.F. Vetelino, *Acoustic wave biosensors*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 1994. **44**(3): p. 167-176.

110. Haake, H.M., A. Schütz, and G. Gauglitz, *Label-free detection of biomolecular interaction by optical sensors*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2000. **366**(6): p. 576-585.
111. Ligler, F.S., *Perspective on Optical Biosensors and Integrated Sensor Systems*. Analytical Chemistry, 2008. **81**(2): p. 519-526.
112. Fan, X., et al., *Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review*. Analytica Chimica Acta, 2008. **620**(1-2): p. 8-26.
113. Schlesinger, T.E., et al., *Gallium Arsenide*, in *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*. 2001, Elsevier: Oxford. p. 3431-3435.
114. Colinge, J.P. and C.A. Colinge, *Physics of semiconductor devices*. 2006, New York: Springer science. 436.
115. Pankove, J.I., *Optical processes in semiconductors*. 1971, New York: Prentice-Hall Inc.
116. Seeger, K., *Semiconductor physics: an introduction*. 2004, Germany: Springer-Verlag. 537.
117. O'Neil, M., J. Marohn, and G. McLendon, *Dynamics of electron-hole pair recombination in semiconductor clusters*. The Journal of Physical Chemistry, 1990. **94**(10): p. 4356-4363.
118. Ehrenreich, H. and F. Spaepen, *Solid state physics*. Vol. 61. 2009, San Diego: Elsevier. 275.
119. Fan, H.Y., *Temperature Dependence of the Energy Gap in Semiconductors*. Physical Review, 1951. **82**(6): p. 900.
120. Tersoff, J., *Schottky barriers and semiconductor band structures*. Physical Review B, 1985. **32**(10): p. 6968.
121. Streetman, B.G. and S. Banerjee, *Solid State electronic Devices (5th ed.)*. 2000, New Jersey: Prentice Hall. 524.
122. Blakemore, J.S., *Gallium Arsenide*. 1987: American Institute of physics.
123. Fawcett, W., A.D. Boardman, and S. Swain, *Monte Carlo determination of electron transport properties in gallium arsenide*. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 1970. **31**(9): p. 1963-1990.
124. Orton, J., *Laser Beams and Microwaves: Gallium Arsenide and Indium Phosphide, in Semiconductors and the Information Revolution*. 2009, Academic Press: Amsterdam. p. 135-161.
125. Duseaux, M., *Temperature profile and thermal stress calculations in GaAs crystals growing from the melt*. Journal of Crystal Growth. **61**(3): p. 576-590.
126. Jordan, A.S., et al., *A comparative study of thermal stress induced dislocation generation in pulled GaAs, InP, and Si crystals*. Journal of Applied Physics, 1981. **52**(5): p. 3331-3336.
127. Baca, A.G. and C.I.H. Ashby, *Fabrication of GaAs devices*. 2005, London: The Institution of Electrical Engineers. 347.
128. Empedocles, S.A., D.J. Norris, and M.G. Bawendi, *Photoluminescence Spectroscopy of Single CdSe Nanocrystallite Quantum Dots*. Physical Review Letters, 1996. **77**(18): p. 3873.
129. Crosby, G.A. and J.N. Demas, *Measurement of photoluminescence quantum yields. Review*. The Journal of Physical Chemistry, 1971. **75**(8): p. 991-1024.
130. Cullis, A.G., L.T. Canham, and P.D.J. Calcott, *The structural and luminescence properties of porous silicon*. Journal of Applied Physics, 1997. **82**(3): p. 909-965.

131. Gopal, A.V., et al., *Photoluminescence study of exciton--optical phonon scattering in bulk GaAs and GaAs quantum wells*. Journal of Applied Physics, 2000. **87**(4): p. 1858-1862.
132. Nag, B.R., *Physics of Quantum Well Devices*. 2001, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 312.
133. Adachi, S., *GaAs and related materials: bulk semiconducting and superlattice properties*. 1994, New Jersey: World Scientific Publishing Co. 675.
134. Nam, O.-H., et al., *Lateral epitaxy of low defect density GaN layers via organometallic vapor phase epitaxy*. Applied Physics Letters, 1997. **71**(18): p. 2638-2640.
135. Chen, Y., *Exchange-induced splitting of exciton energy levels in quantum wires*. Physical Review B, 1990. **41**(15): p. 10604.
136. Munteanu, F.M., et al., *Photoluminescence detected enhancement of the electron-hole exchange interaction in a quantum well*. Solid State Communications, 2000. **114**(2): p. 63-68.
137. Riblet, P., et al., *Determination of photoluminescence mechanism in InGaN quantum wells*. Applied Physics Letters, 1999. **75**(15): p. 2241-2243.
138. Grimsditch, M., et al., *Elastic properties of GaAs/AlAs superlattices*. Physical Review B, 1990. **42**(5): p. 2923.
139. Lemke, B.P. and D. Haneman, *Dangling bonds on silicon*. Physical Review B, 1978. **17**(4): p. 1893.
140. Togo, H., *Advanced Free Radical Reactions for Organic Synthesis*. 2004, Oxford: Elsevier. 275.
141. Oigawa, H., et al., *Studies on an (NH₄)₂Sx-Treated GaAs Surface Using AES, LEELS and RHEED*. Japanese Journal of Applied Physics 1989. **28** (3): p. 340-342.
142. Hou, T., et al., *Passivation of GaAs (100) with an Adhesion Promoting Self-Assembled Monolayer*. Chemistry of Materials, 1997. **9**(12): p. 3181-3186.
143. Bessolov, V., et al., *Photoluminescence of II-IV-V₂ and I-III-VI₂ crystals passivated in a sulfide solution*. Technical Physics Letters, 1998. **24**(11): p. 875-876.
144. Baum, T., S. Ye, and K. Uosaki, *Formation of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on GaAs Surface with in Situ Surface Activation by Ammonium Hydroxide*. Langmuir, 1999. **15**(25): p. 8577-8579.
145. Aguirre-Tostado, F.S., et al., *S passivation of GaAs and band bending reduction upon atomic layer deposition of HfO₂/Al₂O₃ nanolaminates*. Applied Physics Letters, 2008. **93**(6): p. 061907-1.
146. Patai, S., *The chemistry of the thiol group*. 1974, London: Wiley. 956.
147. Katz, E. and I. Willner, *Biomolecule-Functionalized Carbon Nanotubes: Applications in Nanobioelectronics*. ChemPhysChem, 2004. **5**(8): p. 1084-1104.
148. Schwartz, D.K., *MECHANISMS AND KINETICS OF SELF-ASSEMBLED MONOLAYER FORMATION*. Annual Review of Physical Chemistry, 2003. **52**(1): p. 107-137.
149. Wnek, G.E. and G.L. Bowlin, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Second Edition, Four Volume set*. 2008, New York: Informa Healthcare. 3552.
150. Love, J.C., et al., *Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1103-1170.

151. Vos, J.G., R.J. Forster, and T.E. Keyes, *Interfacial Supramolecular Assemblies*. 2003, Chichester: John Wiley and Sons, Ltd. 317.
152. Fox, M.A. and M.D. Wooten, *Characterization, Adsorption, and Photochemistry of Self-Assembled Monolayers of 10-Thiododecyl 2-Anthryl Ether on Gold*. *Langmuir*, 1997. **13**(26): p. 7099-7105.
153. Wang, J., P.V.A. Pamidi, and D.R. Zanette, *Self-Assembled Silica Gel Networks*. *Journal of the American Chemical Society*, 1998. **120**(23): p. 5852-5853.
154. Madou, M.J., *Fundamentals of microfabrication: the science of miniaturization*. Technology and engineering. 2002: CRC Press. 723.
155. Kaifer, A.E., *Supramolecular Electrochemistry* 2004, Florida: Taylor and Francis group.
156. Huang, C.J., C. Jiann-Ruey, and S.P. Huang, *Silicon dioxide passivation of gallium arsenide by liquid phase deposition*. *Materials Chemistry and Physics*, 2001. **70**(1): p. 78-83.
157. YOTA, #160, and Jiro, *Interlevel Dielectric Processes Using PECVD Silicon Nitride, Polyimide, and Polybenzoxazole for GaAs HBT Technology*. Vol. 156. 2009, Pennington, NJ, ETATS-UNIS: Electrochemical Society.
158. Nishi, Y. and R. Doering, *Handbook of semiconductor manufacturing technology*. Technology & Engineering 2007: CRC Press. 1720.
159. Harbeke, G., et al., *Growth and Physical Properties of LPCVD Polycrystalline Silicon Films*. *Journal of the Electrochemical Society*, 1984. **131**(3): p. 675-682.
160. Alayo, M.I., et al., *On the nitrogen and oxygen incorporation in plasma-enhanced chemical vapor deposition (PECVD) SiO_xN_y films*. *Thin Solid Films*, 2002. **402**(1-2): p. 154-161.
161. Karymov, M.A., et al., *Fixation of DNA directly on optical waveguide surfaces for molecular probe biosensor development*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1995. **29**(1-3): p. 324-327.
162. Headrick, J.E. and C.L. Berrie, *Alternative Method for Fabricating Chemically Functionalized AFM Tips: α -Silane Modification of HF-Treated Si₃N₄ Probes*. *Langmuir*, 2004. **20**(10): p. 4124-4131.
163. Coffinier, Y., et al., *Covalent functionalization of silicon nitride surfaces by semicarbazide group*. *Surface Science*, 2007. **601**(23): p. 5492-5498.
164. Barrios, C.A., et al., *Label-free optical biosensing with slot-waveguides*. *Opt. Lett.*, 2008. **33**(7): p. 708-710.
165. McGuire, G.E., et al., *Surface Characterization*. *Analytical Chemistry*, 1995. **67**(12): p. 199-220.
166. Milling, A.J., *Surface characterization methods: principles, techniques, and applications*. 1999: Marcel Dekker. 412.
167. Griffiths, P. and J.A. de Hasseth, *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. 2007, New Jersey: Wiley and Sons, Inc. 704.
168. Ferraro, J.R. and L.J. Basile, *Fourier transform infrared spectroscopy*. 1985. Medium: X; Size: Pages: 406.
169. Marshall, G.M., F. Bensebaa, and J.J. Dubowski, *Observation of surface enhanced IR absorption coefficient in alkanethiol based self-assembled monolayers on GaAs(001)*. *Journal of Applied Physics*, 2009. **105**(9): p. 094310-7.
170. Hollander, J.M. and W.L. Jolly, *X-ray photoelectron spectroscopy*. *Accounts of Chemical Research*, 1970. **3**(6): p. 193-200.

171. Briggs, D. and M.P. Seah, *PRACTICAL SURFACE ANALYSIS BY AUGER AND X-RAY PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY* 1983, Chichester: Wiley and Sons, Inc. 533.
172. Moulder, J.F. and J. Chastain, *Handbook of x-ray photoelectron spectroscopy: a reference book of standard spectra for identification and interpretation of XPS data.* 1992: Perkin-Elmer Corp. 259.
173. Webb and et al., *Confocal Microscope with Large Field and Working Distance.* Applied Optics, 1999. **38**(22): p. 4870.
174. Gould, S.J., *The lying stones of Marrakech: penultimate reflections in natural history.* 2000, New York: Three River press. 384.
175. Rost, F.W.D., *Fluorescence microscopy.* Vol. 2. 1995, New York: Cambridge University Press. 473.
176. Allan, V.J., *Protein localization by fluorescence microscopy: a practical approach.* 2000, Oxford: Oxford University Press. 231.
177. Airy, G.B., *On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture.* Transactions of the Cambridge Philosophical Society, Vol. 5. Vol. 5. 1835: Cambridge Philosophical society. 283.
178. Born, M., E. Wolf, and A.B. Bhatia, *Principles of Optics.* 1997, New York: Cambridge University Press. 994.
179. Magonov, S.N. and M.-H. Whangbo, *Surface analysis with STM and AFM: experimental and theoretical aspects of image analysis.* 1996: Wiley - VCH. 323.
180. Ihrig, J.L. and D.Y.F. Lai, *Contact angle measurement.* Journal of Chemical Education, 1957. **34**(4): p. 196-null.
181. Adamson, A.W. and A.P. Gast, *Physical Chemistry of Surfaces.* 1997, New York: Wiley and Sons, Inc. 757.
182. Förch, R., et al., *Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology.* 2009, Weinheim: Wiley and Sons.
183. Seker, F., et al., *Surface Chemistry of Prototypical Bulk II-VI and III-V Semiconductors and Implications for Chemical Sensing.* Chemical Reviews, 2000. **100**(7): p. 2505-2536.
184. Hasegawa, H., et al., *Correlation between photoluminescence and surface-state density on GaAs surfaces subjected to various surface treatments.* Japanese Journal of Applied Physics, Part 2 (Letters), 1988. **27**(11): p. 2177-9.
185. Geisz, J.F., T.F. Kuech, and A.B. Ellis, *Changing photoluminescence intensity from GaAs/Al_{0.3}Ga_{0.7}As heterostructures upon chemisorption of SO₂.* Journal of Applied Physics, 1995. **77**(3): p. 1233-1240.
186. O'Neil, M.J., et al., *THE MERCK INDEX AN ENCYCLOPEDIA OF CHEMICALS, DRUGS, AND BIOLOGICALS.* 2006, New Jersey: Merck research laboratories. 2564.
187. Olitzki, L., *Electric Charge of Bacterial Antigens.* The Journal of Immunology, 1932. **22**: p. 251-256.
188. Peterson, A.A., et al., *Binding of Polycationic Antibiotics and Polyamines to Lipopolysaccharides of Pseudomonas aeruginosa.* JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1985. **163**(3): p. 1256-1261.
189. Lins, R.D. and T.P. Straatsma, *Computer Simulation of the Rough Lipopolysaccharide Membrane of Pseudomonas aeruginosa.* Biophysical Journal, 2001. **81**(2): p. 1037-1046.

190. Preclíková, J., et al., *Laser-induced refractive index changes in nanocrystalline diamond membranes*. Opt. Lett. **35**(4): p. 577-579.
191. Oh, S.Y., et al., *Rapid detection of influenza A virus in clinical samples using an ion channel switch biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2008. **23**(7): p. 1161-1165.
192. Balasubramanian, A., et al., *Si-based sensor for virus detection*. Ieee Sensors Journal, 2005. **5**(3): p. 340-344.
193. Ruan, Y., et al., *Antibody immobilization within glass microstructured fibers: a route to sensitive and selective biosensors*. Optics Express, 2008. **16**(22): p. 18514-18523.
194. Bora, M., et al., *Near field detector for integrated surface plasmon resonance biosensor applications*. Optics Express, 2009. **17**(1): p. 329-336.
195. Choi, J.W., A. Pu, and D. Psaltis, *Optical detection of asymmetric bacteria utilizing electro orientation*. Optics Express, 2006. **14**(21): p. 9780-9785.
196. Mattoussi, H., et al., *Self-assembly of CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(49): p. 12142-12150.
197. Celestè A. Constantine and S.V.M. Kerim M. Gattas-Asfura, Gema Crespo, Vipin Rastogi, Tu-Chen Cheng, Joseph J. DeFrank, Roger M. Leblanc, *Layer-by-Layer Biosensor Assembly Incorporating Functionalized Quantum Dots*. Langmuir 2003 **19**(23) 9863, 2003. **19**(23): p. 9863-9867.
198. Richard Wargnier, et al., *Energy Transfer in Aqueous Solutions of Oppositely Charged CdSe/ZnS Core/Shell Quantum Dots and in Quantum Dot-Nanogold Assemblies* Nano Lett. , 2004. **4**(3): p. 451-457.
199. Megan A. Hahn, Joel S. Tabb, and T.D. Krauss, *Detection of Single Bacterial Pathogens with Semiconductor Quantum Dots*. Anal. Chem. , 2005. **77**(15): p. 4861-4869.
200. Hoa, X.D., et al., *Fabrication and characterization of patterned immobilization of quantum dots on metallic nano-gratings*. Biosensors & Bioelectronics, 2008. **24**(4): p. 970-975.
201. Stringer, R.C., D. Hoehn, and S.A. Grant, *Quantum dot-based biosensor for detection of human cardiac Troponin I using a liquid-core waveguide*. Ieee Sensors Journal, 2008. **8**(3-4): p. 295-300.
202. Medintz, I.L. and H. Mattoussi, *Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2009. **11**(1): p. 17-45.
203. Gao, X.H., W.C.W. Chan, and S.M. Nie, *Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding*. Journal of Biomedical Optics, 2002. **7**(4): p. 532-537.
204. Dubowski, J.J., *Novel Quantum Dot based Approach for Biosensing*, in *Lasers and Electro-Optics Society, LEOS 2006, 19th Annual Meeting of the IEEE*. 2006, IEEE: Montreal. p. 302-303.
205. Smolko, E.E. and J.H. Lombardo, *Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation*. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B (Beam Interactions with Materials and Atoms), 2005. **236**(1-4): p. 249-53.
206. Bryce, C. and D. Berk, *Kinetics of GaAs dissolution in H2O2-NH4OH-H2O solutions*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 1996. **35**(12): p. 4464-4470.

207. Nakagawa, O.S., et al. *Surface passivation studies on GaAs with octadecyl thiol*. in *Extended Abstracts of the 1991 International Conference on Solid State Devices and Materials*. 1991. Tokyo, Japan: Bus. Center Acad. Soc. Japan.
208. Moumanis, K., et al., *Aging and detergent washing effects of the surface of (001) and (110) GaAs passivated with hexadecanethiol*. *J. Appl. Phys.*, 2006. **100**(3): p. 034702.
209. Hirase, T., T. Ishii, and Y. Nagasaki. *Construction of poly(ethylene glycol) tethered chain surface possessing mercapto group at the distal end to achieve high protein sensing*. in *55th SPSJ Annual Meeting, May 24, 2006 - May 26, 2006*. 2006. Nagoya, Japan: Society of Polymer Science.
210. Nagasaki, Y., et al., *Enhanced immunoresponse of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface construction of high-performance immunomagnetic ELISA system*. *Journal of colloid and interface science*, 2007. **309**(2): p. 524-530.
211. Ding, X., et al., *Fourier-transform infrared and photoluminescence spectroscopies of self-assembled monolayers of long-chain thiols on (001) GaAs*. *Journal of Applied Physics*, 2006. **99**(5): p. 54701-1.
212. Nuzzo, R.G., L.H. Dubois, and D.L. Allara, *Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. I. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers*. *Journal of the American Chemical Society*, 1990. **112**(2): p. 558-69.
213. Marshall, G.M., F. Bensebaa, and J.J. Dubowski, *Observation of surface enhanced IR absorption coefficient in alkanethiol based self-assembled monolayers on GaAs(001)* *Journal of Applied Physics*, 2009: p. -.
214. Ke, Y., et al., *Structural studies of sulfur-passivated GaAs (100) surfaces with LEED and AFM*. *Surface Science*, 1998. **415**(1-2): p. 29-36.
215. Wickramasinghe, S.R., et al., *Tangential flow microfiltration and ultrafiltration for human influenza A virus concentration and purification*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005. **92**(2): p. 199-208.
216. Noda, T., et al., *Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles*. *Nature*, 2006. **439**(7075): p. 490-492.
217. Kienberger, F., et al., *Dynamic force microscopy imaging of native membranes*. *Proceedings of the Fourth International Conference on Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures*, 2003. **97**(1-4): p. 229-237.
218. Tyler, K.N. and B.N. Fields, *Pathogenesis of neurotropical infections*. *Handbook of clinical neurology*: Vol. 12. 1989.
219. Abrams, P.G. and A.R. Fritzberg, *Radioimmunotherapy of Cancer*. Chap. 7 in *Radioimmunotherapy of Cancer*. 2000, New York: Informa Health Care.
220. Diamandis, E.P. and T.K. Christopoulos, *Immunoassay configuration*. Chap. 10 In *Immunoassay*. 1996, Ontario: Academic Press.
221. Feng, P., *Impact of molecular biology on the detection of foodborne pathogens*. *Molecular Biotechnology*, 1997. **7**(3): p. 267-278.
222. de Boer, E. and R.R. Beumer, *Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms*. *International Journal of Food Microbiology*, 1999. **50**(1-2): p. 119-130.
223. Ivnitski, D., et al., *Biosensors for detection of pathogenic bacteria*. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999. **14**(7): p. 599-624.

224. Ko, S. and S.A. Grant, *A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of Salmonella typhimurium*. Biosensors and Bioelectronics, 2006. **21**(7): p. 1283-1290.
225. Leonard, P., et al., *Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **32**(1): p. 3-13.
226. Yang, L. and R. Bashir, *Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria*. Biotechnology Advances. **26**(2): p. 135-150.
227. Dancil, K.-P.S., D.P. Greiner, and M.J. Sailor, *A Porous Silicon Optical Biosensor: % Detection of Reversible Binding of IgG to a Protein A-Modified Surface*. Journal of the American Chemical Society, 1999. **121**(34): p. 7925-7930.
228. Endo, T., et al., *Label-Free Detection of Peptide Nucleic Acid-DNA Hybridization Using Localized Surface Plasmon Resonance Based Optical Biosensor*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(21): p. 6976-6984.
229. Ptitsyn, L., et al., *A biosensor for environmental genotoxin screening based on an SOS lux assay in recombinant Escherichia coli cells*. Appl. Environ. Microbiol., 1997. **63**(11): p. 4377-4384.
230. Haes, A.J. and R.P. Van Duyne, *A Nanoscale Optical Biosensor: % Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(35): p. 10596-10604.
231. Arudra, et al., *Decomposition of Thimerosal and Dynamics of Thiosalicylic Acid Attachment on GaAs(001) Surface Observed with in Situ Photoluminescence*. Vol. 114, Columbus, OH, ETATS-UNIS: American Chemical Society. 6.
232. Moumanis, K., et al., *Aging and detergent washing effects of the surface of (001) and (110) GaAs passivated with hexadecanethiol*. Journal of Applied Physics, 2006. **100**(3): p. 34702-1.
233. Duplan, V., et al., *Specific immobilization of influenza A virus on GaAs (001) surface*. Journal of Biomedical Optics, 2009. **14**(5): p. 054042-6.
234. Guesdon, J., T. Ternynck, and S. Avrameas, *The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques*. J. Histochem. Cytochem., 1979. **27**(8): p. 1131-1139.
235. Kendall, C., I. Ionescu-Matiu, and G.R. Dreesman, *Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Journal of Immunological Methods, 1983. **56**(3): p. 329-339.
236. Clawson, A.R., *Guide to references on III-V semiconductor chemical etching*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2001. **31**: p. 1-438.
237. Yu, P.Y. and M. Cardona, *Fundamentals of Semiconductors- Physics and Materials Properties*. Vol. 4th edition. 2010: Springer. 460.
238. Gregory, M.M. and et al., *Electro-optic investigation of the surface trapping efficiency in n-alkanethiol SAM passivated GaAs(001)*. Nanotechnology. **22**(23): p. 235704.
239. Mainelis, G., et al., *Electrical charges on airborne microorganisms*. Journal of Aerosol Science, 2001. **32**(9): p. 1087-1110.
240. Horcas, I., et al., *WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology*. Review of Scientific Instruments, 2007. **78**(1): p. 013705-8.
241. Hlady, V., J.N. Lin, and J.D. Andrade, *Spatially resolved detection of antibody-antigen reaction on solid/liquid interface using total internal reflection excited antigen fluorescence and charge-coupled device detection*. Biosensors and Bioelectronics, 1990. **5**(4): p. 291-301.

242. Ai, H.U.A., et al., *Gelatin-glutaraldehyde cross-linking on silicone rubber to increase endothelial cell adhesion and growth* In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 2009. **38**(9): p. 487-492.
243. Longo, W.E., et al., *Preparation of hydrophilic albumin microspheres using polymeric dispersing agents*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1982. **71**(12): p. 1323-1328.
244. Trueba, F.J. and C.L. Woldringh, *Changes in cell diameter during the division cycle of Escherichia coli*. J. Bacteriol., 1980. **142**(3): p. 869-878.
245. Psennerl, R. and K. Schlott-Idl, *Trophic relationships between bacteria and protozoa in the hypolimnion of a meromictic mesostrophic lake*. Hydrobiologia, 1985. **121**(2): p. 111-120.
246. Elder, R.O., et al., *Correlation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(7): p. 2999-3003.
247. *Survival of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in Water*. Journal of Food Protection®, 1998. **61**: p. 662-667.
248. March, S.B. and S. Ratnam, *Sorbitol-MacConkey medium for detection of Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis*. J. Clin. Microbiol., 1986. **23**(5): p. 869-872.
249. Sanderson, M., et al., *Sensitivity of bacteriologic culture for detection of Escherichia coli O157:H7 in bovine feces*. J. Clin. Microbiol., 1995. **33**(10): p. 2616-2619.
250. Dubowski, J.J., *Quantum Dot Bio-Template for Rapid Detection of Pathogenic Substances*, in *Photon-Based Nanoscience and Nanobiotechnology*. 2006. p. 159-173.
251. Kim, C.K., et al., *Formation dynamics of hexadecanethiol self-assembled monolayers on (001) GaAs observed with photoluminescence and Fourier transform infrared spectroscopies*. Journal of Applied Physics, 2009. **106**(8): p. 083518.
252. Arudra, P., et al., *Decomposition of Thimerosal and Dynamics of Thiosalicylic Acid Attachment on GaAs(001) Surface Observed with in Situ Photoluminescence*. Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(32): p. 13657-13662.
253. Wieliczka, D.M., X.M. Ding, and J.J. Dubowski, *X-ray photoelectron spectroscopy study of self-assembled monolayers of alkanethiols on (001) GaAs*. J. Vac. Sci. Technol. A, 2006. **24**(5): p. 1756-1759.
254. Duplan, V., E. Frost, and J.J. Dubowski, *Antibody based architectures for in situ detection of Escherichia coli using a photoluminescence-based quantum semiconductor device*. Biosensors & Bioelectronics, 2011: p. submitted.
255. DuBois, B., et al., *HF etching of Si-Oxides and Si-Nitrides for surface micromachining* 2001. p. 6.
256. Evenson, L.J., *Legionnaires' disease*. Primary Care Update for OB/GYNS, 1998. **5**(6): p. 286-289.
257. McCoy, W.F., *Preventing Legionellosis*. 2005, London: International Water Association Publishing. 139.
258. Nandakumar, K., et al., *Visible laser and UV-A radiation impact on a PNP degrading Moraxella strain and its rpoS mutant*. Biotechnology and Bioengineering, 2006. **94**(4): p. 793-802.