THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : EEATS - Electronique, Electrotechnique, Automatique, Traitement du Signal
Spécialité : Optique et Radiofréquences
Unité de recherche : Centre de Radiofréquences, Optique et Micro-nanoélectronique des Alpes

Biocapteur bactérien pour la détection de la toxicité de l'eau par spectroscopie d'impédance

Bacterial biosensor for water toxicity detection using impedance spectroscopy

Présentée par :

Antoine RICO

Direction de thèse :

Pascal XAVIER PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES	Directeur de thèse
Elise GHIBAUDO PROFESSEURE DES UNIVERSITES, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES	Co-directrice de thèse
Leticia GIMENO-MONGE MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES	Co-encadrante de thèse

Rapporteurs :

Philippe LÉVÊQUE
DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS
Marie FRENEA-ROBIN
PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Claude Bernard Lyon 1

Thèse soutenue publiquement le **3 juin 2026**, devant le jury composé de :

Pascal XAVIER, PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes	Directeur de thèse
Elise GHIBAUDO, PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes	Co-directrice de thèse
Philippe LÉVÊQUE, DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS	Rapporteur
Marie FRENEA-ROBIN, PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteure
Alain SYLVESTRE, PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Grenoble INP - UGA	Président
Cécile DUCLAIROIR POC, PROFESSEURE DES UNIVERSITES, Université de Rouen Normandie	Examinatrice

Invités :

Leticia GIMENO-MONGE
MAITRESSE DE CONFERENCES, Université Grenoble Alpes

Résumé

Cette thèse présente le développement d'un dispositif dédié à la détection indirecte et rapide par des mesures spectroscopiques de la teneur en ions de milieux aqueux apportés par des bactéries. L'application visée est la conception d'un biocapteur de la toxicité de l'eau exploitant les bactéries comme sentinelles biologiques pour la surveillance des incidents chimiques. Pour y parvenir, deux prototypes ont été réalisés. Un premier intégrant des électrodes planaires en vis-à-vis et un deuxième composé de structures interdigitées sur un substrat de verre afin de maximiser l'interaction avec le milieu liquide et de viser un dispositif plus intégré permettant des mesures sur de plus petits volumes. Les biocapteurs impédancemétriques microbiens tirent parti des variations de propriétés diélectriques d'un milieu biologique en fonction de la fréquence d'excitation. Ces propriétés, dictées par la composition du milieu (eau, ions) et l'état des biorécepteurs, évoluent avec la viabilité de ces derniers. Cependant, les biocapteurs nécessitent généralement l'immobilisation des biorécepteurs via des traitements chimiques pour maximiser leur sensibilité, ce qui limite la durée de vie, la répétabilité et augmente leur impact écologique. Dans le but d'évaluer un seuil de pollution sans spécificité à un agent précis, nous proposons une approche non fonctionnalisée. Ce choix permet de surmonter ces contraintes matérielles tout en garantissant une simplicité technologique et une robustesse accrue. Plus spécifiquement, le principe de détection par mesure d'impédance repose sur l'hypothèse selon laquelle l'exposition aux polluants altère la perméabilité membranaire des bactéries, induisant un relargage ionique. Cette modification du nombre d'ions à l'extérieur de la bactérie est mesurable via la conductivité globale de la solution aqueuse. La mesure s'effectue après une suspension des bactéries dans un milieu peu conducteur. Une estimation du nombre de charges ramenées par les bactéries lors de la mise en suspension avec ce milieu est proposée. Ainsi la conductivité de la solution est maîtrisée pour des bactéries saines. Un modèle mathématique exploitant les équations de Maxwell-Wagner est utilisé pour corréler les variations de permittivité à la concentration et à l'état physiologique des bactéries. La plage de fréquences de mesure, s'étendant de 1 kHz à 30 MHz, a été spécifiquement choisie pour couvrir les phénomènes de relaxation α et β liés aux interfaces membranaires. Ce choix permet d'observer les signatures diélectriques des populations bactériennes tout en conservant la réponse électrochimique du milieu aqueux. Le traitement de ces données d'impédance s'appuie sur la méthode de Distribution des Temps de Relaxation. Dans cette approche, le signal complexe est décomposé afin d'isoler les processus électrochimiques. Ce modèle de traitement permet de discriminer les signatures temporelles propres au milieu de celles spécifiquement attribuées à la présence biologique. D'autre part, des tests expérimentaux ont permis de démontrer l'efficacité du biocapteur à travers la détection de $15\,\mu g/L$ d'un antiparasitaire (Ivermectine) et de $10\,\mu g/mL$ d'un antibiotique (Ampicilline). La comparaison des spectres d'impédance bruts avec les données traitées par DRT a finalement permis d'isoler et d'observer précisément les effets physiologiques de ces polluants. À l'avenir, l'élargissement des fréquences d'analyse permettra d'étudier encore plus finement les altérations de la paroi bactérienne. La conception d'un capteur intégré de faible volume basé sur des électrodes interdigitées planaire est une des pistes étudiées. De plus, le couplage de ce biocapteur avec des systèmes microfluidiques ouvrira la voie à une surveillance multimodal.

Abstract

This thesis focuses on the development of a device designed to enable rapid, indirect detection of ion concentration brought by bacteria in aqueous media using spectroscopic measurements. The targeted application is the design of a water toxicity biosensor, exploiting bacteria as biological chemical incident sentinels. For this purpose, two prototypes have been built. The first device consists of two electrodes in a parallel plate configuration ; the second one uses a surface interdigitated electrode configuration on a glass substrate, on the path to a more integrated device allowing smaller liquid volumes as well as higher interactions with the medium. Microbial biosensors based on impedance spectroscopy tap on changes in dielectric properties of biological media as a function of excitation frequencies. These properties are driven by the medium composition (water, ions) as well as the state of the bioreceptors, and will thus change with the viability of the latter. However, biosensors often need to immobilise bioreceptors through chemical treatments in order to maximise sensitivity, hence limiting their durability and repeatability while also increasing their own ecological impact. In this work we propose a non-functionalised approach for the purpose of evaluating a global pollution threshold, without precise pollutant specificity. This choice allows to overcome material constraints while guaranteeing technological simplicity and increasing robustness. More specifically, the detection principle using impedance measurements is based on the hypothesis that the membrane permeability of bacteria exposed to a pollutant will be altered, leading to an ionic release. This change in the number of ions outside of bacteria is measurable through the aqueous solution overall electrical conductivity. Measurements are performed after resuspension of bacteria in a weakly conductive medium. In these conditions, the conductivity for a solution containing healthy bacteria is controlled, subsequently allowing us to propose a theoretical estimation of the amount of charges brought by bacteria when resuspended. A mathematical model using Maxwell-Wagner equations is also developed to correlate variations in permittivity with bacterial concentration and physiological state. The frequency range, spanning between 1 kHz and 30 MHz, has been chosen to cover the α and β relaxation phenomena, linked to membrane interfaces. To discriminate between the temporal signatures of the aqueous medium and those coming from the presence of biological material in the solution, signal processing for impedance data relies on the Distribution of Relaxation Times (DRT) method. In this approach, the complex signal is decomposed in order to isolate the different involved electrochemical processes. . Furthermore, experimental tests have successfully shown the biosensor functionality by detecting realistic concentrations of $15\,\mu g/L$ of an anthelmintic (Ivermectin) and $15\,\mu g/mL$ of an antibiotic (Ampicillin). Comparison of raw impedance spectra with DRT-treated data has allowed us to isolate and observe the physiological effects of these pollutants.

For future work, increased frequency bandwidth will allow a finer study of bacterial cell wall alterations for high-conductive medium. The use of an integrated sensor based on planar interdigitated electrodes and needing smaller volumes will be one of the explored avenues. Additionally, the coupling of this biosensor with microfluidic systems will pave the way for a multimodal standalone robust water toxicity emergency detector.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude aux membres de mon jury. Merci à Philippe Leveque et Marie Frénéa-Robin d'avoir accepté la tâche de rapporter ce travail, ainsi qu'à Cécile Duclairoir-Poc et Alain Sylvestre pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer ces recherches. Vos remarques et vos discussions constructives ont grandement contribué à enrichir la portée de ce travail.

Mes remerciements les plus sincères vont ensuite à mes directeurs de thèse, Pascal Xavier et Elise Ghibaudo ainsi qu'à mon encadrante Leticia Gimeno. Merci pour votre confiance, votre disponibilité et votre soutien constant tout au long de ces années. Votre rigueur scientifique, vos conseils et votre patience face à mes doutes m'ont permis de mener à bien ce projet tout en découvrant la vie de chercheur.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du laboratoire CROMA. Un grand merci aux ingénieurs, techniciens et personnels administratifs, et plus particulièrement à Armelle Crouzet (IGE) et Nicolas Corrao (CROMA) pour leur aide précieuse lors des expérimentations et des prototypages.

Une pensée toute particulière est dédiée à mes collègues doctorants et post-doctorants, mes compagnons de bureau passés et présents, et notamment à : Antoine, Antonin, Augustina, Alexandra, Agnès, Chloé, Léo, Mathis, Mathilde et Thomas. Merci pour cette ambiance de travail unique, pour les discussions scientifiques passionnées, mais surtout pour les précieux moments de rires et de tensions autour de cartes qui ont rythmé ces trois années.

Enfin, je ne saurais assez remercier mes proches. Merci à mes amis, Paco, Jordy, Peysson, Dembele, Yoan, Baptiste, Victor, Lucas, Adrien, Thomas, Coline, clémence pour leur présence et pour m'avoir permis de m'évader quand cela était nécessaire.

Merci à toi, Luca, mon compagnon d'infortune, nos aventures nous ont liés et je suis content de te compter parmi mes amis.

Un immense merci à ma famille, Sylvie, Patrick, Alliaume, Pauline, Anaïs, Etienne, Adrien, Alison, Aloïs, et notammnt Rose, Jules, Gabin, Martin, Lucy, Elisa, Hugo, Arthur pour leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible et leur confiance aveugle, bien au-delà de la science.

Pour finir, une dédicace spéciale à Gaëlle, pour avoir partagé mon quotidien, supporté mes moments de stress et de rédaction intense, et pour avoir été mon pilier le plus solide à chaque étape de cette aventure. Merci d'être là.

Table des matières

Résumé i

Abstract iii

Remerciements v

Table des matières vii

Table des figures xi

Liste des tableaux xv

Notations et abréviations xvii

Introduction générale 1

1 Les biocapteurs et la mesure de pollution 3
1.1 Détection de la pollution . . . 4
1.1.1 La pollution de l'eau . . . 4
1.1.1.1 Définitions . . . 4
1.1.2 Le cas de la pollution incontrôlée . . . 6
1.1.3 Norme et réglementation . . . 6
1.1.3.1 Organisation Mondiale de la Santé . . . 6
1.1.3.2 Union Européenne . . . 7
1.1.3.3 Organisation internationale de normalisation (ISO) . . . 8
1.1.4 Méthodes actuelles . . . 8
1.1.4.1 Principe d'analyse . . . 8
1.1.4.2 Limites des méthodes . . . 11
1.2 Biocapteurs . . . 12
1.3 Biorécepteur . . . 13
1.3.1 Enzyme . . . 13
1.3.2 Anticorps . . . 14
1.3.3 ADN . . . 15
1.3.4 Phage . . . 16
1.3.5 Cellule . . . 17
1.3.5.1 Le cas des Eucaryotes . . . 19
1.3.5.2 Procaryotes . . . 20
1.4 Transducteurs . . . 21
1.4.1 Transducteurs optiques . . . 21
1.4.2 Transducteurs utilisant la masse . . . 22
1.4.3 Transducteurs électrochimiques . . . 23

1.4.3.1 Ampérométrie . . . 23
1.4.3.2 Potentiométrie . . . 24
1.4.3.3 Conductimétrie . . . 24
1.4.3.4 Impédancemétrie . . . 25
1.5 Positionnement de l'étude . . . 28
1.5.1 Positionnement dans l'état de l'art . . . 28
1.5.1.1 Détection de *Escherichia Coli* par capteur impédancemétrique . . . 28
1.5.1.2 Biocapteur impédancemétrique pour la détection de toxicité aquatique . . . 30
1.5.2 Cahier des charges . . . 32

2 La bactérie en tant que biorécepteur 35
2.1 Les bactéries du point de vue diélectrique . . . 36
2.1.1 Généralités sur les cellules procaryotes . . . 36
2.1.1.1 Les cellules procaryotes . . . 36
2.1.1.2 Les parois cellulaires . . . 37
2.1.1.3 Les canaux et les échanges ioniques . . . 38
2.1.2 La bactérie dans son milieu . . . 39
2.1.2.1 Modèle de Goldman Hodgkin Katz . . . 39
2.1.2.2 Potentiel Zêta . . . 41
2.1.2.3 Nombre de charges associées à une bactérie . . . 42
2.1.2.4 Nombre de charges au voisinage de la paroi d'une bactérie . . . 45
2.1.2.5 Dispersion électrique des matériaux biologiques . . . 45
2.1.3 Physiologie des populations bactériennes . . . 48
2.1.3.1 Scissiparité . . . 48
2.1.3.2 La croissance bactérienne . . . 48
2.1.3.3 Lien entre la concentration bactérienne et la densité optique . . . 50
2.1.3.4 La mort cellulaire . . . 50
2.2 Influence de l'environnement sur la physiologie bactérienne . . . 54
2.2.1 Description des effets des polluants . . . 54
2.2.1.1 Effet de l'Ampicilline . . . 54
2.2.1.2 Effet de l'Ivermectine . . . 55
2.2.2 Concentration Minimale Inhibitrice . . . 55
2.2.3 CMI de l'Ampicilline . . . 57
2.2.4 CMI de l'Ivermectine . . . 58
2.2.5 Biocompatibilité des dispositifs de test . . . 59
2.2.5.1 Biocompatibilité du cuivre et de l'étain . . . 60
2.2.5.2 Mode opératoire . . . 61
2.2.5.3 Résultat . . . 62

3 Impédancemétrie 63
3.1 Cas généraliste d'une mesure d'impédance en milieu aqueux . . . 64
3.2 Dispositif Physique . . . 65
3.2.1 Différents dispositifs de la littérature . . . 65
3.2.2 Dispositif mésoscopique . . . 67
3.2.2.1 Évaporation des liquides . . . 67
3.2.2.2 Tailles des dispositifs, fréquence d'étude et perturbation . . . 68
3.2.3 Dispositif sur verre . . . 70
3.2.3.1 Électrodes interdigitées . . . 70
3.2.3.2 Procédés sur substrat de verre . . . 72
3.3 Propriétés de transport électrique dans les milieux aqueux . . . 73

3.3.1 Approche électrochimique . . . 73
3.3.1.1 Réponse électrique en volume de la solution . . . 74
3.3.1.2 Réactions aux électrodes . . . 74
3.3.1.3 Adsorption aux électrodes . . . 75
3.3.1.4 Génération et recombinaison en vrac . . . 75
3.3.1.5 Diffusion . . . 76
3.3.1.6 Bilan fréquentiel . . . 76
3.3.2 Propriétés électriques des milieux aqueux ioniques . . . 77
3.3.2.1 Mobilité des ions . . . 77
3.3.2.2 Conductivité électrique et loi de Kohlrausch . . . 78
3.3.2.3 Formulation de la conductivité : cas de l'électrolyte (NaCl) . . . 78
3.4 Simulation du comportement électrique d'une bactérie . . . 82
3.4.1 Modèle et valeur . . . 82
3.4.2 Homogénéisation des mesures . . . 83
3.4.3 Analyse des résultats de simulation . . . 84
3.5 Analyse des données de mesure . . . 86
3.5.1 Le modèle Maxwell-Wagner . . . 86
3.5.2 Traitement des données par régression linéaire et non linéaire . . . 90
3.5.3 Distribution des temps de relaxation . . . 91
3.5.4 Les méthodes de résolution de la DRT . . . 93
3.5.5 Simulation de données impédancemétriques analysées par DRT . . . 94
3.5.6 Cas spécifique des parois bactériennes . . . 97
3.5.7 Utilisation de la DRT dans les mesures biologiques . . . 97

4 Analyse expérimentale **99**
4.1 Protocole de préparation bactérien . . . 100
4.2 Détection de bactéries E.coli dans des solutions de contrôle . . . 101
4.2.1 Analyse du module et de la phase de l'impédance . . . 101
4.2.2 Propriétés diélectriques . . . 104
4.2.3 Analyse par la méthode DRT . . . 106
4.3 Mesure de solutions polluées . . . 109
4.3.1 Pollution par l'Ampicilline . . . 109
4.3.1.1 Analyse par impédance et régression . . . 109
4.3.1.2 Analyse par la méthode DRT . . . 114
4.3.2 Pollution par l'Ivermectine . . . 116
4.3.2.1 Analyse par impédance et régression . . . 117
4.3.2.2 Analyse par la méthode DRT . . . 119
4.4 Cas du prototype intégrant des électrodes interdigitées . . . 122
4.4.1 Analyse par impédance et régression . . . 123
4.4.2 Analyse par DRT . . . 126

Conclusion générale **131**

Références bibliographiques **I**

Publications et conférences **XVIII**

A Résultat complémentaire de la CMI de L'Ivermectine sur *Escherichia coli* **XXI**

B Condition expérimentale **XXV**

C Complément de données sur l'étude des populations bactérienne au contact de l'Ampicilline **XXXI**

D Complément de données sur l'étude des populations bactérienne au contact de l'Ivermectine **XXXIX**

E Complément de mesure RC et de la DRT pour la détection bactérienne **XLVII**

F Complément de mesure RC et de la DRT pour la détection bactérienne sur Electrodes Interdigitées **LI**

G Comparaison d'utilisation des méthodes de détection de métaux lourds, antibiotique et pesticides dans l'eau **LV**

Table des figures

1.1 Classification des biocapteurs basés sur le type de transducteur [37]. 12
1.2 Structure d'un biocapteur à base d'enzyme pour la détection de métaux lourds [40]. 13
1.3 Structure d'un Anticorps [48]. 14
1.4 Structure d'un biocapteur basé sur l'ADN [58]. 15
1.5 Schémas illustrant un biocapteur impédancemétrique basé sur les phage T4. Figure tirée de [65]. 16
1.6 Organigramme de la spectroscopie diélectrique cellulaire et de ses applications associées dans le domaine de la biosurveillance, de l'analyse et de la caractérisation des cellules. Tiré de [71]. 18
1.7 Schémas généralisant l'utilisation des levures en tant que biocapteur. Les fonctions et buts de ces biocapteurs sont également énoncés. Tiré de [88]. 20
1.8 Une configuration d'un SPR sur puce. Tiré de [100]. 21
1.9 Schéma du système de mesure de l'HSA et mécanisme de détection du biocapteur à microélectrodes. Tiré de [103]. 22
1.10 Graphique 3D représentant la sensibilité des capteurs impédancemétriques en fonction du biorécepteur (X), de la limite de détection (Y), et de l'utilisation de fonctionnalisation de surface (Z). Les capteurs utilisant une micro-fluidique avancée sont représentés par des carrés, tandis que les autres sont représentés par des triangles. La couleur indique le biorécepteur utilisé : bordeaux pour ceux n'en utilisant aucun, rouge pour Phage, bleu pour ADN, vert pour Anticorps et orange pour Enzyme. 29
1.11 Schéma de principe du capteur multimodal intégré sur verre. 33

2.1 Arbre phylogénétique montrant les relations de parenté entre groupes du vivant. D'après Woese et al. (1990) [158] 36
2.2 Schéma simplifié d'une bactérie. Tiré de [159] 37
2.3 Comparaison par schémas des structures de la paroi cellulaire de bactéries à Gram positif et négatif. Tirée de [161]. 38
2.4 Schéma descriptif des parois d'une enveloppe bactérienne [163]. 39
2.5 Evolution du potentiel Zeta en fonction du pH pour une souche *Escherichia coli* K12 depuis [164] 41
2.6 Représentation d'un système bactérien colloïdal illustrant les propriétés de la double couche électrique de Gouy–Chapman–Stern (figure simplifiée d'après [165]) . . 42
2.7 Spectre de permittivité et de conductivité d'un milieu biologique en fonction de la fréquence mettant en évidence les dispersions α, β et γ. [124]. 46
2.8 Représentation de la répartition des charges autour d'une bactérie dans le régime de la dispersion alpha : (a) schéma d'une cellule immergée dans un milieu (électrolyte) comme une culture bactérienne, la membrane de cette cellule est considérée comme un diélectrique parfait ; et (b) la formation d'un dipôle dû au champ électrique appliqué. [71] 47

2.9 Représentation de la distribution des lignes de courant dans un système contenant deux cellules ; premièrement saine (vivantes) et deuxièmement dont les parois sont endommagées (Traitées) en fonction de fréquences (10^3,10^5,10^6 et 10^7 Hz) dans de l'eau désionisée. 47
2.10 Schéma montrant la fission des cellules procaryotes nommée scissiparité [169]. . 49
2.11 Courbe de la croissance bactérienne [171]. 50
2.12 La croissance de *Escherichia coli* en milieu LB. La densité optique à la longueur d'onde de $600\,nm$ (DO_{600}, triangles), la concentration cellulaire (croix). Tiré de [172]. 51
2.13 Schémas de principe de mesures diélectriques des solutions bactériennes. a) Cellule intacte. b) Cellule endommagée. c) Cellule intacte soumise à un champ électrique. d) Cellule endommagée soumise à un champ électrique. Tiré de [150] . . 53
2.14 structure de la paroi bactérienne avec effet de l'Ampicilline [204] 55
2.15 Mécanisme d'action schématisé de l'Ivermectine sur les canaux chlorures glutamate-dépendants des invertébrés. Tiré de [207] 56
2.16 Dynamique théorique de la population bactérienne dans le temps suite au traitement par polluant [208] 56
2.17 Évolution théorique de la concentration bactérienne à un temps fixe en fonction de la concentration en agent chimique 57
2.18 Résultat de la CMI de l'Ampicilline sur *Escherichia coli* à 24 heures. 58
2.19 Évolution de la densité optique dans le temps pour différentes solutions contenant un milieu de culture, *Escherichia coli* et des concentrations d'Ivermectine 59
2.20 Évolution de la concentration bactérienne via la densité optique à 12h après traitement par Ivermectine 60
2.21 Exemple d'utilisation des colorants SYTO9 et IP sur une cellule de comptage type Malassez 61

3.1 Géométrie du système global contenant le milieu aqueux et modèle électrique RC. 64
3.2 trois types de configuration d'électrodes de mesure. (a) deux, (b) trois et (c) quatre électrodes [214] 66
3.3 Champ électrique généré par des électrodes interdigitées. [220] 66
3.4 Schéma de principe du banc de test mésoscopique 67
3.5 Représentation théorique (a) et mesure pratique (b) de l'évaporation des liquides au cours du temps pour le dispositif mésoscopique 68
3.6 Caractérisation de la dépendance de la résistance R et de la capacité C d'un dispositif à électrodes parallèles face-à-face, en fonction de la surface S de chaque électrode (en mm^2) et pour trois espacements $h = 600\,\mu m$ (traits pleins), $800\,\mu m$ (tirets) et $1000\,\mu m$ (pointillés). Les zones 1%, 3% et 10% correspondent à la sensibilité de l'Agilent 4294A sur la mesure de capacité à 10 kHz. 69
3.7 Comparaison des caractéristiques des électrodes interdigitées : (a) distribution du champ électrique, (b) variation de la conductivité électrique selon l'espacement des peignes. 71
3.8 Évolution de la constante de cellule K_{cell} en fonction de quatre paramètres géométriques caractéristiques des électrodes interdigitées : **(a)** nombre total de doigts N (avec $L = 1000\,\mu m$, $W = 20\,\mu m$, $S = 30\,\mu m$) ; **(b)** longueur des doigts L (avec $N = 20$, $W = 20\,\mu m$, $S = 30\,\mu m$) ; **(c)** largeur des doigts W (avec $N = 20$, $L = 1000\,\mu m$, $S = 30\,\mu m$) ; **(d)** espacement inter-doigts S (avec $N = 20$, $L = 1000\,\mu m$, $W = 20\,\mu m$). On observe que K_{cell} décroît avec L et W, et croît avec N et S 72
3.9 Représentation schématique du processus de fabrication utilisé pour obtenir des électrodes sur verre par un procédé de photolithographie. Tirée de [154] 73

3.10 Analyse impédancemétrique de la conductivité du milieu : (a) variation avec la concentration des ions (Artemov et al. [242]), (b) variation avec la fréquence pour différentes concentrations de NaCl (Lima et al. [243]). 80
3.11 Représentation des conditions de modélisation de la bactérie en solution sous COMSOL®. D'après [245]. 82
3.12 Spectroscopie d'impédance obtenue par simulation COMSOL. **(a–b–c)** Comparaison entre une bactérie isolée dans un milieu aqueux et un milieu aqueux homogène, pour deux tailles de domaine de simulation : $4,6\,\mu m$ et $10\,\mu m$. **(e–f–g)** Simulation d'une bactérie seule pour deux états (vivante et traitée) dans un volume de $4\,\mu m$, selon deux configurations spatiales (transversale et longitudinale). **(a)** et **(e)** module de l'impédance en fonction de la fréquence ; **(b)** et **(f)** phase de l'impédance ; **(c)** et **(g)** zoom sur la phase dans la plage 10^5–$10^8\,Hz$. 85
3.13 Variation de permittivité sur le modèle homogénéisé d'une bactérie à 100KHz . . 88
3.14 Variation de permittivité de la solution en fonction de la fréquence et des propriété des parois cellulaires pour plusieurs concentrations bactériennes 89
3.15 Variation de permittivité en fonction de la fréquence et des propriétés des parois cellulaires pour 10^{-4}, 10^{-3} et $10^{-2} S/m$ de conductivité du milieu environnant . . 90
3.16 Évolution du nombre d'articles sur la distribution des temps de relaxation dans le cadre de la spectroscopie d'impédance de 1990 à 2015. Tiré de [250]. 91
3.17 Circuit Voigt équivalent 92
3.18 Comparaison des distributions de temps de relaxation issues de deux configurations de simulation COMSOL. 96

4.1 Évolutions du module de l'impédance et de la phase pour trois dilutions de bactéries (S3, S2 et S1 10^9, 10^8, 10^7 CFU/mL pour des solutions de bactéries vivantes et traitées par chaleur 101
4.2 Dynamique d'évolution des résistance et capacité R et C pour les trois concentrations bactériennes et deux états de contrôle (A) et (D) 103
4.3 Variation de permittivité réelle ε' pour 2 lots de solutions bactériennes Vivantes (A) et Traitées par chaleurs (D) à $10^8\,CFU/mL$ et $10^9\,CFU/mL$ 105
4.4 Résultat d'analyse de la DRT sur trois concentrations bactériennes pour des échantillons sains et traités par la chaleur 107
4.5 EIS des solutions bactériennes de contrôle (vivantes en vert et traitées par chaleur en rouge) pour les conditions de traitement à l'Ampicilline C1 ($10\,\mu g/mL$) en bleu, C2 ($20\,\mu g/mL$) en jaune et C3 ($100\,\mu g/mL$) en violet. 110
4.6 Résultat des régressions R et C pour tous les essais des solutions bactériennes de contrôle (vivantes et traitées par chaleur) et les concentrations d'Ampicilline C1 ($10\,\mu$g/mL), C2 ($20\,\mu$g/mL) et C3 ($100\,\mu$g/mL). 111
4.7 Résultat d'analyse de la DRT sur les concentrations C1,C2 et C3 d'Ampicilline. . 114
4.8 Distribution des temps de relaxation (τ) et des amplitudes (γ) pour les concentrations en Ampicilline C1, C2 et C3. 115
4.9 Distribution des temps de relaxation en fonction de la fréquence et taux d'apparition du deuxième temps de relaxation pour l'expérimentation Ampicilline pour $\lambda = 10^{-5}$ 116
4.10 EIS des solutions bactériennes de contrôle (vivantes et traitées par chaleur) pour les conditions de traitement à l'Ivermectine avec les concentrations C1 ($15\,\mu$g/L) et C2 ($45\,\mu$g/L). 117
4.11 Résultat des régressions effectuées pour R et C sur les spectres d'impédance des solutions bactériennes de contrôle (Vivantes et traitées par chaleur) et traitées à l'Ivermectine (aux concentrations C1 (15μg/L) et C2 (45μg/L)). 118
4.12 Résultat d'analyse de la DRT sur les concentrations C1 et C2 d'Ivermectine. . . . 120

4.13 Distributions des temps de relaxation (τ) et des amplitudes (γ) pour les concentrations C1 et C2 en Ivermectine . . . 121
4.14 Distributions des temps de relaxation en fonction de la fréquence et taux d'apparition du deuxième temps de relaxation pour l'expérimentation à base d'Ivermectine 122
4.15 EIS des solutions bactériennes de contrôle (Vivantes et traitées par chaleur) pour trois milieux aqueux de suspension bactérienne différents sur IDE. C1 en pointillé, C2 en tiret, C3 en plein. . . . 123
4.16 Valeurs de résistance et capacité obtenues par régression non linéaire pour chaque population bactérienne et chaque concentration de NaCl testées ainsi que pour le milieu sans NaCl . . . 125
4.17 Évolution des temps de relaxation pour les expérimentations de contrôle 'Vivantes' et 'Traitées par chaleur' pour les diverses solutions ioniques ($\lambda = 10^{-4}$). De gauche à droite et de haut en bas : Eau désionisée, 1 mM, 10 mM et 30 mM de NaCl. 128

A.1 Evolution de la Densité Optique à 600 *nm* dans le temps en fonction de la concentration d'Ivermectine mis au contact de *E.coli*. . . . XXII
A.2 Analyse de la Concentration Minimal d'Inhibtion (CMI) de l'Ivermectine sur *E.coli* au bout de 10 heures. . . . XXII

B.1 représentation d'une capacité idéale et d'un défaut de parallélisme . . . XXVI
B.2 Variation de la capacité en fonction de la pente du défaut de parallélisme pour un système à électrodes en vis-à-vis . . . XXVII
B.3 circuit équivalent avec C_d capacité du diélectrique ; R_s La résistance du milieu et Z_w l'impédance de warburg et R_p la résistance de polarisation depuis [267] . . . XXVIII

C.1 Paramètres C de la régression par population bactérienne dans le temps . . . XXXVII
C.2 Paramètres R de la régression par population bactérienne dans le temps . . . XXXVII

D.1 Paramètres C de la régression par population bactérienne dans le temps . . . XLIV

E.1 Tableau d'évolution des paramètres R et C pour les trois dilutions bactériennes et deux états de contrôle . . . XLVII

F.1 Évolution des temps de relaxation pour les expérimentations de contrôle 'Vivantes' et 'Traitées par chaleur' pour les diverses solutions ioniques ($\lambda = 10^{-5}$). De gauche à droite et de haut en bas : Eau désionisée, 1 mM, 10 mM et 30 mM de NaCl. LII

Liste des tableaux

1.1 Comparaison synthétique entre les recommandations de l'OMS, le cadre réglementaire de l'UE (et ses NQE) et les normes ISO. . . . 9
1.2 Comparaison des méthodes d'analyse des métaux . . . 10
1.3 Synthèse corrective des applications des biocapteurs (Paramètres enrichis) . . . 27
1.4 Études utilisant des biocapteurs impédancemétriques pour la détection de polluants en présence de bactéries avec et sans fonctionnalisation de surface. . . . 31

2.1 Tableau avec concentrations d'Ivermectine en μg/L lors de la CMI effectuée sur *Escherichia coli* . . . 59
2.2 Table d'analyse des bactéries comptées à l'aide de cellule de Neubauer . . . 62

3.1 Résumé des processus électrochimiques et circuits équivalents selon les plages de fréquences. . . . 76
3.2 Table des valeurs de mobilités pour les ions dans l'eau à 25°C. Tirée de [241]. . . 78
3.3 Valeurs théoriques de conductivité pour différentes concentrations de solutions aqueuses de $NaCl$. . . . 79
3.4 Valeurs de conductivité pratique et théorique pour différentes concentrations de solutions aqueuses de NaCl, issues des mesures de Lima, Artemov et avec notre dispositif mésoscopique. . . . 81
3.5 Représentation des constantes diélectriques (ε_r) et conductivités (σ) choisies pour les différentes simulations . . . 83
3.6 Variation du nombre d'éléments unitaires selon la taille x, pour un volume total de $25 \times 25 \times 0,8\,mm^3$ . . . 84
3.7 Équivalence diélectrique des trois couches de la membrane cellulaire. D'après [245]. 87
3.8 Conversion du nombre de bactérie à la fraction volumique θ pour un rayon cellulaire de $1\,\mu m$. . . . 89
3.9 Présence des éléments physiques dans chaque configuration simulée . . . 95
3.10 Représentation des éléments R,C choisis pour la simulation des bactéries dans un milieu selon [244] . . . 97

4.1 Analyse des propriétés électriques et ioniques de suspensions bactériennes extraites du paramètre ohmique R ($K_{cell} = 0,0128\,/cm$). . . . 104
4.2 Résultat moyen de la DRT pour $\lambda = 10^{-4}$. Les valeurs accompagnées d'un astérisque correspondent à une détection unique de ce pic sur l'ensemble des jeux de données. . . . 107
4.3 Résultat moyen de la DRT pour $\lambda = 10^{-5}$ . . . 108
4.4 Concentrations d'Ampicilline étudiées et populations bactériennes associées . . . 109
4.5 Concentrations d'Ivermectine étudiées et populations bactériennes associées . . . 116
4.6 Concentrations de NaCl étudiées et conductivité . . . 123
4.7 Données d'impédance $|Z|$ (Ω) et de phase φ (°) à 1 MHz pour les quatre milieux Eau DI, C1, C2, C3. . . . 124

C.1 Paramètres module et phase de l'impédance pour toutes les populations à 10KHz lié à l'Ampicilline XXXII
C.2 Paramètres *R*/*C* par condition à T=0 min. XXXIII
C.3 Paramètres *R*/*C* par condition à T=60 min. XXXIV
C.4 Paramètres *R*/*C* par condition à T=120 min. XXXV
C.5 Paramètres *R*/*C* par condition à T=180 min. XXXVI

D.1 Paramètres module et phase de l'impédance pour toutes les populations à 10KHz lié à l'Ivermectine XL
D.2 Paramètres *R*/*C* par condition à T=0 min. XLI
D.3 Paramètres *R*/*C* par condition à T=60 min. XLII
D.4 Paramètres *R*/*C* par condition à T=120 min. XLIII
D.5 Paramètres *R*/*C* par condition à T=180 min. XLIV

E.1 Évolution de l'écart-type sur la détection des différents pic de la DRT pour les mesures réalisées dans le cadre de la section 4.2. 0* lorsque le pic est présent sur une seule mesure. XLVIII

F.1 Paramètres *R*/*C* par condition pour les expérimentations sur IDE LI

G.1 Résumé des méthodes analytiques pour la détection des métaux lourds, antibiotiques et pesticides dans l'eau LVI

Notations et abréviations

AC	Alternating Current (Courant alternatif)
CNLS	Complex Non-linear Least Squares
CPE	Constant Phase Element (Élément à phase constante)
DRT	Distribution of Relaxation Times
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy
FEM	Finite Element Method (Méthode des éléments finis)
AAS	Atomic Absorption Spectrometry (Spectrométrie d'absorption atomique)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DCE	Directive-Cadre sur l'Eau
EPA	U.S. Environmental Protection Agency
ETAAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ISO	International Organization for Standardization
NQE	Norme de Qualité Environnementale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PNEC	Predicted No-Effect Concentration (Concentration sans effet prédictible)
SPE	Solid Phase Extraction
SPR	Surface Plasmon Resonance (Résonance Plasmonique de Surface)
UFC	Unité Formatrice de Colonie (ou CFU en anglais)
XRF	X-Ray Fluorescence Spectrometry

Introduction générale

Aujourd'hui, les contaminations environnementales ont d'autant de sources qu'il existe d'industries. Qu'elles résultent d'accidents imprévus ou de mauvaises pratiques systémiques, ces pollutions affectent durablement nos écosystèmes. Les eaux de rivières, qui sont des ressources naturelles vitales pour la santé de la biodiversité, sont particulièrement sensibles à ces pollutions. Or, les méthodes actuelles de détection des pollutions des eaux préconisées par nos institutions impliquent des infrastructures importantes et nécessitent des pré-traitements ainsi que tout un ensemble de procédés délicats qui peuvent s'étaler sur plusieurs dizaines d'heures ou même plusieurs jours. Il serait donc intéressant de disposer de capteurs de toxicité aquatique qui soient rapides, robustes et à faibles coûts.

Parmi les technologies modernes proposées pour ce type de détection, les biocapteurs commerciaux utilisent le changement des propriétés d'éléments biologiques mesurées par voie électrique ou optique.

Cependant, ces outils peuvent être lents, avec des temps d'analyse supérieurs à la journée.

Une alternative réside dans le développement de biocapteurs impédancemétriques non fonctionnalisés, capables d'évaluer les propriétés diélectriques du milieu, qui sont corrélées à la viabilité cellulaire sur des temps courts, pouvant être compris entre 20 et 60 minutes. Ces systèmes exploitent des architectures d'électrodes planaires en vis-à-vis ou des structures interdigitées. Ils peuvent intégrer des réseaux microfluidiques pour maximiser l'interaction avec le milieu liquide. L'absence de fonctionnalisation de surface offre des avantages déterminants. Elle simplifie drastiquement le processus de fabrication, réduit les coûts de production et accroît la durabilité des capteurs en s'affranchissant de biorécepteurs fragiles (anticorps, aptamères). Elle permet d'envisager des dispositifs robustes, particulièrement adaptés à la surveillance d'incidents chimiques en environnement aqueux. Cette approche constitue ainsi un compromis entre une simplicité technologique permettant une rapidité de réponse et une certaine sensibilité pour la surveillance de la toxicité aquatique.

Nos recherches au sein du laboratoire CROMA visent à développer une plate-forme dédiée à la manipulation des bactéries de type L1 pour démontrer la possibilité d'une détection de toxicité aquatique rapide. Nous nous basons pour cela sur l'hypothèse d'une atteinte à la perméabilité membranaire des bactéries lors du contact avec le polluant dans le milieu aqueux les entourant, et d'une modification de la conductivité globale du milieu.

Ce manuscrit présente nos travaux sur cette thématique.

Le premier chapitre aborde la pollution de l'eau, ainsi que les normes et les réglementations qui lui sont associées. Nous y détaillons les méthodes actuellement mises en place, et présentons les biocapteurs, composés d'un biorécepteur et d'un transducteur. Ce chapitre expose ensuite les travaux expérimentaux utilisant des bactéries comme biorécepteurs et ceux qui utilisent de l'impédancemétrie comme méthode de transduction.

Le second chapitre propose un approfondissement de la composition et du comportement des cellules bactériennes. Les cellules sont étudiées selon leur cycle de vie et leur composition mais aussi à travers l'influence de l'environnement sur la physiologie bactérienne.

Au sein du troisième chapitre, l'accent est mis sur les fondements de l'impédancemétrie appliquée aux milieux aqueux. Nous y décrivons les mécanismes physico-chimiques, tels que la polarisation et la diffusion aux interfaces d'électrodes planaires et interdigitées et nous les confrontons à des modèles théoriques sur solutions salines. L'étude se poursuit par des simulations par éléments finis exploitant les équations de Maxwell-Wagner pour corréler les variations de permittivité à la concentration et à l'état physiologique des bactéries. Les simulations par éléments finis du comportement électrique lié à notre hypothèse de travail sont ensuite exposées pour approfondir le traitement de ces simulations par la Distribution des Temps de Relaxation (DRT). Ce chapitre se conclut sur l'application de la DRT, méthode d'analyse de données permettant de discriminer les signatures temporelles propres au milieu de celles attribuées aux éléments biologiques.

Le quatrième et dernier chapitre est axé sur les résultats expérimentaux obtenus pendant cette thèse. Premièrement, nous proposons les résultats d'expérimentations ainsi que le traitement de données sur des populations bactériennes témoins (saines et traitées par chaleur). L'analyse de ces données combine l'étude spectrale de l'impédance, l'extraction de paramètres par régression et l'usage de la DRT, tout en intégrant une étude de la conductivité résiduelle. Deuxièmement, en nous basant sur les analyses précédentes, nous présentons les expérimentations sur des populations bactériennes exposées à un antibiotique (l'Ampicilline) et un anti-parasitaire (l'Ivermectin). La différentiation de l'effet de ces molécules reposera sur la même approche multiparamétrique, de la spectroscopie d'impédance à l'analyse par DRT. Finalement, un prototype de capteur intégré sur substrat de verre est utilisé pour étudier la différenciation de populations bactériennes via leur signature électrophysiologique. Cette analyse est réalisée en fonction des propriétés du milieu aqueux dans lequel les microorganismes sont mis en suspension. Une conclusion sur ce travail et sur les résultats qu'il a produits est donnée en fin de manuscrit.

1

Les biocapteurs et la mesure de pollution

Ce chapitre dresse un état de l'art du contrôle de la qualité de l'eau et souligne les limites spécifiques et logistiques des méthodes actuelles face aux besoins de surveillance in situ. Les normes et réglementations de l'OMS, de l'Europe et de la France y sont abordées. En fin de chapitre, un état de l'art sur les biocapteurs est détaillé. Ils apparaissent comme une alternative pertinente aux méthodes utilisées actuellement pour la détection de la toxicité aquatique et offrent une grande diversité d'architectures selon le couplage biorécepteur-transducteur choisi.

1.1 Détection de la pollution

Dans cette section, nous définirons la pollution de l'eau en la contextualisant et en proposant son étude diachronique, c'est-à-dire l'évolution de son sens dans le temps. Nous aborderons ensuite les études qui lui sont associées. Finalement, nous interrogerons les normes et les techniques actuellement préconisées.

1.1.1 La pollution de l'eau

1.1.1.1 Définitions

La pollution désigne l'introduction de substances ou de déchets, provenant généralement d'activités humaines telles que les activités domestiques ou industrielles, dans un environnement initialement propre ou naturel. Ces substances polluantes peuvent être synthétiques, naturelles ou même radioactives, et elles perturbent les écosystèmes ainsi que la santé humaine lorsqu'elles atteignent un certain seuil de concentration ou d'exposition. Par exemple, les déchets industriels et ménagers contiennent fréquemment des métaux lourds, pesticides et antibiotiques. Ces substances chimiques sont particulièrement dangereuses et leur présence dans l'eau et les sols est régulièrement étudiée dans la littérature scientifique [1]. La surveillance des rivières par des relevés a augmenté significativement en raison des préoccupations croissantes liées à la pollution chimique provenant de rejets industriels et agricoles, affectant directement la qualité des ressources hydriques [2]. Cependant, toutes les formes de pollution ne sont pas d'origine anthropique. En effet, certaines pollutions sont naturelles, comme les éruptions volcaniques, les incendies de forêt ou encore l'érosion naturelle des sols, qui relâchent également des substances potentiellement nuisibles dans l'environnement.

Au début du XXe siècle, les travaux scientifiques sur l'eau de rivière portent surtout sur la qualité sanitaire (germes pathogènes, oxygène dissous) et sur quelques substances toxiques connues (par ex. plomb, arsenic). Les termes employés restent génériques – on parle d'eaux insalubres, d'impuretés chimiques ou de métaux toxiques. Les méthodes de détection sont rudimentaires (tests chimiques par précipitation, indicateurs colorés). Par exemple, en 1948, on utilise un réactif colorimétrique comme la dithizone pour repérer sur le terrain des traces de métaux lourds (Cu, Pb, Zn) jusqu'à $0,01$ ppm [3]. Après la seconde Guerre Mondiale, l'industrialisation et l'utilisation massive de pesticides transforment les préoccupations environnementales. Le mot « pesticide » entre dans le vocabulaire scientifique courant entre les années 1950 et 1960. Parallèlement, le terme « métaux lourds » se popularise pour désigner des éléments comme le mercure, le plomb ou le cadmium dans l'eau. Des événements marquants (ex : pollution au mercure de Minamata, Japon, 1956) sensibilisent la communauté scientifique. Durant cette période, de nouvelles techniques de détection émergent. En 1955, Alan Walsh introduit la spectrométrie d'absorption atomique (AAS), qui devient un outil standard pour analyser la concentration de nombreux métaux sans recourir aux méthodes chimiques traditionnelles [4].

Grâce à cette nouvelles technique, des études sur les Grands Lacs ont montré dès les années 1980 que de multiples substances (métaux, organochlorés, etc.) coexistent à faibles doses, s'accumulent dans la chaîne alimentaire et interagissent [5].
L'évolution des mots-clés décrite ci-dessus ou l'apparition de ces mots dans notre vocabulaire est intimement liée à la fois aux préoccupations environnementales de chaque époque et aux avancées technologiques disponibles, le tout sur fond de croissance de la recherche scientifique. De manière générale, la production scientifique mondiale globale a suivi une croissance exponentielle tout au long du XXe siècle et jusqu'à aujourd'hui [6] . Le nombre d'articles et la terminologie liés aux polluants de l'eau ont suivi cette tendance. Cependant, on observe des accélérations ponctuelles liées à l'actualité environnementale. Par exemple, l'apparition du mot « pesticide » dans la littéra-

ture coïncide avec l'essor de l'agrochimie d'après-guerre, puis son usage grimpe en flèche dans les années 1960-1970. De même, les termes liés aux métaux lourds deviennent courants et le resteront lorsque les réglementations anti-plomb ou anti-mercure voient le jour dans les années 1970.

Depuis le nouveau millénaire, la part des publications sur les micropolluants [1] organiques (pesticides modernes, produits pharmaceutiques comme les antibiotiques, perturbateurs endocriniens ...) croît encore plus vite que la tendance moyenne. Une analyse bibliométrique [6] montre qu'entre 2000 et 2019, sur l'ensemble des articles concernant les contaminants émergents plus de 70% ont été publiés après 2015 [6]. Ceci traduit l'intérêt de plus en plus important de la recherche sur ces sujets et l'émergence de nouvelles préoccupations comme la contamination des eaux par les résidus d'antibiotiques. Ainsi, l'histoire des mots-clés du lexique lié à la détection des polluants dans l'eau de rivière est le miroir d'un siècle de transformations scientifiques et sociétales en matière d'environnement.

Nous allons maintenant citer quelques exemples de publications actuelles concernant la détection environnementale de polluants/micro polluants dans le monde. La pollution environnementale, en particulier la contamination chimique des ressources hydriques, constitue un enjeu majeur à l'échelle mondiale. Parmi les contaminants préoccupants issus des activités industrielles et domestiques, les métaux lourds tels que le cuivre, le cadmium, le plomb, le zinc, le chrome ou le nickel sont fréquemment détectés. Ces métaux, rejetés par diverses industries telles que la métallurgie et la chimie, ont été largement étudiés dans le monde comme l'illustrent des exemples en Turquie et aux USA. [1, 7, 8]. L'évaluation des métaux lourds repose principalement sur des analyses de laboratoire qui sont coûteuses et peu déployables in situ à bas niveaux (ng/L), ce qui souligne l'intérêt de méthodes plus simples et de capteurs de terrain.

Par ailleurs, la contamination par les pesticides constitue un problème croissant sur tous les continents [9]. Aux États-Unis, les détections de pesticides dans les ressources hydriques ont considérablement augmenté en raison de leur utilisation intensive en agriculture [10]. Cette tendance inquiétante est également observée en Europe, où malgré une réglementation stricte, des pesticides tels que le glyphosate continuent de contaminer les eaux de surface et souterraines [11]. En Afrique, des niveaux alarmants de pesticides ont été rapportés, soulignant l'ampleur mondiale du problème [12].

Les antibiotiques constituent une autre classe émergente de polluants de plus en plus présents dans les milieux aquatiques, à cause des rejets provenant des secteurs hospitaliers, agricoles et domestiques. Ces dernières années, leur présence et leur concentration dans les eaux de surface ont significativement augmenté, entraînant des risques environnementaux et sanitaires majeurs, tels que l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques [13, 14]. Les techniques traditionnelles de traitement des eaux usées sont à ce jour insuffisantes face à l'augmentation des concentrations et des résistances dans les flux traités.

Finalement, face à cette évolution préoccupante des polluants tels que les métaux lourds, les pesticides et les antibiotiques à travers le monde, il devient crucial de renforcer la surveillance environnementale et d'encourager le développement et l'application de technologies innovantes et efficaces, capables de répondre durablement aux défis posés par ces contaminations.

1. Substance d'origine anthropique ou naturelle, présente dans l'environnement à des concentrations inférieures au $\mu g/L$

1.1.2 Le cas de la pollution incontrôlée

Les accidents chimiques constituent une source majeure de pollution ponctuelle avec des impacts potentiellement graves et durables sur l'environnement et la santé publique. Un accident chimique survient lorsqu'une substance toxique est libérée de manière incontrôlée dans l'environnement suite à une défaillance technique, un incident industriel ou un événement naturel extrême. Ces incidents exigent des temps de détection rapides et précis afin de minimiser les dommages environnementaux et sanitaires. L'accident industriel de Lubrizol à Rouen en 2019 illustre ce type d'évènement car des retards et des difficultés dans la détection ont eu des conséquences non seulement sur la gestion immédiate des populations et des écosystèmes mais aussi sur le suivi à long terme des impacts environnementaux [15].

La surveillance des polluants spécifiques, notamment ceux d'origine médicamenteuse ou vétérinaire comme les antibiotiques et les antiparasitaires, est également devenue particulièrement critique. En France, la présence des antibiotiques dans les ressources en eau reflète directement la consommation humaine et vétérinaire croissante de ces substances [16]. Par ailleurs, la détection d'antiparasitaires, comme l'Ivermectine, qui sont largement utilisés en médecine vétérinaire, suscite une inquiétude particulière du fait de leurs effets potentiels sur les écosystèmes aquatiques. Des études ont révélé sa présence dans les cours d'eau et les sédiments en zones agricoles et d'élevage. Par exemple, l'Ivermectine a été retrouvée dans des sédiments de rivières proches d'exploitations bovines au Panama [17] ainsi que dans des exploitations piscicoles, notamment des élevages de saumon, où elle peut atteindre des quantités alarmantes de l'ordre de plusieurs nano grammes par gramme dans des sédiments et jusqu'à $5\,\mu g/L$ dans des prélèvement d'eau [18-20]. Il convient toutefois de distinguer la pollution, qui définit la présence d'une substance étrangère dans un milieu à des concentrations anormalement supérieures à un état non impacté, de la toxicité, qui caractérise la capacité intrinsèque de ce polluant à altérer les fonctions biologiques des organismes exposés. Ainsi, si la détection quantifie le niveau de contamination, l'évaluation de la toxicité permet de déterminer le risque réel encouru par l'écosystème.

Finalement, la prévention et la gestion efficace des accidents chimiques et autres contaminations incontrôlées nécessitent des capacités de détection rapide (sous le seuil de l'heure) et une meilleure compréhension des seuils d'alerte, afin d'atténuer rapidement leurs effets potentiellement dévastateurs sur les écosystèmes et la santé humaine.

1.1.3 Norme et réglementation

La contamination des eaux de surface et des eaux usées par des résidus de médicaments (antibiotiques, antiparasitaires) soulève des préoccupations sanitaires et environnementales croissantes comme nous l'avons explicité précédemment.

Cette section propose un aperçu des approches de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), de l'Union Européenne (UE) (y compris les Normes de Qualité Environnementale, NQE), ainsi que des standards ISO (International Organization for Standardization). Pour finir, le tableau 1.1 permet de synthétiser et de comparer ces informations.

1.1.3.1 Organisation Mondiale de la Santé

L'OMS émet des lignes directrices qui influencent les politiques nationales. En 2024, l'OMS a publié pour la première fois des orientations spécifiques visant à limiter la pollution des eaux résiduaires (effluents industriels) par les antibiotiques suite à leur fabrication [21]. Ces orientations introduisent des valeurs cibles basées sur les concentrations sans effet prédictible (PNEC – Predicted No-Effect Concentration) à ne pas dépasser dans les rejets d'eaux usées de fabrication d'antibiotiques. Deux types de PNEC sont distingués. Premièrement, le $PNEC_{res}$ correspond à la concentration ne favorisant pas l'émergence ou la propagation de résistance bactérienne. Deuxièmement, le $PNEC_{eco}$ correspond à la concentration sans effet nocif sur l'écosystème. Par exemple,

pour un antibiotique donné, la $PNEC_{res}$ correspond au seuil en dessous duquel la pression de sélection de bactéries résistantes est négligeable, tandis que la $PNEC_{eco}$ est le seuil protégeant la faune et la flore aquatiques. Ces valeurs, exprimées en $\mu g/L$ ou ng/L selon les substances, sont de l'ordre du nanogramme par litre pour les antibiotiques les plus puissants. Bien que ces recommandations de l'OMS ne soient pas juridiquement contraignantes, l'objectif est qu'elles soient adoptées rapidement et largement par les autorités nationales et régionales.

Dans ses guides techniques sur la réutilisation sécuritaire des eaux usées en agriculture et aquaculture, l'OMS recommande de contrôler certains paramètres chimiques (métaux lourds) pour protéger les sols, les cultures et la chaîne alimentaire, en s'appuyant souvent sur les normes établies par d'autres organismes (FAO[2], autorités régionales, etc.). Néanmoins, l'OMS s'appuie largement sur des standards internationaux existants (tels que ceux de l'EPA[3] ou de l'UE) et promeut des bonnes pratiques plutôt que de fixer ses propres limites chiffrées pour les eaux de surface.

1.1.3.2 Union Européenne

L'Union Européenne dispose d'un cadre réglementaire ambitieux pour la protection des eaux de surface, principalement à travers la Directive-Cadre sur l'Eau (DCE, 2008/105/CE). La Directive 2013/39/UE modifiée [22] établit des Normes de Qualité Environnementale (NQE) pour un certain nombre de substances prioritaires présentant un risque significatif pour le milieu aquatique. Les Normes de Qualité Environnementale (NQE) désignent plus précisément les valeurs numériques limites (ou "de référence") de concentrations à ne pas dépasser, définies par l'UE pour juger de la qualité chimique des eaux de surface.

Une NQE est généralement dérivée d'études de toxicité écologique en appliquant des facteurs de sécurité afin de protéger les organismes aquatiques les plus sensibles.

Par exemple, si un antibiotique présente un CE_{50} (concentration effective pour laquelle on observe 50% d'un effet donné par rapport à son maximum) de $\sim 100\,\mu g/L$ sur la croissance d'algues et de $\sim 10\,\mu g/L$ sur la reproduction de crustacés, dans ce cas, on utilisera la donnée la plus critique ($\sim 10\,\mu g/L$). On peut également appliquer un coefficient de sécurité qui peut aller jusqu'à 1000 pour établir par exemple une NQE de l'ordre de $\sim 10\,ng/L$ visant à prévenir tout effet chronique [23].

Ce type de calcul a été réalisé pour chaque substance prioritaire. Elles concernent 45 substances ou groupes de substances listés comme prioritaires, incluant plusieurs métaux lourds et de nombreux pesticides.

Chaque NQE est généralement déclinée selon deux valeurs. La première est une concentration moyenne annuelle (NQE-MA, protégeant des effets d'une exposition chronique). La deuxième est une concentration maximale admissible (NQE-CMA, pour prévenir les effets aigus de courts pics de pollution). Par exemple, concernant le pesticide Atrazine, la NQE européenne est de $0,6\,\mu g/L$ en moyenne annuelle et de $2\,\mu g/L$ au maximum sur un court-terme [22].

De plus, la directive 2013/39/UE a introduit un mécanisme de liste de surveillance (Watch List) pour les micropolluants émergents. Les premiers arrêtés de liste de surveillance ont intégré plusieurs produits pharmaceutiques. Par exemple, la décision 2015/495/UE [24] a inscrit un groupe d'antibiotiques macrolides (érythromycine, clarithromycine, azithromycine). Ces substances n'avaient pas encore de NQE réglementaire, mais les États membres devaient les surveiller pendant plusieurs années. Par la suite, la 2ème liste de surveillance (2018) [25] a inclus d'autres antibiotiques d'usage courant (comme l'Amoxicilline et la Ciprofloxacine). En 2022 la Clindamycine et l'Ofloxacine (deux antibiotiques) ont entre autres été ajoutés à la liste de surveillance [26]. De manière analogue en 2025 à été ajouté l'Avermectine, un antiparasitaire [27]. L'Avermectine est la famille de molécules antiparasitaires naturelles produites par *Streptomyces avermitilis*, tan-

2. Food and Agriculture Organization of the United Nations
3. U.S. Environmental Protection Agency

dis que l'Ivermectine est un dérivé synthétique de cette famille. Ce sont des agent ayant le même spectre d'action , mais l'Ivermectine est utilisée en pratique vétérinaire et médicale.

Ces efforts traduisent la volonté de l'UE de combler le retard réglementaire sur les résidus chimiques, bien qu'aucune NQE définitive pour un antibiotique n'existe encore (au 1er trimestre 2025).

1.1.3.3 Organisation internationale de normalisation (ISO)

Les normes ISO (Organisation internationale de normalisation) relatives à l'eau fournissent un référentiel méthodologique international pour l'échantillonnage et l'analyse des contaminants. l'ISO publie des normes techniques qui définissent comment mesurer un paramètre dans l'eau de manière fiable, ce qui est complémentaire aux normes quantitatives (telles que les NQE). En matière d'antibiotiques et d'antiparasitaires, l'ISO a développé récemment des méthodes spécifiques. Par exemple, la norme ISO 21676 :2018 [28] préconise la méthode HPLC-MS/MS (chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectroscopie de masse) pour détecter des ingrédients pharmaceutiques actifs dans l'eau. Pour les pesticides, la norme ISO 6468 :1996 [29] indique l'utilisation de la méthode CPG (chromatographie en phase gazeuse après extraction liquide-liquide). Concernant les métaux lourds, les normes ISO les plus utilisées sont celles relatives à la spectrométrie atomique. La série ISO 17294 [30] traite de l'application de l'ICP-MS (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif) pour la mesure d'une trentaine d'éléments (As, Cd, Pb, Hg, etc.) dans les eaux. Les normes ISO, qui évoluent, permettent de fixer des méthodes de mesure pour chaque élément.

Le tableau 1.1 propose une synthèse des cadres de référence mobilisés dans cette partie. Ce tableau compare les organismes tels que l'OMS et l'UE en incluant les NQE et les normes ISO. La comparaison porte sur la portée juridique, les polluants visés, les normes et valeurs de référence ainsi que les méthodes de mesure. Cette mise en regard permet d'identifier à quel niveau se situe chaque exigence (conseil, obligation, méthode) et d'orienter à la fois le choix des techniques analytiques et l'interprétation réglementaire des résultats.

1.1.4 Méthodes actuelles

Les méthodes de détection des polluants dans l'eau se divisent généralement en deux catégories principales : chromatographiques et non chromatographiques. Les méthodes chromatographiques, telles que la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie liquide (LC) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) nécessitent la séparation préalable des molécules. Ces techniques reposent sur l'injection d'échantillons dans une colonne où les analytes sont séparés en fonction de leurs propriétés physiques ou chimiques (polarité, volatilité, interactions avec la phase stationnaire). Chaque composé est ainsi détecté à un temps précis, appelé « temps de rétention », permettant leur identification et leur quantification précises, surtout quand elles sont couplées à une spectrométrie de masse (GC-MS ou LC-MS/MS). À l'inverse, les méthodes non chromatographiques ne réalisent pas cette séparation physique préalable des composants. Parmi ces dernières, on trouve les spectroscopies atomiques (ICP-MS, spectrométrie d'absorption atomique, XRF). Ces méthodes détectent directement des éléments spécifiques en mesurant des signaux caractéristiques (spectres atomiques, radioactivité gamma). Elles sont généralement plus rapides mais peuvent parfois souffrir d'un manque de spécificité ou d'interférences accrues comparativement aux techniques chromatographiques.

1.1.4.1 Principe d'analyse

Les méthodes analytiques choisies dépendent largement du type de polluant à mesurer : métaux lourds, antibiotiques, pesticides ou antiparasitaires. Pour les métaux lourds, l'ICP-MS est

Aspect	OMS	UE (et NQE)	ISO
Portée juridique	Lignes directrices sans caractère contraignant. Orientations principalement centrées sur la santé publique mondiale et l'eau résiduaire[21].	Cadre juridiquement contraignant pour les États membres via la *Directive-cadre sur l'eau (DCE)* et ses directives filles, telles que la *Directive 2013/39/UE* [22] et les décisions d'exécution établissant les listes de surveillance [24-27].	Normes techniques internationales volontaires (non contraignantes) adoptées pour l'harmonisation des méthodes de mesure et la comparabilité des données.
Polluants visés	Historiquement, substances chimiques et pathogènes pour l'eau potable. Émergence de préoccupations sur les résidus d'antibiotiques et antiparasitaires dans l'environnement.	*Substances prioritaires* (pesticides, métaux lourds, solvants, etc.). Liste de surveillance pour les *polluants émergents* (hormones, antibiotiques, etc.) [24-27].	Couvre tout type de polluant selon les besoins (pesticides, pharmaceutiques, métaux lourds, etc.).
Normes ou valeurs de référence	Pas de normes globales contraignantes pour les *eaux de surface ou usées*. Valeurs guides OMS surtout pour l'eau résiduaire [21]. Recommandations récentes pour les rejets d'antibiotiques (PNEC).	*Normes de Qualité Environnementale (NQE)* imposées pour 45 substances prioritaires (pesticides, métaux lourds, produits chimiques, etc.) [23]. Mécanisme de listes de surveillance pour évaluer d'autres substances (dont antibiotiques) [24, 27].	Ne fixe pas de seuil réglementaire, mais fournit des normes de méthode de mesure.
Méthodes de mesure	Ne prescrit pas formellement de méthodes uniques.	Libre choix, mais exigences de performances (sensibilité, incertitude). Directives techniques sur la qualité de mesure.	Publication de normes (p. ex. *ISO 21676 :2018* [28] pour les pharmaceutiques, *ISO 6468 :1996* [29] pour pesticides, *ISO 17294-2 :2023* [30] pour métaux).

TABLEAU 1.1 – *Comparaison synthétique entre les recommandations de l'OMS, le cadre réglementaire de l'UE (et ses NQE) et les normes ISO.*

actuellement la méthode de référence grâce à sa sensibilité extrême (ng/L) et sa capacité multi-élémentaire rapide [31]. La spectrométrie d'absorption atomique classique (AAS) reste également très utilisée pour ces métaux à des concentrations plus élevées. La spectroscopie d'absorption atomique électrothermique (ETAAS) apporte une sensibilité supérieure à l'AAS classique pour les éléments comme le plomb ou le cadmium [32]. Pour certains métaux, des approches alternatives comme la fluorescence atomique (Atomic Fluorescence Spectroscopy) ou la spectrométrie de fluorescence X (X-Ray Fluorescence Spectrometry, XRF) sont parfois utilisées sur site pour des mesures rapides et semi-quantitatives [33]. Un résumé sur la sensibilité, le temps de mesure et le coût d'utilisation des ces méthodes est proposé dans le tableau 1.2.

Méthode	**Principe**	**Sensibilité**	**Temps d'analyse**	**Coût investissement**	**Impact de la mesure**
AAS (Flamme)	Flamme qui atomise l'échantillon, analyse par absorption de lumière	ppm, ppb	Secondes	qqs dizaine de k€	Brûle l'échantillon, émissions gazeuses
ETAAS (Four graphite)	Atomisation par chauffe sans flamme, analyse par absorption lumineuse	ppb, ppt	minutes	qqs dizaine de k€	Nécessite chauffage intense, production de gaz
ICP-MS (Plasma)	Plasma qui ionise l'échantillon, séparation par masse	ppt, ppq	minutes	qqs centaine de k€	Gaz plasma à haute température, peut nécessiter des produits chimiques
Neutron Activation Analysis (NAA)	Irradiation de l'échantillon par des neutrons, mesure des rayons gamma émis	ppt, ppq	minutes à heures	qqs centaine de k€	Nécessite un réacteur nucléaire, radioactivité résiduelle
X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF)	Excitation des atomes par rayons X, émission de fluorescence mesurée	ppm, ppb	secondes	qqs dizaine à centaine de k€	Méthode non destructive, peu d'impact environnemental
Atomic Fluorescence Spectroscopy (AFS)	Excitation des atomes par une source lumineuse, détection de la fluorescence émise	ppb, ppt	minutes	qqs dizaine de k€	Peut nécessiter des gaz spéciaux et des produits chimiques

TABLEAU 1.2 – *Comparaison des méthodes d'analyse des métaux*

Concernant les polluants organiques, comme les antibiotiques et antiparasitaires, les méthodes chromatographiques utilisées pour l'étape d'extraction sont également incontournables pour l'étape d'analyse. L'HPLC-MS/MS est particulièrement efficace pour détecter les antibiotiques à très faible concentration dans les eaux de surface ou usées, grâce à une excellente sélectivité et à des limites de quantification de l'ordre du ng/L. Pour les pesticides, les techniques GC-MS ou LC-MS sont choisies selon la volatilité et la polarité du composé. En ce qui concerne les pesticides organochlorés ou certains insecticides organophosphorés on préconise la technique GC-MS après une extraction liquide-liquide ou SPE (Solid Phase Extraction), alors que les pesticides polaires ou

récents (comme les néonicotinoïdes) sont analysés préférentiellement par LC-MS/MS après extraction SPE. L'ensemble des ces méthodes de mesure est répertorié sur le tableau G.1 disponible en annexe G.

1.1.4.2 Limites des méthodes

Les méthodes d'analyse évoquées précédemment sont reconnues pour leur grande sensibilité et précision dans des contextes opérationnels idéaux, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a pas de perturbation significative pendant le processus d'analyse. Toutefois, ces performances s'accompagnent de limites pratiques importantes, notamment en termes de coût (d'investissement), de portabilité et de temps.

Premièrement, la majorité de ces techniques, comme la spectrométrie de masse couplée à des chromatographes ou les méthodes faisant appel à un plasma à couplage inductif, nécessitent des équipements sophistiqués et coûteux, entraînant un investissement initial élevé ainsi que des coûts opérationnels substantiels. En effet, l'instrumentation requise est souvent lourde, fixe, et complexe à maintenir, ce qui limite son accessibilité et son déploiement généralisé sur le terrain.

Deuxièmement, ces analyses nécessitent généralement un temps considérable entre le prélèvement de l'échantillon et l'obtention effective des résultats, pouvant aller de quelques heures jusqu'à une journée entière. Ce délai s'avère particulièrement problématique en situation de crise, comme cela a été le cas lors de l'accident industriel de Lubrizol en 2019, où des réponses dépassant les 24 heures se sont révélées insatisfaisantes pour assurer une gestion efficace de la situation. Dans de telles circonstances, ce temps de réponse, considéré comme trop lent par la population et les autorités locales, a mis en évidence les limites critiques de ces méthodes analytiques traditionnelles pour réagir efficacement à des crises environnementales ou sanitaires.

Enfin, ces techniques classiques évaluent généralement les polluants élément par élément, sans nécessairement considérer leur impact biologique global immédiat sur les écosystèmes. Ainsi, malgré leur précision, elles n'offrent pas toujours une vision globale et rapide de l'impact environnemental réel d'une contamination.

Face à ces contraintes, une solution alternative existe. Il s'agit des biocapteurs. Ces derniers utilisent des éléments biologiques pour réaliser des détections. Les deux prochaines sections aborderont ces biocapteurs. Ils apparaissent comme une solution alternative prometteuse. Par leur rapidité de réponse, leur faible coût opérationnel, leur capacité à mesurer directement des effets biologiques intégrés, et leur possibilité d'être déployés sur site, ils pourraient contribuer à basculer vers une surveillance environnementale plus agile, réactive et durable, répondant mieux aux besoins actuels d'une gestion responsable des écosystèmes.

1.2 Biocapteurs

Un biocapteur est un dispositif analytique permettant de détecter une substance, en associant un élément biologique à un transducteur physique. L'élément biologique (par exemple des enzymes, des anticorps, des cellules ou organismes vivants) réagit avec la cible recherchée. Cette interaction génère un signal biologique qui est converti par le transducteur vers un autre domaine de la physique (par exemple optique, électrique ou mécanique). Les biocapteurs sont utilisés dans divers domaines comme la médecine, l'environnement ou l'agroalimentaire pour détecter des contaminants, des pathogènes ou des marqueurs biologiques avec une rapidité, une spécificité et une sensibilité élevées.

Dans ce travail de thèse, nous proposons dans le même ordre d'idée d'utiliser un élément biologique dans un objectif de produire un dispositif mésoscopique permettant la détection d'une toxixité aquatique. Les bactéries sont un choix pertinent grâce à leur facilité de manipulation, leur sensibilité aux polluants et leurs tailles.

Cependant, parmi les techniques récemment développées pour effectuer une telle détection, il existe déjà des biocapteurs. D'une part, des éléments biologique sont utilisés comme éléments de bio-reconnaissance, dont les propriétés ou l'activité sont modifiées en cas d'exposition à des polluants. Par exemple, CellSense® est un essai biologique fondé sur la mesure de l'inhibition de la croissance bactérienne (*Escherichia coli* ou *P. putida*) au moyen de techniques de caractérisation électrique, telles que l'ampérométrie [34]. D'autre part, les tests biologiques qui utilisent l'optique sont connus pour être sélectifs, sensibles et accessibles pour la surveillance en temps réel [35]. Les tests commerciaux Microtox® et ToxAlert®, largement utilisés, détectent des polluants grâce à l'altération de la luminescence des bactéries comme *Vibrio fischeri* en présence de pollution. Cependant, ces tests souffrent d'interférences liées à la préparation des échantillons ou de biais optiques tels que l'autofluorescence des polluants. De plus, leur utilisation est limitée aux polluants spécifiques qui affectent *Vibrio fischeri* en particulier [35][36].

Dans la suite de ce chapitre, l'étude bibliographique des biocapteurs auxquels on s'intéresse est présentée à l'aide d'une arborescence, d'après [37] sur la figure 1.1. Nous étudierons en premier lieu l'utilisation de divers biorécepteurs dans la section 1.3. Dans un second temps, nous aborderons les transducteurs dans la section 1.4. Finalement, nous positionnerons notre étude par rapport aux différentes ressources existantes dans la littérature scientifique.

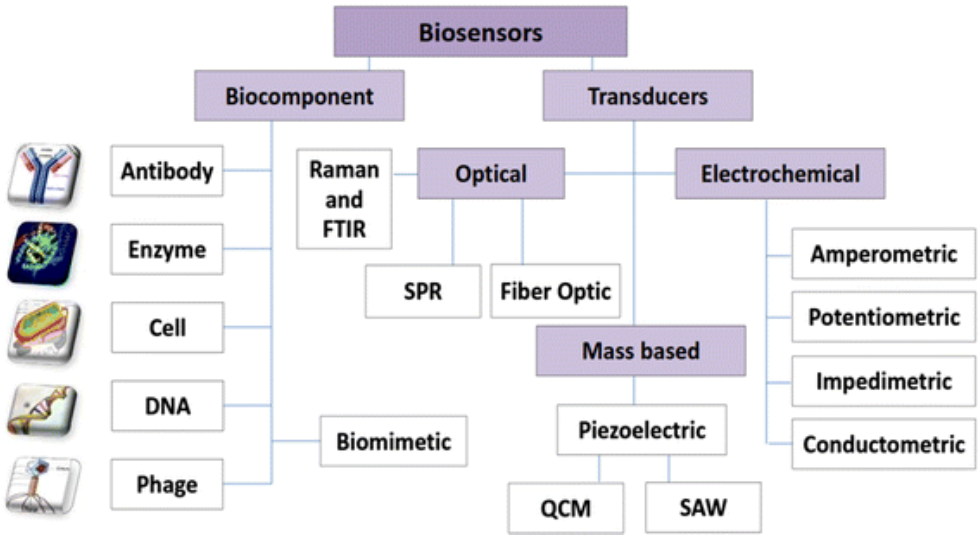


FIGURE 1.1 – *Classification des biocapteurs basés sur le type de transducteur [37].*

1.3 Biorécepteur

Dans cette première sous-section, nous exposerons des exemples de la littérature scientifique pour ce qui concerne l'utilisation de divers biorécepteurs (Enzyme, Anticorps, ADN, Phage, et cellule entière).

Afin d'illustrer les capacités des différents biorécepteurs, nous nous concentrerons sur les études qui présentent les moyens de détecter quatre types de polluants à l'aide de divers biorécepteurs mentionnés précédemment : les métaux lourds [38], les pesticides, les antibiotiques et les bactéries (pour la pollution d'éléments de consommation alimentaire). Nous pourrons ainsi souligner les capacités de ces capteurs, tout en observant un panel assez large de types d'études.

1.3.1 Enzyme

Un exemple de l'association d'un biorécepteur et d'un transducteur pour former un biocapteur est présenté sur la figure 1.2. Elle présente un biocapteur enzymatique destiné à la détection des métaux lourds et un capteur dont la surface est fonctionnalisée [39]. Cette surface est modifiée par la fixation d'enzymes pour rendre la détection plus performante.

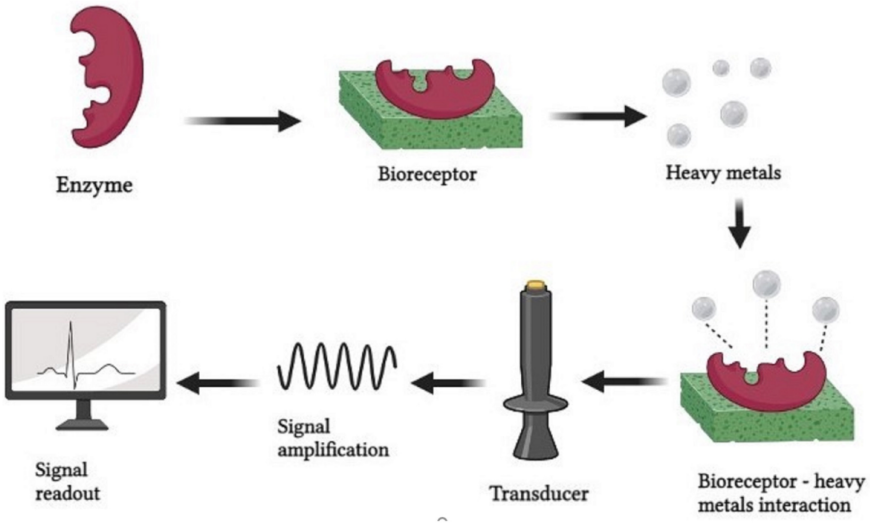


FIGURE 1.2 – *Structure d'un biocapteur à base d'enzyme pour la détection de métaux lourds [40].*

Une enzyme est une protéine dotée de propriétés catalytiques, c'est-à-dire qu'elle accélère considérablement la vitesse des réactions chimiques sans être modifiée de manière permanente au cours du processus. Cette spécificité catalytique repose sur la présence d'un site actif, une région précise de l'enzyme capable d'interagir sélectivement avec un substrat pour former un complexe intermédiaire. Ce produit de réaction est libéré par la suite, permettant ainsi à l'enzyme d'agir sur une autre molécule de substrat.

Par exemple, pour détecter des métaux lourds, les biocapteurs enzymatiques utilisent des enzymes sensibles telles que la phosphatase alcaline, dont l'activité enzymatique est inhibée par la présence de métaux comme le cadmium [40]. Un exemple d'utilisation utilise un transducteur impédancemétrique. Ce type de transducteur applique une tension entre des électrodes et en analysant le courant résultat donne une impédance du milieu étudié. Ces transducteurs seront détaillés dans la sous-section 1.4.3.4. L'impédance électrochimique mesurée à 100 kHz permet la détection de concentrations maximale de métaux de $0,5$ ppm [41].

Dans le cas des pesticides, les biocapteurs enzymatiques utilisent fréquemment des enzymes telles que la tyrosinase. Ces enzymes subissent une inhibition caractéristique en présence de pesticides organophosphorés ou carbamates, ce qui facilite leur détection rapide et efficace dans divers

échantillons environnementaux, permettant des détections de l'ordre du ppm [42]. Pour détecter des antibiotiques, les enzymes telles que la pénicillinase ou l'amidohydrolase sont particulièrement utiles. Ces enzymes catalysent la dégradation des antibiotiques β-lactames, comme la pénicilline G ou le céfuroxime, permettant leur détection à de très faibles concentrations ($\sim 0,1\,\mu$M) [43]. Cette méthode enzymatique offre une quantification rapide et sensible, particulièrement précieuse pour les analyses médicales et agroalimentaires [44].

Quelle que soit la cible visée, la fonctionnalisation de la surface du biocapteur demeure importante [39]. Cette étape assure une immobilisation stable et efficace de l'enzyme tout en maintenant son activité catalytique. Les techniques courantes incluent l'adsorption physique, la liaison covalente et l'encapsulation dans des matrices polymères ou des gels. Cette étape augmente considérablement la complexité et le prix de chaque mesure par rapport à des biocapteurs non fonctionnalisés [45].

Bien que les enzymes soient largement utilisées pour détecter des composés chimiques variés, leur application directe pour la détection de bactéries reste relativement rare dans la littérature scientifique, principalement en raison de la préférence accordée aux anticorps, protéines hautement spécifiques mais distinctes des enzymes dans leur mode d'interaction [46]. Toutefois, certaines études montrent qu'il est possible de détecter indirectement des bactéries en utilisant des enzymes couplées à des techniques ampérométriques, avec des seuils de détection atteignant $\sim 1000\,\mathrm{CFU/mL}$ après plusieurs heures d'incubation [47].

1.3.2 Anticorps

Un anticorps est une protéine produite par le système immunitaire, capable de reconnaître spécifiquement des molécules cibles, appelées "antigènes", et de s'y lier. La reconnaissance spécifique repose sur une structure caractéristique comprenant deux régions de liaison à l'antigène, appelées sites de reconnaissance ou parties variables, ainsi qu'une région constante permettant des fonctions biologiques spécifiques. La figure 1.3 illustre la structure générale d'un anticorps.

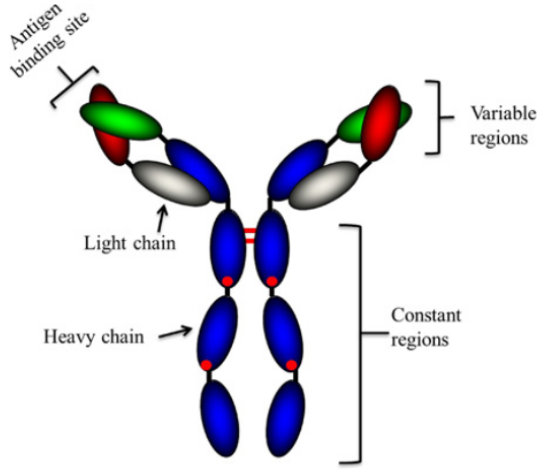


FIGURE 1.3 – *Structure d'un Anticorps [48].*

Les anticorps sont très fréquemment utilisés dans la conception de biocapteurs grâce à leur forte affinité et leur grande spécificité. Par exemple, dans le domaine environnemental, les anticorps permettent la détection efficace de métaux lourds dans divers milieux, y compris l'eau de rivière, avec des seuils très bas ($\sim 1,3\,\mathrm{ng/mL}$), et des temps de réponse rapides (< 10 minutes) [49]. Dans le cas des pesticides, les biocapteurs immunologiques exploitant des anticorps permettent une détection particulièrement sensible et rapide. Ainsi, ils ont été employés avec succès

pour détecter des pesticides comme les organochlorés ou les composés organophosphorés, souvent à des concentrations très faibles, facilitant ainsi leur suivi dans l'environnement et dans les produits alimentaires [48], (Atrazine $\sim 0.1\,\mathrm{g/L}$) [50]. Les anticorps sont également largement utilisés pour détecter des antibiotiques. Par exemple, des études ont montré leur efficacité dans la détection rapide de groupes d'antibiotiques tels que les Tétracyclines, avec des seuils de l'ordre de $\sim 1\,\mathrm{ng/mL}$ et des temps de réponse inférieurs à 5 minutes [51]. Ce type de biocapteur est particulièrement pertinent pour le suivi de la qualité des eaux usées ou des produits agroalimentaires [52]. Dans un contexte sanitaire, les anticorps se révèlent très utiles pour détecter spécifiquement des bactéries pathogènes. Des études ont montré leur capacité à identifier directement des bactéries comme *Escherichia coli* à des concentrations aussi faibles que ($\sim 100\,\mathrm{CFU/mL}$), en utilisant notamment des méthodes ampérométriques, avec des résultats obtenus en quelques minutes [52-56].

Enfin, pour garantir la performance des biocapteurs à base d'anticorps, une étape encore essentielle est la fonctionnalisation de la surface utilisée. Cette étape consiste à immobiliser l'anticorps sur un support adéquat, généralement via des liaisons covalentes ou une adsorption physique sur une surface spécialement traitée. La fonctionnalisation assure non seulement la stabilité mais également l'orientation optimale des anticorps, ce qui maximise leur capacité de reconnaissance et améliore la sensibilité et la spécificité globales du dispositif de détection au détriment du coût, de la complexité de chaque mesure et de la fragilité du capteur.

1.3.3 ADN

Un biocapteur à ADN (Acide DésoxyriboNucléique) est un dispositif utilisant des séquences spécifiques d'acides nucléiques, notamment l'ADN ou l'ARN (Acide RiboNucléique), comme éléments de reconnaissance. Ces dispositifs exploitent la capacité des séquences d'ADN à s'hybrider spécifiquement avec une séquence cible complémentaire. Ce phénomène d'hybridation suit souvent une dénaturation préalable, un processus par lequel les deux brins complémentaires de l'ADN sont séparés par chauffage, rompant les liaisons hydrogènes et rendant la double hélice instable. L'utilisation d'aptamères, des séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN capables de reconnaître spécifiquement divers analytes, améliore la sélectivité et la sensibilité du biocapteur [57]. Un schéma illustrant le fonctionnement d'un biocapteur basé sur l'ADN est proposé sur la figure 1.4.

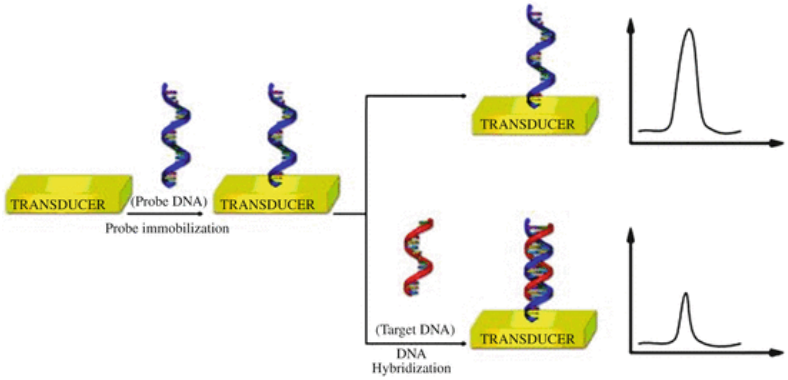


FIGURE 1.4 – *Structure d'un biocapteur basé sur l'ADN [58].*

La littérature scientifique sur les biocapteurs basés sur l'ADN présentent un large éventail d'applications, notamment dans la détection des métaux lourds [59]. En effet, certains aptamères peuvent fixer de manière sélective certains métaux tels que le mercure. Ainsi, la détection de concentrations de mercure à été démontrée pour des concentrations d'environ $0,6\,\mathrm{nM/L}$ soit $120\,\mathrm{ng/L}$ [60]. En ce qui concerne les pesticides, les biocapteurs ADN exploitent des aptamères spécifiques capables de se lier sélectivement à divers pesticides comme pour l'atrazine où un

biocapteur à montrer une sensibilité allant jusqu'à $\sim 100\,\mu$M [61]. Les antibiotiques peuvent également être détectés efficacement grâce aux biocapteurs ADN. Une étude utilisant la résonance plasmonique de surface (SPR) a permis la détection sélective de la néomycine B atteignant des seuils de détection autour de 10 nM [62]. Cette capacité à identifier précisément les antibiotiques est particulièrement utile dans le domaine de la surveillance environnementale. Dans le domaine sanitaire, la détection de bactéries par des biocapteurs ADN est prometteuse grâce à une bonne sélectivité, capable de distinguer différentes souches bactériennes. Ainsi, Zhu *et al.* [63] ont différencié la bactérie pathogène *Escherichia coli* O157 : H7 parmi d'autres souches communes telles que la K12, allant jusqu'à la détection d'une seule cellule bactérienne O157 : H7 parmi 10^5 cellules K12 !

De manière analogue aux biocapteurs à base d'enzymes et d'anticorps, la fonctionnalisation des surfaces constitue une étape cruciale dans la réalisation de biocapteurs ADN. Cette opération nécessite l'immobilisation stable des séquences d'acides nucléiques impliquant une augmentation du coût et de la complexité du procédé.

1.3.4 Phage

Un biocapteur phagique est un dispositif utilisant des bactériophages, des virus capables d'infecter spécifiquement des bactéries, comme éléments de reconnaissance biologique [64]. Ces bactériophages possèdent une haute spécificité envers leurs cibles bactériennes grâce à leurs protéines de surface. Ce principe, proche du piégage est illustré sur le schéma 1.5.

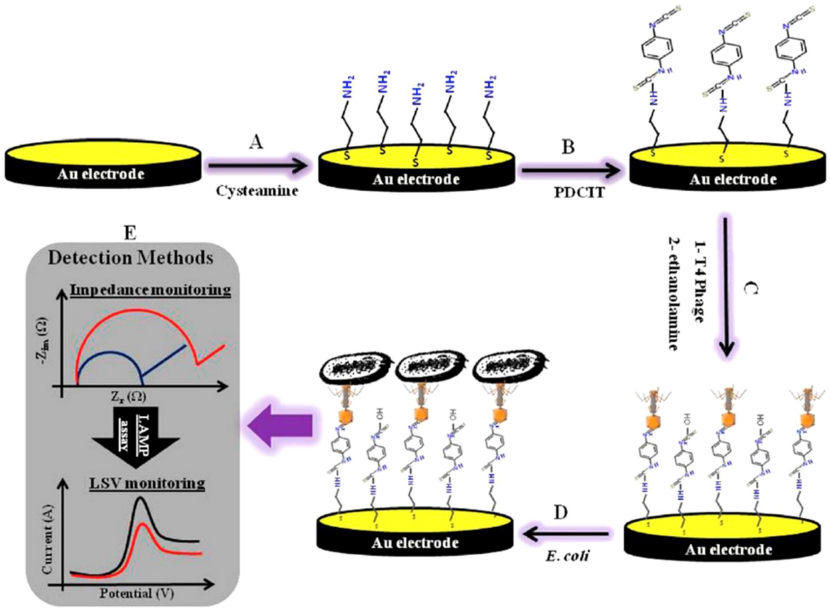


FIGURE 1.5 – *Schémas illustrant un biocapteur impédancemétrique basé sur les phage T4. Figure tirée de [65].*

Les biocapteurs à base de phages peuvent être utilisés dans divers domaines, y compris la détection des métaux lourds. Par exemple, en utilisant la technique du phage écran, il est possible de sélectionner des phages modifiés génétiquement pour exprimer, à leur surface, des peptides spécifiques capables de fixer sélectivement certains métaux. Une étude récente, réalisée par Sosnowska *et al.* (2025), a développé un système de détection optique spécifique pour les ions cuivre (Cu^{2+}), utilisant un peptide fluorescent dérivé du phage M13. La présence du cuivre provoque une diminution mesurable de la fluorescence, permettant la détection de concentration de cuivre de 10 µM [66]. Les pesticides peuvent également être analysés efficacement à l'aide de biocapteurs phagiques. Koh *et al.* (2018) ont développé un système associant un phage M13 à des nanofils pour

détecter spécifiquement le pesticide paraquat (PQ), obtenant un seuil de détection à $1\,\mu g/cm^2$ [67]. Concernant les antibiotiques, les bactériophages pourraient théoriquement être adaptés pour leur détection indirecte grâce à leur affinité naturelle envers certaines bactéries sensibles aux antibiotiques [68]. L'une des applications les plus évidentes et répandues des biocapteurs phagiques est d'ailleurs la détection bactérienne. Abdelhamied *et al.* (2023) ont démontré l'efficacité des bactériophages T4 immobilisés sur des microélectrodes interdigitées pour la détection rapide et spécifique d'*Escherichia coli* K-12. Ce capteur est capable d'identifier des concentrations bactériennes comprises entre 10^4 et $10^7\,CFU/mL$ [69]. De manière similaire, Mejri *et al.* (2010) ont associé des anticorps et des phages pour détecter spécifiquement *Escherichia coli* avec une sensibilité comparable, confirmant ainsi l'intérêt de ces approches hybrides [70].

Pour garantir la spécificité et la stabilité des interactions, la fonctionnalisation des surfaces du biocapteur est une nouvelle fois essentielle. Les phages sont immobilisés sur les surfaces du capteur via une adsorption physique ou une liaison covalente, assurant leur orientation optimale et facilitant leur interaction avec les cibles bactériennes. Ce procédé entraîne, à l'image des trois autres biorécepteurs présentés, une augmentation du coût et de la complexité de la mesure.

1.3.5 Cellule

Le dernier type de biorécepteur que nous aborderons concerne les cellules. Nous verrons d'abord les spécificités des approches de mesure quantitative et leur format (prolifération, différentiation, mort cellulaire, ...). Puis nous définirons les deux grands types de cellules utilisés dans les biocapteurs. Nous finirons en dressant une courte liste des possibilités de mesure avec ces biorécepteurs.

Les organismes vivants sont constitués de cellules classées en deux grands groupes : les cellules Procaryotes et les cellules Eucaryotes. Les cellules Procaryotes, représentées principalement par les bactéries, sont caractérisées par l'absence d'un noyau. Leur matériel génétique est contenu dans une région non délimitée appelée nucléoïde. Ces cellules possèdent une structure simple sans organite membraneux tels que les mitochondries. Elles se reproduisent généralement par fission binaire, une méthode simple et rapide qui favorise une croissance exponentielle en conditions optimales. À l'inverse, les cellules Eucaryotes sont plus complexes et possèdent un noyau clairement délimité par une enveloppe nucléaire où est stocké l'ADN sous forme de chromosomes. Ce type de cellule présente également une organisation interne élaborée avec de nombreux organites tels que les mitochondries. Parmi les cellules Eucaryotes, les levures sont des organismes unicellulaires appartenant au règne des champignons. Elles sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire et biotechnologique grâce à leur capacité de fermentation, produisant notamment du dioxyde de carbone et de l'éthanol à partir de sucres simples. Les cellules animales sont également des Eucaryotes, mais elles diffèrent notablement des levures en étant généralement organisées en tissus complexes au sein d'organismes multicellulaires. Leur flexibilité structurelle leur permet de former des structures organisées comme les muscles, le système nerveux ou les organes internes.

Il existe plusieurs approches pour analyser les cellules. Il est possible d'étudier une seule cellule, un flux de cellules, un film cellulaire (biofilm) ou une population en suspension entière. Certaines méthodes exploitent des dispositifs de piégeage ou des flux micro-fluidiques pour observer les cellules individuelles, ce qui implique un coût plus élevé par détection. On retrouve ces approches dans des transducteurs optiques ou électriques.
Lorsque l'on s'intéresse spécifiquement au suivi et à l'analyse des phénomènes sur des populations cellulaires en suspension, on découvre six grands champs d'étude particulièrement représentatifs comme cela est illustré sur la figure 1.6.

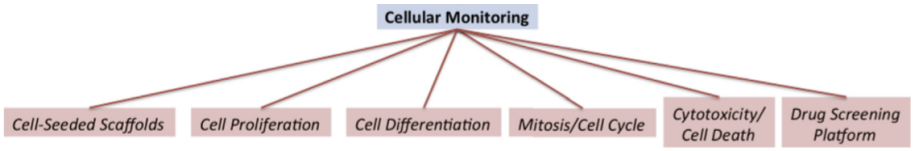


FIGURE 1.6 – *Organigramme de la spectroscopie diélectrique cellulaire et de ses applications associées dans le domaine de la biosurveillance, de l'analyse et de la caractérisation des cellules. Tiré de [71].*

Le premier champ d'étude, intitulé, «Cell-Seeded Scaffolds» en anglais, traite de la culture de cellules sur des structures poreuses ou tridimensionnelles, comme des matrices polymères [72]. Cette méthode implique un coût de développement élevé de l'interface biologique - transducteur.

Le deuxième champ s'intéresse à la croissance des populations en mesurant la variation du signal due à l'accroissement de la surface couverte par les cellules. On retrouve dans des études l'appellation de Biomasse, il s'agit du ratio de volume qu'occupent les bactéries dans un espace fini. Cette méthode, très performante, est largement utilisée [73].

Un autre champ d'application concerne la différenciation cellulaire qui exploite des facteurs tels que la rigidité membranaire, l'adhérence ou encore l'expression de gènes et de protéines. Cela permet d'identifier des signatures précoces du passage d'un état immature à un état différencié. Cette méthode dure souvent plusieurs heures, jusqu'à plusieurs jours [74].

Une quatrième catégorie se concentre plus précisément sur la séquence des événements conduisant à la division cellulaire. À chaque phase du cycle, des altérations de la forme, de la densité ou de la membrane se répercutent sur les mesures d'impédance. De manière analogue à la différenciation cellulaire, l'observation de la division cellulaire est un suivi de temps long [75].

Le cinquième volet, désigné par le terme « Cytotoxicity/Death », s'inscrit dans le cadre des essais de toxicologie. Il permet d'étudier en temps réel la réponse d'une population cellulaire ou même d'une cellule unique à des facteurs stressants, qu'il s'agisse d'agents chimiques, biologiques ou physiques. À mesure que la membrane se fragilise ou que les interactions cellule-substrat se réduisent, l'impédance de la solution chute et révèle la mort bactérienne suite au traitement [76].

Enfin, le « Drug Screening Platform » concrétise l'idée que l'observation de multiples indicateurs, tels que l'adhésion, la viabilité, la prolifération ou la mort cellulaire, permet d'automatiser le ciblage de molécules thérapeutiques. Dans un même système, l'application de différentes doses de composés potentiellement actifs et l'enregistrement de l'évolution de l'impédance permettent d'évaluer leur efficacité ou leur toxicité [77]

On peut regrouper ces approches d'analyse cellulaire en fonction de leur coût d'exécution. Parmi les méthodes les plus accessibles et moins coûteuses, l'étude de la croissance des populations cellulaires repose sur l'observation des variations de surface couverte et du ratio de volume occupé par les cellules, sans nécessiter d'équipements sophistiqués tel qu'un piégeage ou un flux. D'autres techniques, bien que potentiellement plus coûteuses, se distinguent par leur rapidité. Le Drug Screening Platform, par exemple, automatise l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité d'éléments chimiques. Cette approche regroupe plusieurs pratiques d'analyse, notamment la détection de la mort cellulaire et l'étude des modifications de croissance, optimisant ainsi le suivi cellulaire à grande échelle. Ces différentes méthodes, bien que distinctes dans leur application, s'appuient sur des principes communs et s'intègrent souvent dans des protocoles complémentaires pour une analyse efficace et rapide des cellules.

Dans la littérature, de nombreuses études portent sur le développement de biocapteurs utilisant des cellules comme biorécepteurs pour diverses applications. Si certains travaux se concentrent sur l'analyse cellulaire elle-même, d'autres s'intéressent spécifiquement à la détection des bactéries en raison de leur rôle en tant qu'agents pathogènes, notamment dans le domaine de la sécurité

alimentaire [78]. Par ailleurs, certaines recherches exploitent les bactéries non pas comme cibles, mais comme outils de détection. En effet, certaines souches bactériennes sont sensibles à des polluants ou à des substances toxiques, permettant ainsi leur utilisation comme biorécepteurs pour surveiller la qualité de l'environnement [79]. Ces différentes approches illustrent la diversité des applications des biocapteurs à base de cellules, qui peuvent servir aussi bien à détecter des agents pathogènes qu'à évaluer la présence de contaminants dans divers milieux.

1.3.5.1 Le cas des Eucaryotes

Les cellules eucaryotes animales constituent une catégorie majeure d'organismes caractérisés par leur structure complexe, incluant un noyau défini ainsi que divers organites spécialisés. Leur utilisation dans les études scientifiques offre un large éventail de possibilités. Par exemple, Ramirez et al. (2020) [80] ont montré l'intérêt des cellules HeLa pour étudier diverses réponses physiologiques et toxicologiques à travers des systèmes biologiques complexes. Les cellules animales permettent ainsi d'étudier directement des interactions complexes et spécifiques qui ne peuvent pas être facilement reproduites dans des modèles plus simples. Cette capacité à modéliser précisément des réponses biologiques sophistiquées est essentielle dans des domaines critiques comme la recherche anticancéreuse ou de maladie [81].

Malgré ces avantages considérables, l'utilisation des cellules animales eucaryotes dans les biocapteurs reste limitée, représentant moins de 40% des dispositifs développés, en raison principalement de difficultés pratiques associées à leur culture et à leur manipulation [52, 82]. Il existe un nombre pertinent d'exemples d'utilisation de cellules mammifères pour diverses détections, bien que les applications liées à la médecine soient majoritaires [83]. Par exemple, un biocapteur innovant, utilisant des cellules mammifères (cellules B lymphocytaires Ped-2E9), a été développé pour des applications en sécurité alimentaire. Ce dispositif permet la détection rapide et précise d'un large éventail d'agents pathogènes comme *Listeria* monocytogenes, *Bacillus cereu*, *Vibrio*, ainsi que des toxines actives telles que l'α-hémolysine ou la phospholipase C, avec des seuils de détection de 10 à 40 ng pour les toxines en 2 heures et d'environ 10^3 CFU/mL pour les bactéries en 4 à 6 heures [84].

Ce sont principalement les micro-algues, les Protozoaires et les levures qui sont utilisées lorsqu'on évoque les biocapteurs utilisant des cellules Eucaryotes. Par exemple, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est couramment utilisée pour étudier l'impact de divers composés chimiques sur la prolifération cellulaire ou pour identifier la toxicité via des mesures d'impédance électrique ou de permittivité cellulaire. Ceci permet la distinction entre cellules vivantes et mortes après traitement thermique ou exposition à des toxines [85-87]. Cependant, on peut également utiliser les biocapteurs afin d'alerter sur la pollution potentielle d'un échantillon ou au contraire déterminer si ces échantillons sont sains pour le biorécepteur. Cette utilisation environnementale de biocapteurs utilisant des levures est présentée sur la figure 1.7. Cette dernière regroupe différentes applications (détection environnementale, sanitaire, alimentaire ou pharmacologique) dans laquelle l'utilisation de levures permet d'obtenir des résultats par seuil ou par quantification.

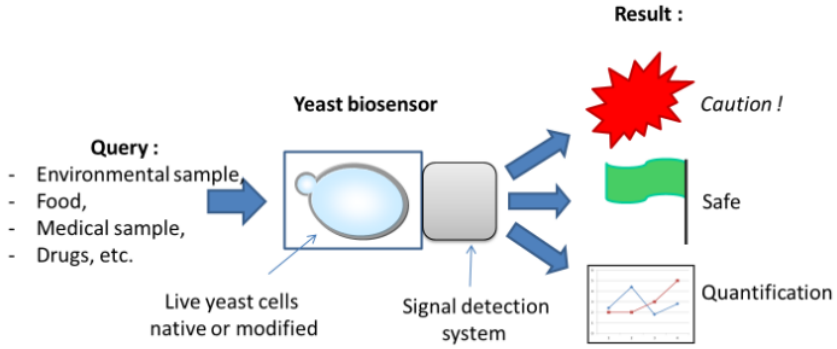


FIGURE 1.7 – *Schémas généralisant l'utilisation des levures en tant que biocapteur. Les fonctions et buts de ces biocapteurs sont également énoncés. Tiré de [88].*

Les biocapteurs à levure ont montré leur efficacité dans la détection de métaux lourds. Ainsi, Lehmann *et al.* (2000) ont utilisé des cellules de *S. cerevisiae* pour une détection ampérométrique d'ions cuivre (Cu^{2+}) avec des concentrations de $\sim 0,5\,mg/L$ [89]. Concernant les pesticides, des biocapteurs utilisant des levures génétiquement modifiées permettent également une détection efficace de substances telles que le mecoprop ou le diuron. Par exemple, Hollis et al. (2000) ont développé un système basé sur des levures modifiées (*S. cerevisiae*), capable de détecter spécifiquement ces pesticides avec des seuils de détection de quelques mg/L [90]. Cette méthode permet une surveillance environnementale rapide et abordable des pesticides, très utile pour assurer la sécurité alimentaire et environnementale. Finalement, les cellules de levures peuvent être modifiées génétiquement et ainsi être utilisées pour la détection d'antibiotique. Une étude sur *S. cerevisiae* montre une détection par absence de croissance d'environ $6.5\,\mu g/mL$ de nourseothricin [91].

1.3.5.2 Procaryotes

Les bactéries sont des cellules procaryotes simples, dépourvues de noyau structuré, faciles à cultiver et génétiquement modifiables, ce qui en fait des outils particulièrement adaptés pour divers types de biocapteurs. Le fonctionnement des bactéries sera approfondi dans le chapitre 2. Les biocapteurs bactériens sont sensibles à plusieurs éléments et peuvent être utilisés dans plusieurs domaines essentiels tels que la détection de métaux lourds, de pesticides, d'antibiotiques et de bactéries pathogènes (paradoxalement souvent elles-mêmes). Par exemple, pour les métaux lourds, des bactéries génétiquement modifiées de type *Escherichia coli* ont été utilisées pour détecter sélectivement des ions métalliques comme le zinc et le cuivre, avec des seuils de détection précis permettant des évaluations efficaces des risques environnementaux [92].

De manière similaire, une étude utilisant la fluorescence optique basée sur des cellules d'*Escherichia coli* modifiées a permis la détection précise d'une large gamme de métaux lourds incluant le cuivre à un niveau de concentration de $0,5\,\mu g/L$ ou encore le cadmium et le mercure [93]. La détection d'antibiotiques par des cellules bactériennes est également documentée. Ainsi, Virolainen *et al.* (2008) ont développé une méthode utilisant des cellules d'*Escherichia coli* modifiées génétiquement pour détecter spécifiquement les antibiotiques du groupe des Tétracyclines via un test rapide et économique adapté aux exigences réglementaires européennes, avec des seuils de détection très bas en ng/L [94, 95]. La détection de polluants avec un biocapteur utilisant des bactéries et combiné à une mesure impédancemétrique sera approfondie dans la section 1.5.

1.4 Transducteurs

Les biocapteurs présentés dans l'arborescence de la figure 1.1 de la section 1.2 sont composés de biorécepteurs mais également de transducteurs. Nous dresserons dans cette section un aperçu des transducteurs utilisés par la communauté scientifique en nous intéressant dans un premier temps aux transducteurs optiques. Nous verrons ensuite ceux évaluant la masse du biorécepteur comme moyen de transduction. Pour terminer, on détaillera les transducteurs électrochimiques.

1.4.1 Transducteurs optiques

Les biocapteurs optiques constituent une famille de dispositifs d'analyse particulièrement prisée pour la détection rapide et sensible d'agents pathogènes, de polluants ou de molécules d'intérêt dans l'eau et d'autres matrices environnementales [96]. Parmi les approches les plus courantes, on trouve notamment l'interférométrie optique, la résonance plasmonique de surface (SPR), l'optique guidée sur fibres, ainsi que des méthodes spectroscopiques telles que la spectroscopie Raman ou infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Comme présenté dans l'introduction, la solutions commerciales Microtox®utilise la luminescence de bactéries pour la détection de substances toxiques [97]. De manière plus générale, la plupart des biocapteurs optiques tirent profit des phénomènes d'absorption, de diffusion ou de couplage de la lumière pour mettre en évidence la présence d'un agent cible.

Parmi les techniques optiques avancées, la SPR occupe une place de choix pour la détection d'interactions moléculaires. Le principe repose sur la mise en résonance d'ondes plasmoniques de surface, c'est-à-dire des oscillations collectives des électrons à l'interface métal–diélectrique. Cette excitation peut être réalisée par couplage prismatique (voir la figure 1.8), par un guide d'onde ou par fibre optique. La couche métallique est fonctionnalisée avec des biorécepteurs et l'indice de réfraction optique de sa surface va donc varier en présence de polluant. Ceci se traduit par une variation de la fréquence de résonance ou de l'intensité de l'onde plasmonique. Plusieurs études ont démontré la sensibilité remarquable de la SPR pour la détection de pesticides ou de micro-organismes. Par exemple, un immunocapteur SPR permet de repérer des *Escherichia coli* à des concentrations de l'ordre de $\sim 100\,\mathrm{CFU/mL}$ en seulement 5 minutes [98]. De surcroît, la détection de pesticides organophosphorés (chlorpyrifos) ou de carbamates (carbaryl) peut atteindre des limites de détection respectives de $52-58\,\mathrm{ng/L}$ et de l'ordre du microgramme par litre [99]. De telles performances satisfont aisément la valeur indicative fixée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à environ $1\,\mu\mathrm{g/L}$ pour certains contaminants dans l'eau potable.

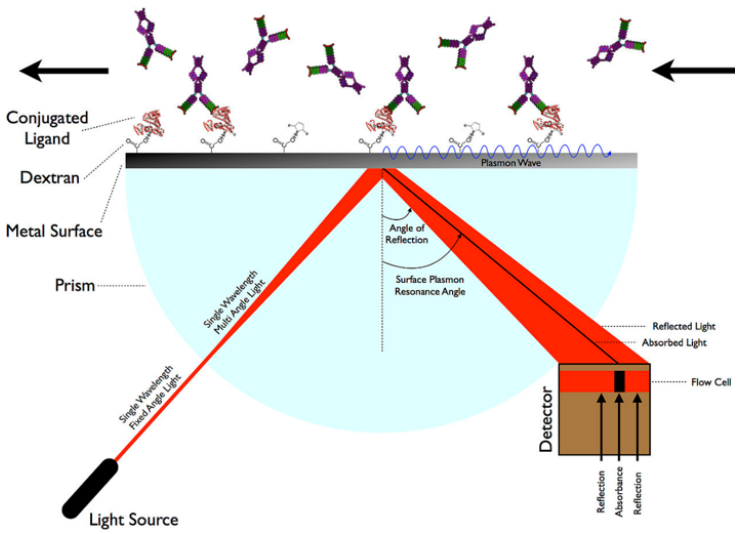


FIGURE 1.8 – *Une configuration d'un SPR sur puce. Tiré de [100].*

1.4.2 Transducteurs utilisant la masse

Les biocapteurs fondés sur la mesure de la masse mesurent de faibles variations massiques induites par l'interaction spécifique entre une cible biologique et un biocapteur. En pratique, lorsque la cible d'un récepteur biologique immobilisé est assez proche de ce dernier, une interaction conduit à une augmentation directe de la masse à la surface du dispositif. La mesure précise de cette variation permet une détection quantitative d'analytes biologiques. Ces dispositifs reposent sur des matériaux comportant des propriétés de couplage fort entre une force mécanique et certaines de leurs caractéristiques physiques. Ils sont utilisés de façon à pouvoir détecter une variation de masse et le convertir en un signal électrique mesurable.

Une méthode couramment employée est le Quartz Crystal Microbalance (QCM) [101]. Le QCM mesure les variations de fréquence résultant de la liaison spécifique de molécules cibles à la surface du cristal piézoélectrique [102]. Par analogie avec l'effet piézoélectrique inverse qui permet à certains matériaux de générer un signal électrique sous l'action d'une déformation, il existe également des transducteurs exploitant des matériaux magnétostrictifs.

Le terme magnétostrictif inverse renvoie à la variation de l'aimantation d'un matériau ferromagnétique lorsqu'il est soumis à un changement de forme ou de dimension. On exploite ce phénomène en faisant vibrer le dispositif magnétostrictif à sa fréquence de résonance. Lorsque la masse liée au capteur varie (par exemple à cause de la liaison spécifique d'une protéine), la fréquence de résonance se décale. Ainsi, la mesure précise de ce décalage fournit une indication quantitative du niveau de la cible biologique. Le système fonctionne sans contact, simplement à l'aide de bobines générant et recevant les oscillations du capteur.

Un exemple d'une deuxième utilisation des biocapteurs magnétostrictifs est illustré sur la figure 1.9, qui présente un biocapteur magnétoélastique capable de mesurer des protéines telle que l'albumine sérique humaine (HSA).

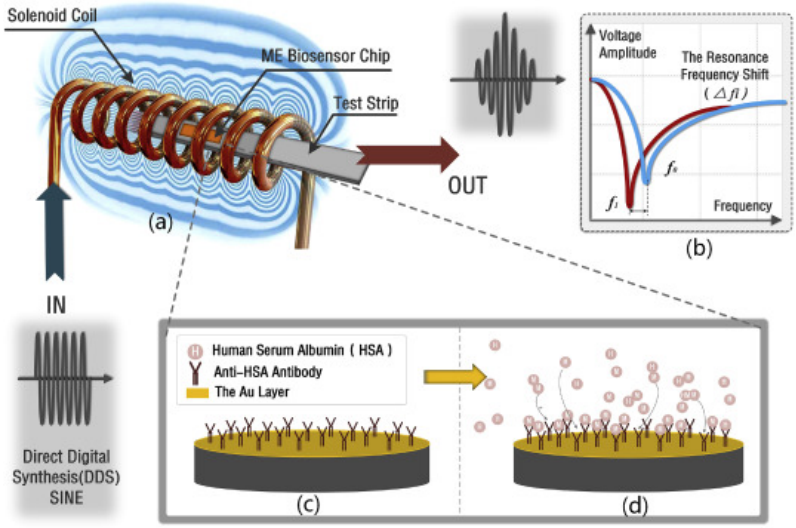


FIGURE 1.9 – *Schéma du système de mesure de l'HSA et mécanisme de détection du biocapteur à microélectrodes. Tiré de [103].*

Le dispositif qui fonctionne selon l'effet magnétostrictif [103] a montré une limite de détection particulièrement basse de $0,039\,\mu$g/mL. Les expériences prouvent que cette approche offre une sensibilité élevée ($8,70\,$Hz$/\mu$g.mL^{-1}) et un temps de réponse rapide, avec des coûts de fabrication réduits grâce à sa miniaturisation.

Les biocapteurs QCM ont fait leurs preuves pour la détection de bactéries. En effet, des performances de détection autour de $10^2\,$CFU/mL [104] [102] ont été relevées. En revanche, ces capteurs sont par essence fonctionnalisés et donc complexes à mettre en place.

1.4.3 Transducteurs électrochimiques

Dans sa définition la plus simple, un transducteur électrochimique pour un biocapteur convertit un signal biologique en signal électronique. Le signal biologique est généré par la reconnaissance spécifique d'une cible grâce à un élément biologique (enzyme, anticorps, cellule, bactérie, ADN), tandis que le transducteur traduit cette interaction en une réponse électrique quantifiable.

Il existe une grande diversité de transducteurs électrochimiques, mais leur fonctionnement repose toujours sur la détection d'une variation des propriétés électriques du milieu de mesure consécutivement à la reconnaissance biologique.
Les capteurs sont classés d'après la propriété électrique utilisée, selon que l'on mesure une variation de courant, de potentiel, de conduction ou d'impédance. On définit ainsi les capteurs ampérométriques, potentiométriques, conductométriques et impédancemétriques [45]. Un capteur ampérométrique mesure le courant passant entre deux électrodes à un potentiel fixe. À l'inverse, la potentiométrie implique une mesure du potentiel en réponse à un courant qui varie selon un profil prédéfini. La conductométrie exploite, quant à elle, les variations de conductivité électrique d'une solution induites par des changements chimiques ou biologiques. Enfin, l'impédancemétrie repose sur l'analyse de la réponse en impédance d'un système soumis à un courant alternatif [105].

1.4.3.1 Ampérométrie

Les transducteur ampérométriques sont des dispositifs qui mesurent le courant électrique généré par une réaction chimique ou biologique, sous un potentiel fixe qui peut être nul. L'ampérométrie assure un transfert actif d'électrons dans un milieu étudié. Cette caractéristique rend l'ampérométrie particulièrement sensible à de faibles variations de concentration, surpassant ainsi souvent la potentiométrie en termes de sensibilité analytique [106, 107]. Les applications biologiques des biocapteurs ampérométriques incluent souvent la quantification enzymatique de substrats spécifiques. Par exemple, la mesure de lactate via l'enzyme lactate oxydase a été prouvée [108]. Cette enzyme, immobilisée sur une électrode de platine protégée par une membrane en Nafion (Polymère conducteur), permet une détection sélective et sensible de l'acide lactique dans des échantillons complexes, avec une limite de détection pouvant atteindre $\sim 0,8\,\mu$Mol et une stabilité opérationnelle remarquable sur plusieurs mois[108].

L'ampérométrie associée à des anticorps spécifiques constitue une approche efficace pour la détection bactérienne rapide et sensible. Des études démontrent la capacité des biocapteurs ampérométriques à détecter des bactéries comme *Listeria monocytogenes* ou *Escherichia coli*. En utilisant des anticorps spécifiques immobilisés à la surface des électrodes, ces dispositifs atteignent des sensibilités élevées, permettant la détection de concentrations bactériennes de $2,5 \times 10^3$ CFU/mL [55] pour *Listeria monocytogenes*. Quant à la quantification de *Escherichia coli*, une étude relève une sensibilité de détection de $9,7 \times 10^2$ cells/mL [53][4].

Un exemple notable de biocapteurs ampérométriques appliqués à la détection de polluants via des bactéries est présenté dans l'étude de Besant *et al*. [109]. Grâce à un système de capture par microfiltres intégrés, il permet une détection rapide de la viabilité bactérienne et de la résistance aux antibiotiques Ampicilline et Ciprofloxacine, avec une limite de détection restreinte par la sensibilité des bactéries. Ce dispositif améliore significativement la rapidité des tests, fournissant des résultats en seulement une heure. Les performances de cette étude sont remarquables, bien que le dispositif soit plus complexe à cause de ces filtres.

4. Selon l'auteur cells/mL mesure l'effectif cellulaire total (quel que soit l'état physiologique), tandis que CFU/mL ne compte que les cellules viables et cultivables.

1.4.3.2 Potentiométrie

La potentiométrie repose sur la mesure d'un potentiel électrique entre deux électrodes avec un courant imposé. Le potentiel mesuré résulte de réactions électrochimiques induites par des variations ioniques, notamment des ions Hydrogène (H^+), et il est directement lié à leur concentration dans le milieu étudié. Ce phénomène est particulièrement exploité pour mesurer des variations de pH, selon la relation de Nernst où le potentiel mesuré dépend de la température et de l'activité ionique.

Les capteurs potentiométriques sont naturellement adaptés à la détection ionique grâce à leur sensibilité aux variations de concentration d'ions spécifiques. Par exemple, des bactéries immobilisées sur une électrode peuvent être utilisées pour la détection d'organophosphorés (OP). En dégradant ces composés, les bactéries modifient localement le pH, permettant ainsi une mesure indirecte de la concentration d'OP. Un exemple concret est celui de *Flavobacterium sp.* immobilisée sur un transducteur potentiométrique qui digère les organophosphorés, comme le Paraoxon, avec une sensibilité atteignant $\sim 0,025\,\text{mMol}$ de Paraoxon [110].

La détection directe des bactéries via des capteurs potentiométriques est également réalisable à travers des molécules de reconnaissance spécifiques [111]. Pour identifier *Listeria monocytogenes*, des aptamères spécifiques sont introduits dans la solution testée. Ces aptamères fixent sélectivement les bactéries, et l'ajout ultérieur de protamines, qui se lient aux aptamères capturés, provoque une modification mesurable du potentiel électrique. Cette technique permet une détection extrêmement sensible, jusqu'à $10\,\text{CFU}/\text{mL}$ en seulement 40 minutes [112].

Ainsi, grâce à leur simplicité de mesure et à leur sensibilité aux ions, les capteurs potentiométriques, lorsqu'ils sont rendus spécifiques, trouvent des applications variées allant de la détection de bactéries pathogènes à l'usage de ces bactéries comme indicateurs biologiques. Cependant ces capteurs ne peuvent détecter des phénomènes qu'à des fréquences très basses et ces mesures à courant nul ou imposé restent intrinsèquement sensibles aux dérives de l'électrode de référence, limitant l'accès aux phénomènes dynamiques de transfert de charge. L'analyse spectroscopique par impédance permet de s'affranchir de ces contraintes en sondant l'interface sur une large gamme de fréquences. .

1.4.3.3 Conductimétrie

La conductimétrie est une technique qui mesure la conductivité électrique d'une solution pour déterminer la concentration d'une substance biologique. Un capteur conductimétrique typique comprend deux électrodes entre lesquelles un courant continu (DC) est appliqué. La conductivité est déterminée en mesurant le courant électrique traversant la solution, qui est inversement proportionnel à la résistance du milieu. Ces capteurs sont particulièrement adaptés pour détecter les composés ioniques, tels que les ions, les sels et les acides, ainsi que les changements de pH et de force ionique d'une solution. Par exemple, la détection rapide de bactéries telles qu'*Escherichia coli* O157 : H7 et *Salmonella spp.* est possible grâce à des membranes complexes, avec une sensibilité de détection atteignant environ $83\,\text{CFU}/\text{mL}$ en seulement 10 minutes [113]. Cette méthode fonctionnalisée permet une réponse rapide et fiable en raison du changement de conductivité directement lié à la concentration bactérienne.

Une autre approche utilise directement des cellules biologiques immobilisées comme élément sensible du capteur. Des microalgues comme *Chlorella vulgaris*, immobilisées sur des électrodes interdigitées (donc fonctionnalisées), servent à détecter des métaux lourds et des pesticides. Dans ces dispositifs, la présence de polluants inhibe la croissance des algues, empêchant ainsi tout changement de conductivité habituellement observé en leur absence. Ce principe permet une détection extrêmement sensible des métaux lourds tels que le cadmium, avec des concentrations aussi faibles que 10 ppb en seulement 30 minutes [114, 115].

En résumé, les capteurs conductimétriques présentent de nombreux avantages tels que la simplicité d'utilisation, la rapidité de la mesure et la capacité à détecter une large gamme de composés

biologiques et environnementaux. Ces dispositifs constituent une solution pour la surveillance rapide de la contamination bactérienne et des polluants dans divers contextes environnementaux et industriels bien que les plus sensibles d'entre eux nécessite une fonctionnalisation de surface.

Malgré cette efficacité, la conductimétrie ne donne qu'une image fixe des contributions au sein du milieu. À l'inverse, l'impédancemétrie permet de décorréler la résistance de la solution des capacités provenant d'autres phénomènes dans cette solution, phénomènes qui seront explicités plus loin dans ce manuscrit. Ceci permet d'apporter une précision indispensable pour caractériser les éléments biologiques participant à la réponse électrique.

1.4.3.4 Impédancemétrie

Un transducteur impédancemétrique permet de mesurer l'impédance électrique d'un échantillon pour déterminer la concentration d'une substance biologique. L'impédance est définie par la relation $U = Z \cdot I$, où U représente la tension efficace, Z l'impédance, et I la valeur efficace du courant électrique alternatif.
L'impédance peut être séparée dans sa notation complexe en deux contributions : l'une -sur l'axe des réels- est la résistance, l'autre -sur l'axe imaginaire- est la réactance du système. Un transducteur impédancemétrique repose ainsi sur l'hypothèse qu'il est possible de quantifier la concentration d'une substance biologique présente dans un échantillon en mesurant, via l'impédance, la modification des propriétés électriques (conductivité et permittivité) du milieu étudié consécutive à la variation de concentration de cette substance.

La conductivité reflète en effet la capacité du milieu à conduire un courant électrique et dépend principalement de la concentration ionique, particulièrement en milieu liquide. La permittivité exprime quant à elle la capacité des éléments du milieu à se polariser en réponse à un champ électrique appliqué. La permittivité complexe ε^* peut être exprimée comme suit : $\varepsilon^* = \varepsilon^{'} - j\varepsilon^{''}$ où ε' est la partie réelle de la permittivité, liée au stockage de l'énergie électrique dans le milieu (polarisation), et $\varepsilon^{''}$ est la partie imaginaire associée aux pertes diélectriques.

Cette mesure est souvent rattachée à un circuit électrique équivalent. Par exemple, pour un milieu liquide vu comme un circuit RC on associe une admittance complexe écrite sous la forme $Y = G + j\omega C$, où G est la conductance $(1/R)$, C la capacité, et ω la pulsation du signal appliqué. En développant cette admittance, on obtient $Y = B[\sigma + \omega\varepsilon''] + j\omega B\varepsilon'$, où B représente un rapport géométrique du système mesuré, σ la conductivité, ε' la partie réelle de la permittivité complexe et ε'' la partie imaginaire.

Toutefois, pour modéliser la mesure réellement effectuée, les circuits équivalents sont généralement plus complexes, puisqu'ils tiennent compte de phénomènes dépendants de la fréquence et du système de mesure. Par exemple, à basse fréquence, les interactions ioniques dominent, tandis qu'à des fréquences élevées, proches du GHz, les effets de propagation et de polarisation moléculaire deviennent prépondérants. Les biocapteurs impédancemétriques exploitent ces variations fréquentielles pour déterminer précisément les propriétés électriques des milieux biologiques étudiés. Un approfondissement détaillé des dispositifs et des méthodes d'analyse est présenté au chapitre 3.

Il convient de souligner ici que le principe général de mesure des biocapteurs impédancemétriques repose souvent sur une configuration à deux électrodes.

L'intérêt particulier des biocapteurs impédancemétriques réside dans leur sensibilité élevée et leur polyvalence dans la détection d'une large gamme de biorécepteurs tels que les protéines, les acides nucléiques ou encore les cellules. Ils sont également adaptés pour détecter des changements subtils dans les propriétés électriques d'un milieu causés par la présence ou l'absence de substances biologiques spécifiques. Par exemple, les capteurs impédancemétriques percevant la conductivité à une fréquence fixe sont capables de détecter des concentrations de cadmium très faibles (0,5 ppm) [41].

Une vaste littérature traite des biocapteurs impédancemétriques adaptés à différents biorécepteurs. Lazcka *et al.* [116] proposent une revue approfondie sur la détection de pathogènes bactériens, mettant en évidence l'évolution croissante de la recherche sur les capteurs impédancemétriques appliqués aux eaux contaminées. De même, Swami *et al.* [79] dressent un panorama actualisé des capteurs impédancemétriques appliqués à la détection de polluants, tandis qu'Ahmed *et al.* [117] présentent une revue ciblée sur les biocapteurs impédancemétriques dédiés à la détection cellulaire sans application environnementale directe.

Concernant les biorécepteurs spécifiques, l'utilisation de bactériophages a permis de développer des capteurs impédancemétriques rapides et efficaces pour identifier des bactéries pathogènes dans les aliments [69]. De même, des électrodes interdigitées fonctionnalisées par de l'ADN ont été utilisées avec succès pour détecter *Escherichia coli* à très faibles concentrations ($\sim 9 CFU/mL$) [118]. Des capteurs intégrant des anticorps immobilisés sur microélectrodes en or interdigitées ont également prouvé leur efficacité pour la détection spécifique d'*Escherichia coli* O157 : H7 dès $2,5 \times 10^4$ CFU/mL [119].

Enfin, l'intégration de circuits microfluidiques à des capteurs enzymatiques impédancemétriques a permis d'atteindre une sensibilité jusqu'à 12 CFU/mL en seulement deux heures [120].

Les biocapteurs impédancemétriques sont donc largement étudiés, comme le montre l'existence de revues traitant spécifiquement de la détection de pathogènes bactériens [116]. De même, la détection de polluants fait l'objet d'un état de l'art récent et exhaustif des capteurs impédancemétriques disponibles [79]. Par ailleurs, une revue focalisée sur les applications cellulaires des biocapteurs impédancemétriques est également disponible, mettant en évidence leur diversité d'usage en biologie cellulaire [117]. L'abondance d'articles sur le sujet souligne l'actualité de cette problématique. De plus, ces articles regroupent l'ensemble des biocapteurs ayant des spécificités propres à une méthode de détection. [6, 45, 96, 106, 107, 111, 121].

L'ensemble des applications présentées souligne l'intérêt majeur des biocapteurs impédancemétriques, aussi bien pour la détection directe de bactéries pathogènes que pour l'évaluation indirecte de la présence de polluants via la réponse biologique de microorganismes spécifiques. A ce stade, il est utile d'établir un tableau de synthèse des différentes méthodes exposées dans jusqu'ici en soulignant leurs avantages et inconvénients, notamment compte tenu de leurs domaines d'applications, de leur caractère sélectif ou non, et des sensibilités et temps de réponse obtenus. Ce tableau n'inclut pas les publications liées à la détection de bactéries comme agent pathogène.

Le tableau 1.3 met en lumière que la détection de la toxicité aquatique autour du développement d'un biocapteur impédancemétrique à surfaces non fonctionnalisées est très pertinente. Un état de l'art détaillé des différentes approches de ce type de capteurs est donc proposé dans la section suivante.

TABLEAU 1.3 – *Synthèse corrective des applications des biocapteurs (Paramètres enrichis)*

Transducteur	Biorécepteur	Seuil	Temps	Coût	Objet visé	Fonct.	Application	Citation
Transducteurs Optiques								
Optique (SPR)	Anticorps	$\sim 1\,\mu g/L$	$20\,min$	Élevé	Pesticide	Oui	NC	[99]
Optique (SPR)	ADN	$10\,nM$	$15-30\,min$	Élevé	Néomycine B	Oui	Alimentaire	[62]
Optique (Lum.)	Bactérie	$\sim 1\,mg/L$	$30\,min$	Faible	Métaux lourds	Non	Toxicité des eaux	[97]
Optique (Fluo.)	Bactérie	$1\,\mu g/LCu2+$	$\sim 30\,min$	Moyen	Métaux lourds	Oui	NC	[93]
Optique (Lum.)	Bactérie	$5-25\,ng/g$	h	Moyen	Tétracyclines	Non	Alimentaire	[94]
Optique (Fluo.)	Enzyme	$\sim 0,1\,\mu M$	$30-45\,min$	Moyen	β-lactames	Oui	Alimentaire	[43]
Transducteurs utilisant la Masse								
Mag-élastique	Anticorps	$39\,ng/mL$	$30\,min$	Moyen	Albumine	Oui	Médical	[103]
Transducteurs Électrochimiques								
Ampérométrie	Enzyme	$\sim 1\,ppm$	$10-15\,min$	Moyen	Pesticides	Oui	NC	[42]
Ampérométrie	Enzyme	$\sim 1\,mmol/L$	$20\,min$	Moyen	Antibiotiques	Oui	Alimentaire	[44]
Ampérométrie	Enzyme	$\sim 1\,\mu Mol$	$5\,min$	Faible	Acide lactique	Oui	Médical	[108]
Ampérométrie	Levure	$0,5\,mg/L$	$1\,h$	Moyen	Ions Cuivre	Non	NC	[89]
Potentiométrie	Bactérie	$0,025\,mM$	$10\,min$	Moyen	Pesticides	Oui	NC	[110]
Conductimétrie	Microalgue	$10\,ppb$	$1\,h$	Moyen	Cadmium	Oui	Toxicité des eaux	[114]

1.5 Positionnement de l'étude

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons posé un cadre sur les pratiques environnementales dans l'Union Européenne et les méthodes qui y sont associées. Dans une seconde partie, nous avons établi un panorama des biocapteurs existants en détaillant leurs deux composants principaux : les biorécepteurs et les transducteurs.

Nous proposons dans cette section une revue bibliographique centrée spécifiquement sur les biocapteurs impédancemétriques. Nous verrons d'abord les capteurs impédancemetriques dédiés à la détection de *Escherichia coli* en tant qu'agent pathogène puis nous nous positionnerons vis-à-vis des études utilisant des biocapteurs impédancemétriques qui utilisent *Escherichia coli* pour détecter et quantifier un autre agent pathogène.

Ensuite nous évaluerons l'état de l'art sur la détection de toxicité aquatique à l'aide de biocapteurs bactériens. L'utilisation des bactéries dans un biocapteur impédancemétrique pour une telle détection est un champ émergent. Bien que l'objectif soit de caractériser l'état pollué du milieu, nous privilégions ici la notion de la toxicité, c'est-à-dire l'effet biologique induit, plutôt que la simple présence physico-chimique du contaminant.

Il est à noter que si les travaux traitant de la pollution par un élément spécifique concluent souvent à une causalité directe, le terme de viabilité cellulaire y est parfois galvaudé alors qu'il s'agit rigoureusement d'une corrélation mesurée.

1.5.1 Positionnement dans l'état de l'art

Nous classerons la littérature en deux parties. La première concerne les biocapteurs dédiés à détecter des cellules bactériennes (*Esherichia Coli*) avec un point d'attention sur les seuils de détection limites des dispositifs actuels. La deuxième section concerne les études utilisant les biocapteurs impédancemétriques pour détecter des polluants. Nous verrons dans cette deuxième partie le cas de capteurs fonctionnalisés et le cas des capteurs non fonctionnalisés.

1.5.1.1 Détection de *Esherichia Coli* par capteur impédancemétrique

La figure 1.10 illustre le positionnement des différents capteurs impédancemétriques en fonction du biorécepteur utilisé, de leur limite de détection (en CFU/mL), et de leur état de fonctionnalisation (F pour fonctionnalisée, NF pour Non-Fonctionnalisée). Cette représentation en trois dimensions permet de visualiser les performances relatives des capteurs. Les différents biorécepteurs sont dans des plans différents et représentés par des couleurs différentes. Les capteurs fonctionnalisés sont situés dans la partie supérieure de la figure. Ils montrent généralement une sensibilité supérieure à celle des capteurs non fonctionnalisés, situés sur la partie inférieure. Ceux intégrant une méthode microfluidique avancée sont distingués par des carrés, soulignant l'apport significatif de la microfluidique à l'amélioration de la limite de détection. Finalement, deux études ont été ciblées pour illustrer les performances des biocapteurs dont le coût de fonctionnement reste peu élevé.

Ces deux études se distinguent donc par rapport aux limites de détection, avec des capacités de détection inférieures à 10 CFU/mL sans fonctionnalisation. La première propose un biocapteur utilisant des Enzymes [120] et la deuxième est un capteur sans biorécepteur [105].
Le premier système ne fonctionnalise pas les surfaces des électrodes mais utilise des billes qui sont ensuite détectées sur la surface des électrodes. Le deuxième dispositif détecte des bactéries via un flux et un piégeage permet de réduire le nombre de cellules détectées.

De surcroît, on remarque sur ce graphique d'excellentes performances pour des capteurs fonctionnalisés (< 10 CFU/mL) [120],[118] et également des publications qui n'ont pas mis en avant des seuils de détection [125],[128]. Certaines publications peuvent combiner plusieurs fonctionnalités (microfluidique, flux, piégeage) en plus du biorécepteur [138]. Par exemple, une étude

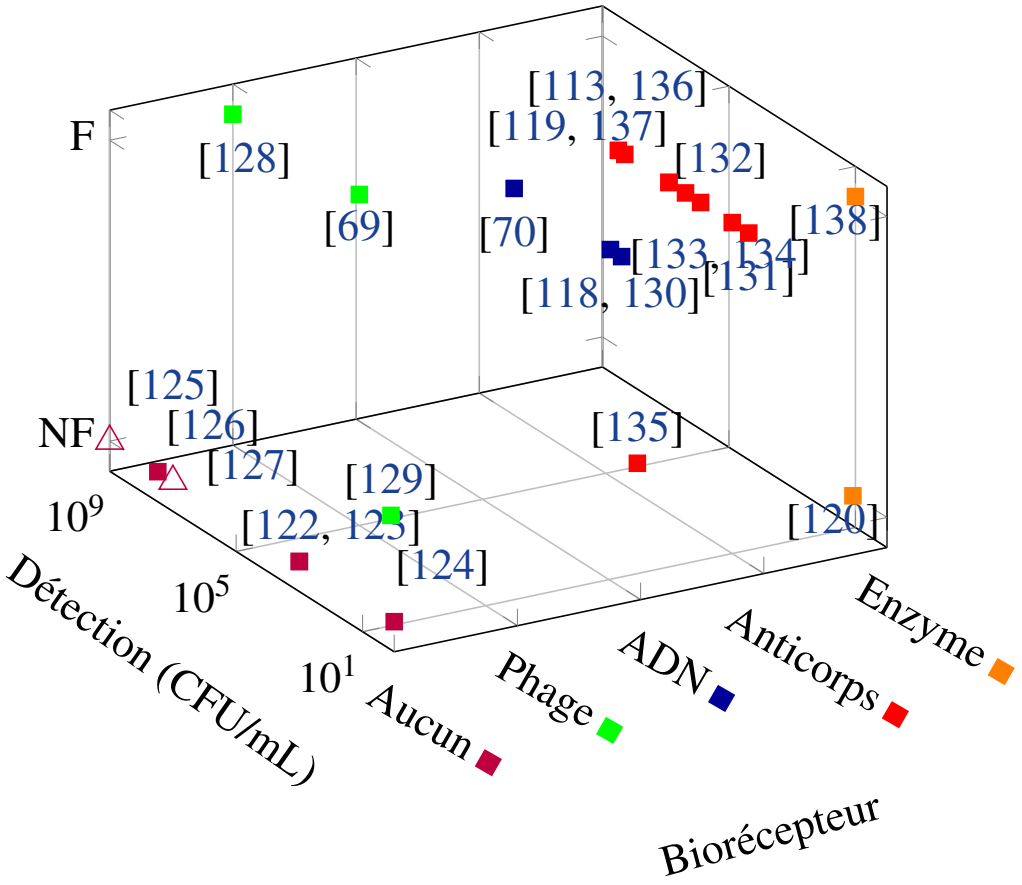


FIGURE 1.10 – *Graphique 3D représentant la sensibilité des capteurs impédancemétriques en fonction du biorécepteur (X), de la limite de détection (Y), et de l'utilisation de fonctionnalisation de surface (Z). Les capteurs utilisant une micro-fluidique avancée sont représentés par des carrés, tandis que les autres sont représentés par des triangles. La couleur indique le biorécepteur utilisé : bordeaux pour ceux n'en utilisant aucun, rouge pour Phage, bleu pour ADN, vert pour Anticorps et orange pour Enzyme.*

utilisant à la fois un flux combiné et une force de diélectrophorèse obtient une sensibilité de 3×10^2 CFU/mL [132]. La majorité des publications se retrouve dans une gamme de détection allant de 10^3 à 10^7 CFU/mL. Les publications comportant des systèmes de mesure sans fonctionnalisation ni fonctionnalités supplémentaire se retrouvent dans la gamme de détection 10^7 à 10^9 CFU/mL [139].

Cette synthèse graphique souligne la sensibilité des capteurs fonctionnalisés par des anticorps, de l'ADN, des enzymes ou des phages par rapport aux dispositifs non fonctionnalisés. Nous pouvons donc nous attendre à ce que la conception d'un biocapteur impédancemétrique sans fonctionnalisation ni fonctionnalités supplémentaires atteigne un seuil de détection limite proche de 10^7 CFU/mL.

1.5.1.2 Biocapteur impédancemétrique pour la détection de toxicité aquatique

Cette partie regroupe les publications abordant les biocapteurs impédancemétriques qui exploitent les propriétés électriques des cellules bactériennes pour détecter et quantifier la présence de substances polluantes. Nous regrouperons des études sur la toxicité mêlant le suivi de populations entières en suspension, de biofilms et de suivi de prolifération comme rappelé par la figure 1.6. De plus, certains systèmes utilisent une μ-fluidique avancée améliorant ces performances. Dans un premier temps, nous examinerons les systèmes utilisant une fonctionnalisation de surface ainsi que ceux qui en sont dépourvus dans le tableau 1.4.

Toutes les études présentées sur le tableau 1.4 ont des temps de détection inférieurs à deux heures. On retrouve des seuils très faibles de détection pour les antibiotiques. Une étude utilisant des électrodes fonctionnalisées par anticorps immobilisés a permis de détecter en moins de 90 minutes plusieurs antibiotiques couramment utilisés tels que l'Ampicilline, la Ciprofloxacine, l'Erythromycine et la Méthicilline, avec une grande efficacité grâce à un système microfluidique [142]. De même, une autre recherche utilisant une électrode à base de graphène fonctionnalisé par des anticorps a permis une détection extrêmement rapide (5 minutes) d'Enrofloxacine et d'Ampicilline à des concentrations aussi faibles qu'environ $0,1$ nM [141]. Ces derniers résultats dépendent des seuils de sensibilité de chaque souche et ne peuvent donc pas être comparés aisément. Certaines études utilisent des polymères spécifiques comme le 3-APBA ou le p(NIPMAM), augmentant ainsi la sensibilité et la sélectivité de la détection envers certains antibiotiques tels que l'Ampicilline ou encore la Ceftriaxone à des seuils bas ($\sim 10\,\mu$g/L et $\sim 10\,\mu$g/mL respectivement) [143]. Les capteurs impédancemétriques fonctionnalisés utilisant des cellules entières sont donc très performants, avec un temps de détection très court, permettant des utilisations nouvelles.

Toutefois, ce gain en rapidité et en sensibilité se fait souvent au prix d'une fragilité et de coûts élevés inhérents aux étapes de fonctionnalisation. En effet, l'utilisation de biorécepteurs délicats ou de réactifs potentiellement toxiques pose des défis majeurs en termes de stabilité et de sécurité, limitant pour l'instant la robustesse de ces dispositifs hors laboratoire.

Les capteurs impédancemétriques non fonctionnalisés tirent parti des variations intrinsèques des propriétés électriques des bactéries en réponse à l'exposition à des polluants [149][150]. Ces dispositifs sont souvent utilisés pour suivre la mortalité cellulaire, la croissance ou la prolifération de populations bactériennes soumises à des traitements chimiques. Cinq publications représentatives ont été regroupées dans le tableau 1.4. Par exemple, une étude utilisant des électrodes interdigitées sans fonctionnalisation a permis de surveiller en moins d'une heure la réponse de bactéries telles que *E. coli*, *K. pneumoniae* ou encore *P. aeruginosa* à plusieurs antibiotiques couramment utilisés comme la Ciprofloxacine, la Gentamicine et l'Ampicilline [145]. Une autre approche similaire, réalisée en 20 minutes, a permis l'observation rapide de l'effet de huit antibiotiques (dont la Colistine et l'Ampicilline) sur la viabilité cellulaire, toujours sans recours à une fonctionnalisation particulière [77].

Cible bactérienne	Observation cellulaire	Électrode	Fonctionnalisation	μ-fluidique	Temps de détection	Agent visé	Réf.
E. coli, *P. aeruginosa*	Cytotoxicité	3 électrodes	Gel « pseudo-fonctionnalisé »	Non	90 min	Amoxicilline, Fosfomycine, Gentamicine ($\sim 8\,\mu g/mL$)	[140]
S. typhimurium	Cytotoxicité	Graphène	Anticorps (immobilisés) parois semi-perméable	Oui	5 min	Enrofloxacine, Ampicilline ($\sim 0.1\,nMol$)	[141]
E. coli, *S. aureus*	Cytotoxicité	Électrodes interdigitées	Anticorps (immobilisés)	Oui	$<$ 90 min	Ampicilline, Ciprofloxacine, Érythromycine, Daptomycine, Gentamicine, Méthicilline	[142]
E. coli	Cytotoxicité	3D interdigitées	p(NIPMAM) + PEI	Oui	$<$ 20 min	Ampicilline ($\sim 10\,\mu g/L$)	[143]
S. epidermidis, *S. pyogenes*, *E. coli*	Cytotoxicité	Interdigitées	Anticorps	Non	2 heures	Flucloxacilline	[144]
E. coli, *K. pneumoniae*, *S. aureus*	Mort, Prolifération cellulaire	Interdigitées	Non	Non	20 min	Colistin, Imipenem, Cefoxitin, Ampicilline, Rifampicine, Triméthoprime, Gentamicine, Ciprofloxacine ($10\mu g/mL$)	[77]
K. pneumoniae, *A. baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*	Cytotoxicité	Interdigitées	Non	Oui	$<1H$	Ciprofloxacine, Doxycycline, Colistine, Imipenem, Gentamicine, Ceftazidime	[145]
K. rubiacearum	Biofilm, Prolifération cellulaire	3 électrodes	Non	Fluidique	$<12H$	Chlore	[146]
Mycobacterium smegmatis, *Mycobacterium bovis*	Cytotoxicité, Prolifération cellulaire	Interdigitées	Non	oui	$<12H$	Amikacine	[147]
S. aureus	Cytotoxicité, Prolifération cellulaire	Interdigitées	Non	Fluidique	$<12H$	Tétracycline, Kanamycine, Méthicilline	[148]

TABLEAU 1.4 – *Études utilisant des biocapteurs impédancemétriques pour la détection de polluants en présence de bactéries avec et sans fonctionnalisation de surface.*

Par ailleurs, certains capteurs non fonctionnalisés permettent le suivi prolongé de la formation de biofilms ou de la biomasse bactérienne. Ainsi, l'effet du chlore sur la croissance de *K. rubiacearum* a été surveillé grâce à un système fluidique équipé de trois électrodes pendant une durée allant jusqu'à 12 heures [146].

De la même manière, la détection prolongée de l'Amikacine sur des souches de mycobactéries a été réalisée par spectroscopie d'impédance microfluidique (m-EIS) sur des électrodes interdigitées, offrant une sensibilité intéressante dans un cadre temporel similaire [147]. Enfin, des électrodes interdigitées spécifiques en forme d'ondes, couplées à des systèmes fluidiques, ont permis de détecter les effets inhibiteurs d'antibiotiques tels que la Tétracycline, la Kanamycine et la Méthicilline sur la croissance bactérienne de *S. aureus* sur une période de 12 heures [148]. On remarque deux tendances dans ce tableau. Premièrement, les études de biomasse et de biofilm avec des temps d'analyse sur plusieurs heures. Deuxièmement, les études de toxicité sur des cellules qui s'approchent de la CMI (concentration minimale d'inhibition)[77], ([151][152][153] complémentaire au tableau). Ces études ont été menées dans le cadre de programmes de recherche orientés vers la biorésistance et la création de nouvelles particules biocides. Cette comparaison détaillée entre capteurs fonctionnalisés et non fonctionnalisés montre que les dispositifs ayant une fonctionnalisation des surfaces sont plus sensibles et rapides. Cependant les biocapteurs impédancemétriques non fonctionnalisés sont capables de performances proches d'après des travaux récents (2022 et 2023) [77],[145].

L'absence de fonctionnalisation rend surtout ces capteurs plus simples à concevoir et à mettre en œuvre, puisqu'aucune étape technologique supplémentaire n'est ajoutée à la fabrication de la fonction de détection. L'absence de traitement des électrodes augmente en outre la stabilité dans le temps et la durabilité des électrodes. Enfin, la combinaison de ces deux aspects se répercute sur les coûts, avec des dispositifs moins onéreux à fabriquer et à utiliser, ce qui renforce leur attractivité dans un contexte de crise des ressources mondiales.

En conclusion, les études recensées démontrent l'efficacité des biocapteurs impédancemétriques pour la détection rapide de polluants antibiotiques dans l'eau. Les dispositifs dont la surface est fonctionnalisée par des anticorps, des polymères ou des gels spécifiques affichent généralement les limites de détection les plus basses, atteignant parfois le nanomolaire en moins de 90 minutes. L'intégration de microfluidique avancée contribue à ces performances en améliorant les transferts de masse et en réduisant les volumes d'analyse. Toutefois, certains capteurs non fonctionnalisés obtiennent des sensibilités comparables aux capteurs fonctionnalisés. Ces systèmes se distinguent par leur simplicité de fabrication et nécessitent souvent des concentrations d'antibiotiques plus élevées ou des temps de suivi prolongés. Les capteurs destinés à la détermination rapide de la CMI s'inscrivent dans la lutte contre la biorésistance et le développement de nouveaux agents antimicrobiens ou une potentielle détection de pollution et de toxicité aquatique. À l'inverse, les approches basées sur le suivi de la prolifération, de la viabilité ou de la formation de biofilms fournissent des informations toxicologiques globales, pertinentes pour une surveillance environnementale à long terme. Le choix entre capteurs fonctionnalisés et non fonctionnalisés dépend donc du compromis recherché entre vitesse, sensibilité, coût et robustesse. En définitive, la spectroscopie d'impédance appliquée aux bactéries constitue une voie potentielle pour la surveillance de la qualité de l'eau, a minima dans un contexte d'incident chimique.

1.5.2 Cahier des charges

Ce projet de thèse s'inscrit dans un projet plus vaste de conception d'un biocapteur multimodal (mêlant plusieurs technique de détection) intégré sur verre permettant une détection rapide (inférieure à 5 minutes), fiable et réutilisable de la toxicité aquatique grâce à la réponse rapide des bactéries. La détection de la toxicité aquatique s'entend ici dans le cadre limité des incidents chimiques. Il s'agit d'obtenir une information de seuil d'alerte et non de quantification ni d'identification. Ce projet de recherche repose sur la synergie d'équipes aux expertises complémentaires,

issues du CBSA (Communication Bactérienne et Stratégies Anti-infectieuses) et du COBRA (Chimie Organique et Bioorganique : Réactivité et Analyse) à Rouen, ainsi que de l'IGE (Institut des Géosciences de l'Environnement) et du G2Elab (Grenoble Génie Electrique) et le CROMA (Centre de Radiofréquences, Optique et Micronanoélectronique des Alpes) à Grenoble, et enfin le LAAS (Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes) à Toulouse, combinant ainsi les compétences nécessaires à la création d'un biocapteur multimodal. Le biocapteur devra être fabriqué sur un substrat en verre, choisi spécifiquement pour sa robustesse chimique, sa biocompatibilité, sa stabilité dans des environnements aqueux et ses faibles pertes optiques, le rendant parfaitement adapté à des mesures environnementales en conditions réelles. Ce dispositif utilisera la réponse rapide des bactéries à des polluants toxiques comme mécanisme de détection. Il devra également être conçu pour permettre ultérieurement l'incorporation de mesures optiques issues des travaux de thèse de Mathilde Gardies [154], le rendant encore plus performant ou versatile. Ces perspectives seront énoncées en fin de manuscrit.

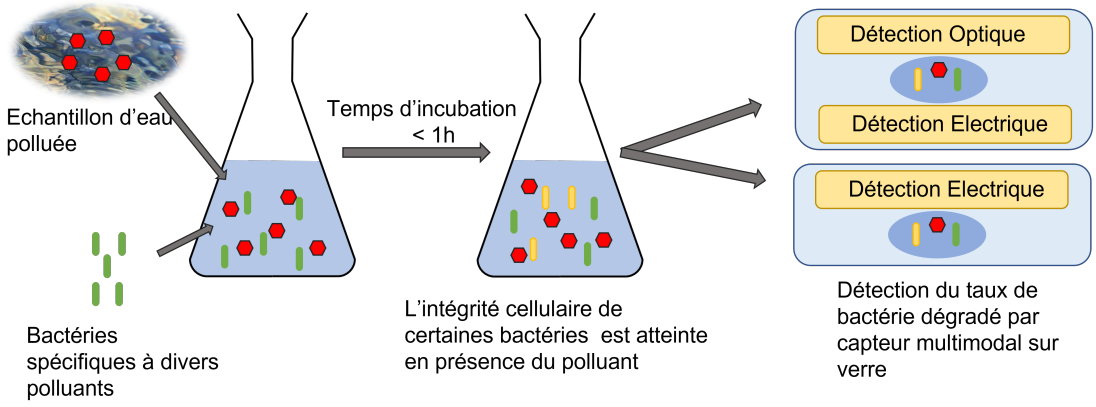


FIGURE 1.11 – *Schéma de principe du capteur multimodal intégré sur verre.*

Une particularité majeure du projet est l'absence de fonctionnalisation de la surface, facilitant grandement a priori les étapes de nettoyage et de désinfection, ainsi que la réutilisation du capteur, tout en garantissant une robustesse chimique optimale et un coût réduit. Comparé aux techniques analytiques classiques du tableau 1.2, notre capteur se distinguera donc par sa simplicité et sa capacité de suivi en temps réel. Il offrira ainsi une alternative robuste et réutilisable, adaptée à des mesures prolongées directement en milieu aqueux complexe. Plus concrètement encore, le premier objectif de ce travail de thèse porte sur la conception, la réalisation et le test d'une cellule de mesure impédancemétrique à des échelles méso puis microscopiques visant à étudier la réponse des bactéries à l'effet de polluants. A partir d'une étude préliminaire réalisée par Médéric Vindret lors de ses travaux de recherche [155], nous allons présenter la conception et le test d'un prototype mésoscopique avec des électrodes en vis-à-vis puis un deuxième prototype plus intégré avec un jeu d'électrodes interdigitées sur verre.

Le deuxième objectif consiste à utiliser ces prototypes pour mesurer la réponse électrique des bactéries saines et de celles traitées par la chaleur, puis sur des populations de bactéries soumises à un polluant spécifique et un plus générique. Il s'agit de confirmer que nous sommes capables de détecter le traitement des bactéries avec le premier et de généraliser notre étude avec le second.

Conclusion

Ce premier chapitre a présenté les méthodes de détection de contrôle de la qualité de l'eau douce dans l'environnement. Les normes appliquées dans nos pays européens sont liées à des méthodes performantes mais également coûteuses énergétiquement. L'essor des biocapteurs répond à un besoin d'évolution des méthodes de détection dans une société de surconsommation à fort risque d'accident chimique. Il y a notamment un besoin de créer des méthodes de détection transportables, robustes, à bas coût et rapides. Les biocapteurs sont très divers car ils regroupent des combinaisons de biorecepteurs (ADN, Phage, Enzyme, Anticorps, Cellules), de transducteurs (optique, électrique, masse) et de diverses fonctions comme l'utilisation de flux. La sensibilité des biocapteurs peut rivaliser avec les méthodes actuelles de mesure pour les capteurs dont la surface est fonctionnalisée. Dans l'objectif de privilégier une mesure de la toxicité par opposition à une identification spécifique nécessitant une fonctionnalisation de surface, nous avons opté pour un capteur à surfaces nues. Ce choix permet d'observer l'effet biologique global sans la complexité des greffages chimiques, tout en garantissant un dispositif bas coût, durable et rapide. Ainsi, le capteur présenté dans ces travaux sera un capteur impédancemétrique utilisant la détection de bactéries. Dans la suite de ces travaux nous étudierons ce capteur pour détecter des bactéries puis l'utilisation de ce dernier pour la pollution de l'eau.
Le chapitre suivant est dédié aux bactéries. Il a pour objectif de proposer un cadre de compréhension de ce matériel biologique d'un point de vue diélectrique mais également d'évaluer l'impact des systèmes et polluants sur les populations bactériennes.

2

La bactérie en tant que biorécepteur

Ce chapitre a pour objectif de présenter synthétiquement des notions essentielles en microbiologie afin de comprendre l'utilisation des bactéries en tant que biorécepteurs, et plus spécifiquement pour une association à un transducteur électrique. En premier lieu, des généralités sur l'anatomie et le métabolisme des bactéries sont brièvement présentées, permettant de percevoir la bactérie en tant qu'organisme vivant. Dans un second temps, l'évolution d'une bactérie dans son milieu aqueux et ionique sera abordée. Pour ce faire, dans le but d'estimer les charges apportées par les bactéries dans un milieu donné mais également de modéliser le comportement d'une bactérie soumise à un champ électrique, nous allons aborder les différentes équations à l'oeuvre dans les modèles électrostatiques existants des cellules et leurs paramètres significatifs. Finalement, une attention particulière sera portée à l'étude de l'évolution d'une population bactérienne en fonction du temps afin de conclure ce chapitre en évoquant la croissance bactérienne et la mort cellulaire.

2.1 Les bactéries du point de vue diélectrique

2.1.1 Généralités sur les cellules procaryotes

Présentes sur terre depuis plus de trois milliards d'années [156], les bactéries ont développé des capacités d'adaptation remarquables, leur permettant de survivre dans des conditions extrêmes. La diversité bactérienne est considérable, avec des milliers d'espèces décrites et une variété de tailles, de formes et de modes de métabolisme, leur permettant de coloniser une large gamme de milieux, qu'ils soient terrestres, aquatiques ou associés à des organismes vivants. Cette diversité a pu s'établir grâce à des résistances acquises sur cette longue échelle de temps, offrant un panel d'études formidable allant des médecines antibactériennes aux radiations. Ces résistances aux chocs et aux environnements rendent également certaines bactéries facilement cultivables et manipulables, ce qui permet de les multiplier et les étudier facilement. D'autre part, c'est l'exploitation des sensibilités bactériennes qui fait l'essor de nos médecines antibactériennes.

2.1.1.1 Les cellules procaryotes

Les arbres phylogénétiques montrant les relations de parenté entre groupes du vivant sont établis à partir de l'étude des séquences d'ARN ribosomiques (ARNr), ce qui permet de remonter aux ancêtres communs et d'identifier les liens de parenté entre différents organismes comme présenté sur la figure 2.1. Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires de la famille des procaryotes, caractérisées par l'absence de noyau, contrairement aux cellules eucaryotes qui en possède un. Leur taille est généralement de l'ordre du micromètre, avec une morphologie extrêmement variée, allant des formes sphériques (coques) aux structures allongées en bâtonnet (bacilles). Dans l'arbre phylogénétique, les *Aquifex* occupent une position plus basale que les bactérie *Thermotoga*, indiquant une divergence plus ancienne. Les bactéries tel que *Escherichia coli*, quant à elles, se trouvent dans le clade [1] des *γ-protéobactéries*.

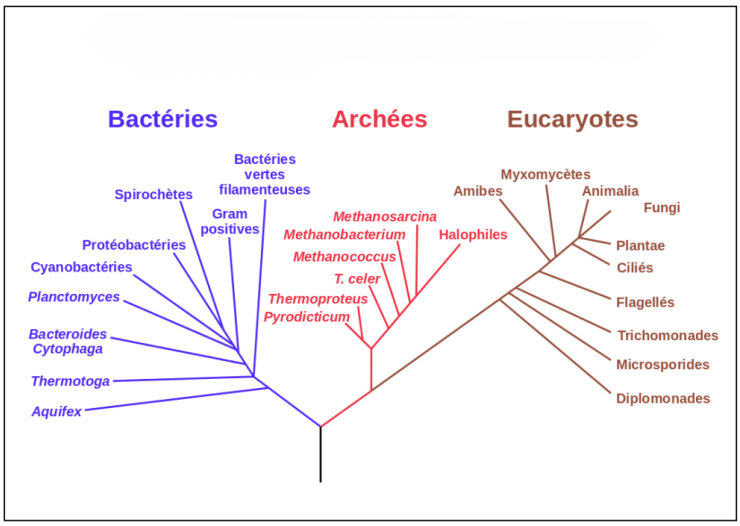


FIGURE 2.1 – *Arbre phylogénétique montrant les relations de parenté entre groupes du vivant. D'après Woese et al. (1990) [158]*

Chaque bactérie est constituée d'une paroi cellulaire (cell membrane en anglais) qui joue un rôle essentiel dans son maintien face aux contraintes de l'environnement et qui enveloppe le cytoplasme. Le cytoplasme est un milieu ionique. C'est le siège du métabolisme cellulaire et du sto-

1. Un clade est un groupe d'organismes, vivants ou ayant vécu, comprenant un organisme particulier et la totalité de ses descendants[157]

ckage du matériel génétique. Ce dernier est constitué d'ions, de chromosomes et de ribosomes. Les chromosomes contiennent l'information génétique, qui est transcrit en ARN messager. L'ARNm est ensuite traduit en protéines par des ribosomes. Les protéines ainsi synthétisées sont utilisées par la bactérie pour divers métabolismes cellulaires. Les principaux composants d'une bactérie sont présenté sur la figure 2.2.

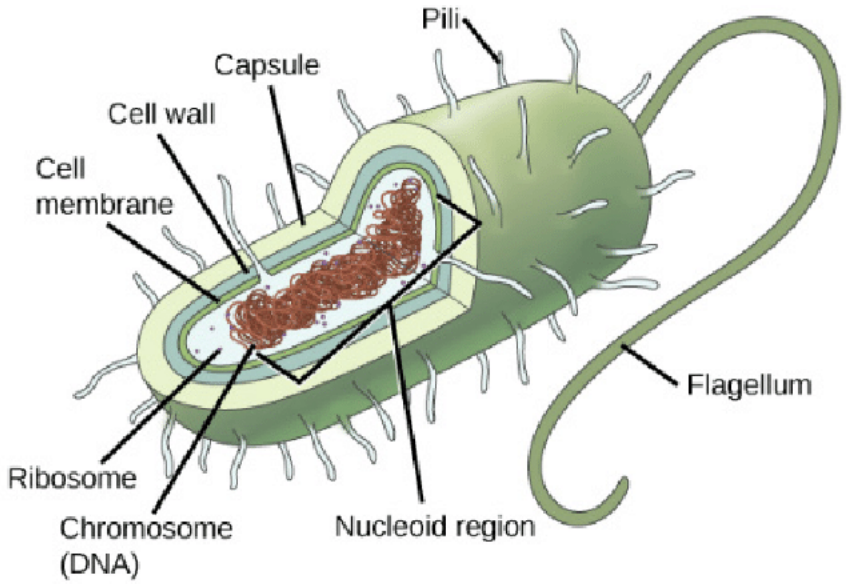


FIGURE 2.2 – *Schéma simplifié d'une bactérie. Tiré de [159]*

2.1.1.2 Les parois cellulaires

Bien que l'arbre phylogénétique soit un outil privilégié pour classifier le vivant, nous préférons utiliser pour cette étude une classification des bactéries basée sur la structure de leur paroi cellulaire.

Ainsi, des groupes tels qu'Aquifex et les Protéobactéries possèdent une paroi dite Gram négative (GRAM-) [160], tandis que d'autres, qualifiés de Gram positifs (GRAM+), forment un groupe distinct par la composition et la structure spécifique de leur paroi.

On distingue ces deux familles de bactérie selon la composition de leurs parois cellulaires. Premièrement, les bactéries GRAM+ avec une seule membrane lipidique, et dont la paroi est constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane (figure 2.3 à gauche). Deuxièmement, les bactéries GRAM- avec deux membranes lipidiques, enveloppant de part et d'autre la paroi cellulaire (figure 2.3 droite). La coloration de Gram, développée par Hans C Gram en 1883, permet de distinguer ces deux familles. En pratique, les bactéries sont GRAM+ si elles fixent le colorant tandis que les secondes sont GRAM- si elles laissent diffuser le colorant. Dans le reste de cette thèse, nous utiliserons les terminologies GRAM+ et GRAM- afin de distinguer ces deux grandes familles de bactérie et leurs caractéristiques.

C'est au niveau de la couche de peptidoglycane (Cell Wall), localisée dans l'espace périplasmique des bactéries GRAM- que s'accumulent divers éléments, notamment lors de la respiration des protons, qui servent à la synthèse de l'Adénosine Triphosphate (ATP) pour le stockage d'énergie. L'ATP est en effet au centre la vie cellulaire car cette molécule organique fournit l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme.

A titre d'exemple, les bactéries *Bacillus* et *Staphylococcus* sont des bactéries GRAM+ et *Escherichia coli* fait partie des bactéries GRAM-. Pour ces travaux de thèse nous avons travaillé

uniquement sur des bactéries à GRAM- afin de limiter le degré de complexité de nos analyses en se concentrant sur un type de mécanisme de parois bactériennes.

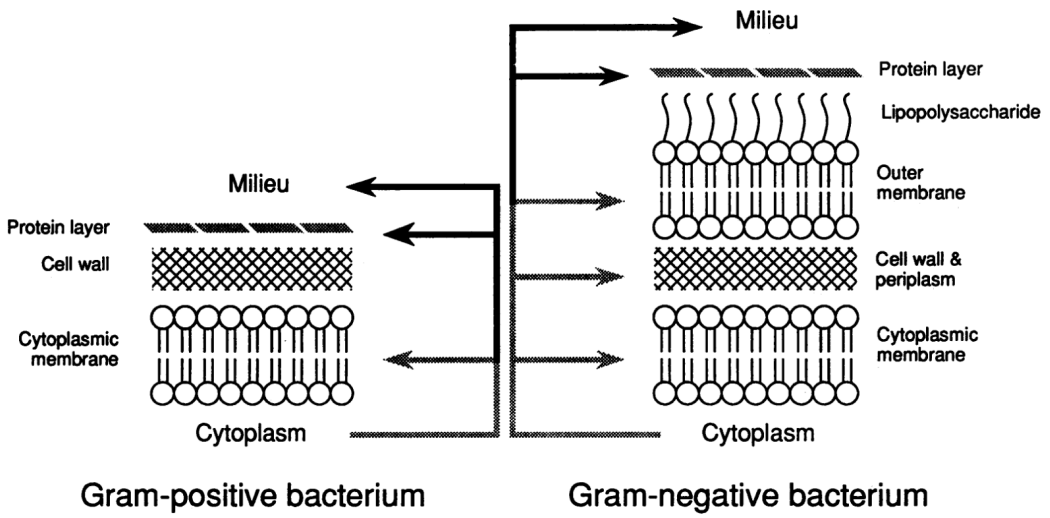


FIGURE 2.3 – *Comparaison par schémas des structures de la paroi cellulaire de bactéries à Gram positif et négatif. Tirée de [161].*

2.1.1.3 Les canaux et les échanges ioniques

Les membranes entourant les bactéries GRAM- empêchent le libre passage des éléments présents dans le milieu extracellulaire vers le cytoplasme. Afin d'assurer les échanges, ces membranes sont traversées par des protéines qui permettent le passage de molécules. Ces protéines appelées porines forment des canaux ioniques hydrophiles au niveau de la membrane externe comme représenté sur la figure 2.4. Les porines permettent donc à certaines molécules présentes dans le milieu de traverser la couche externe par diffusion vers le périplasme en traversant le peptidoglycane.

Ces éléments se retrouvent en contact avec la membrane cytoplasmique. Il s'agit d'une zone clé du transport des diverses substances nécessaires aux bactéries. La membrane cytoplasmique constitue une structure dynamique qui suit le modèle de la « mosaïque fluide » (proposé par Singer et Nicholson en 1972 [162]). Elle est composée d'une bicouche lipidique (phospholipides) et de protéines membranaires (intrinsèques). Ce sont ces protéines qui permettent aux molécules de les traverser. On les nomme canaux ioniques de transport.

Les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule se font alors principalement de deux manières : par transport passif ou par transport actif. Le transport passif ne nécessite pas de dépense d'énergie pour la cellule. Il s'agit de molécules pouvant traverser la paroi par diffusion selon le gradient de concentration présent. Ce transport passif peut avoir lieu via la bicouche lipidique ou par les canaux protéiques. Dans ce dernier cas on parle de diffusion passive facilitée.
Lors d'une diffusion passive facilitée par les canaux protéiques, une molécule (par exemple des ions sodium) traverse la paroi grâce aux forces liées au gradient de concentration.
Par opposition, le transport actif nécessite une dépense d'énergie (ATP) par la cellule. Il permet un échange de molécules dans le sens opposé au gradient de concentration via une pompe protéique. La pompe sodium-potassium ($Na^+ - K^+$) est par exemple une pompe qui permet l'échange de deux éléments dans des sens opposés. On observe deux ions potassium qui entrent dans le cytoplasme pour trois ions sodium qui sortent de la cellule.

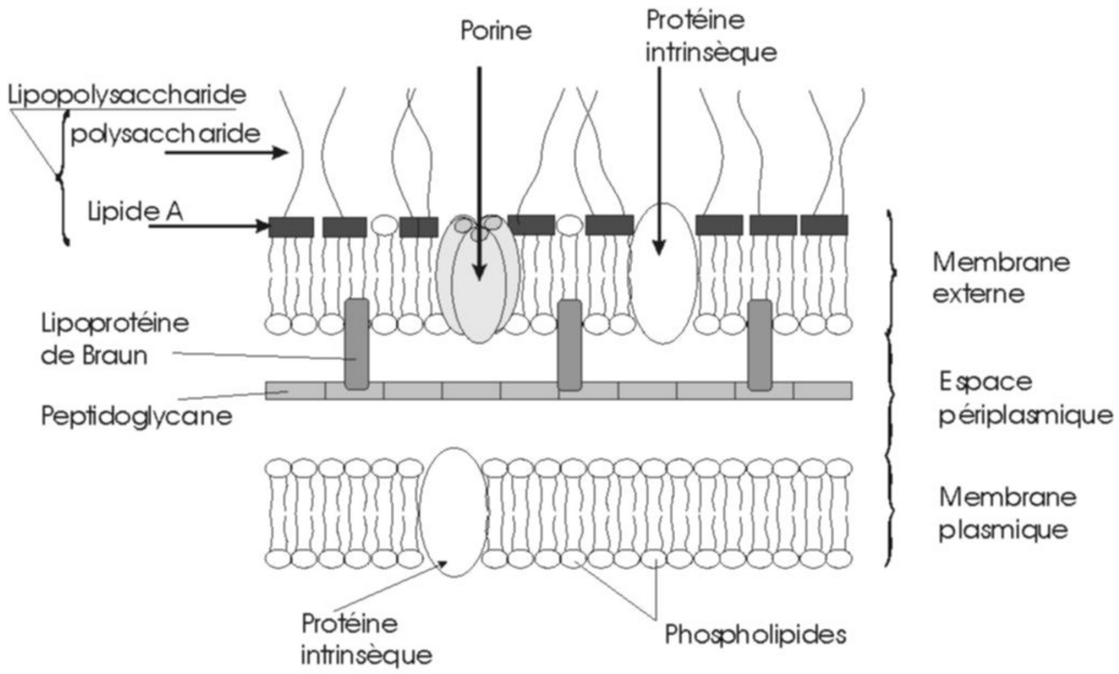


FIGURE 2.4 – *Schéma descriptif des parois d'une enveloppe bactérienne [163].*

2.1.2 La bactérie dans son milieu

Les éléments principaux permettant de définir la bactérie en tant qu'organisme dynamique ont été décrits dans la partie précédente. Dans cette section, les éléments nécessaires à la modélisation diélectrique d'une bactérie sont définis. Pour cela, nous introduisons le potentiel électrique de la membrane bactérienne. Puis, nous proposons une description détaillée des charges présentes à la paroi extérieure de la bactérie. Une représentation diélectrique de la bactérie est également proposée en se basant sur les équations de Maxwell-Wagner. Finalement, nous étudions la bactérie en suspension soumise à un champ électrique.

2.1.2.1 Modèle de Goldman Hodgkin Katz

La bactérie peut être considérée comme un système composé de charges libres, contenues par une paroi quasi-isolante et semi-perméable, et entouré de charges électriques évoluant dans un milieu. Les charges prises en compte dans ce modèle sont liées aux concentrations des ions mis en jeu lors du fonctionnement de cette bactérie. Les concentrations de ces ions ne sont pas forcément identiques de part et d'autre de la membrane.

La distribution inégale d'ions de même espèce k de part et d'autre d'une membrane s'explique par la combinaison de deux facteurs principaux. Premièrement, le **gradient de concentration** (∇C_k), qui tend à faire se déplacer les ions des zones les plus concentrées vers les zones les moins concentrées afin d'atteindre un équilibre. Deuxièmement, la **force électrostatique**, qui cause la répulsion des particules de même signe électrique. La bactérie possède ainsi, pour chaque espèce d'ions k, un potentiel électrique de membrane, également appelé potentiel transmembranaire, qui est relié à ces deux phénomènes.

La loi de Fick, établie en 1855, décrit la diffusion des ions dans un milieu non-homogène suivant le gradient de concentration. L'équation (2.1) reprend cette loi pour un ion d'espèce k :

$$\bar{j}_{kD} = -D_k \nabla C_k \tag{2.1}$$

avec :

— $\bar{j}_{kD}$ = Flux d'ions $[mol/cm^2 \times s]$

— D_k = Constante de Fick (diffusion constante) $[cm^2/s]$

— ∇C_k = Gradient de concentration d'un élément k

Au-delà de la diffusion, les ions sont soumis au potentiel transmembranaire (appelé aussi potentiel de Nernst), noté V_m. Pour une espèce k donnée, il s'agit de la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane pour laquelle la force du gradient de concentration se compense exactement avec la force due au gradient électrique. Dans cette condition, le flux net de l'ion k considéré est nul. Ce potentiel transmembranaire s'exprime grâce à l'équation de Nernst :

$$V_m = \frac{RT}{zF} \ln\Big(\frac{[C_{ext}]}{[C_{int}]}\Big), \tag{2.2}$$

où :

— V_m est le potentiel d'équilibre de l'ion considéré en [V],

— R est la constante universelle des gaz parfaits,

— T est la température absolue en [K],

— z est la valence de l'ion,

— F est la constante de Faraday,

— $[C_{ext}]$ et $[C_{int}]$ sont respectivement les concentrations externe et interne de l'espèce ionique considérée.

À 37 °C, on considère souvent une forme simplifiée :

$$V_m \simeq \frac{61}{z} \log_{10}\Big(\frac{[C_{ext}]}{[C_{int}]}\Big) \quad \text{(en mV à 37 °C)}. \tag{2.3}$$

Les concentrations de quelques ions rencontrés majoritairement dans des cellules eucaryotes et leur environnement naturel donnent les potentiels de Nernst suivants :

— Potassium (K^+) : $V_K \approx -97\,mV$,

— Sodium (Na^+) : $V_{Na} \approx +58\,mV$,

— Chlore (Cl^-) : $V_{Cl} \approx -59\,mV$,

— Calcium (Ca^{2+}) : $V_{Ca} \approx +121\,mV$.

Ces exemples permettent d'illustrer la valeur de potentiel à laquelle chacun de ces ions est à l'équilibre.

L'équation de Nernst s'établit pour un seul ion à la fois, pourtant les milieux d'étude sont composés de plusieurs espèces ioniques. Pour traiter l'ensemble des flux ioniques, on utilise une forme généralisée de l'équation de Nernst, l'équation de Goldman, Hodgkin et Katz (Goldman 1943, Hodgkin et Katz 1949), qui prend en compte la perméabilité relative de la membrane à chaque ion. À 37 °C et pour trois espèces principales (Na^+, K^+ et Cl^-), on peut écrire le potentiel transmembranaire (ou potentiel de membrane) sous la forme :

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln\left(\frac{p_{\mathrm{K}}\,[\mathrm{K}^+]_{\mathrm{ext}} + p_{\mathrm{Na}}\,[\mathrm{Na}^+]_{\mathrm{ext}} + p_{\mathrm{Cl}}\,[\mathrm{Cl}^-]_{\mathrm{int}}}{p_{\mathrm{K}}\,[\mathrm{K}^+]_{\mathrm{int}} + p_{\mathrm{Na}}\,[\mathrm{Na}^+]_{\mathrm{int}} + p_{\mathrm{Cl}}\,[\mathrm{Cl}^-]_{\mathrm{ext}}}\right), \tag{2.4}$$

où p_{K}, p_{Na} et p_{Cl} représentent respectivement la perméabilité de la membrane au potassium, au sodium et au chlore. Cette forme logarithmique décrit précisément comment chaque ion contribue au potentiel de membrane en fonction de sa concentration interne et externe, ainsi que de la perméabilité de la membrane pour chaque ion.

Pour résumer, le potentiel de la membrane appelé potentiel transmembranaire est obtenu par l'équation de Nernst. Dans le formalisme de Goldman, Hodgkin et Katz, cette équation est modifiée pour prendre en compte plusieurs espèces ioniques. On retrouve ces multiples appellations dans la littérature.

2.1.2.2 Potentiel Zêta

Sur le plan biophysique, le potentiel transmembranaire résulte donc de l'équilibre entre deux processus fondamentaux : la diffusion et les forces électrostatiques. D'une part, un gradient de concentration engendre un flux diffusif. D'autre part, chaque type d'ion possède un potentiel d'équilibre propre, directement lié au ratio de ses concentrations intra- et extracellulaires. Finalement, ce potentiel de membrane se définit comme la somme de l'ensemble des contributions ioniques, pondérées par la perméabilité relative de la membrane à chaque espèce. Au sein du métabolisme bactérien, le potentiel transmembranaire occupe une place centrale. Il conditionne la synthèse d'énergie grâce au gradient électrochimique générant la force proton motrice (FPM), indispensable à la production d'Adénosine Triphosphate (ATP). Étant la principale source d'énergie de la cellule, l'ATP confère au potentiel transmembranaire un rôle clé dans la physiologie bactérienne.

Le potentiel transmembranaire traduit donc la différence de potentiel à travers la membrane cytoplasmique, tandis que le potentiel zêta reflète la charge de surface localisée en périphérie de la cellule. Ce deuxième type de potentiel prend en effet également en compte les charges proches de la paroi. D'après les mesures directes par microélectrodes décrites par Felle et al. [164], le potentiel transmembranaire varie en fonction du pH. Or, comme le montre la figure 2.5, le potentiel zêta suit également l'évolution du pH. Ainsi, la mesure du potentiel Zeta constitue un indicateur indirect pour estimer l'état électrique global de la bactérie, en complément des techniques de mesure du véritable potentiel membranaire. L'évolution du potentiel Zeta témoigne donc des changements du potentiel transmembranaire et des caractéristiques de la membrane.

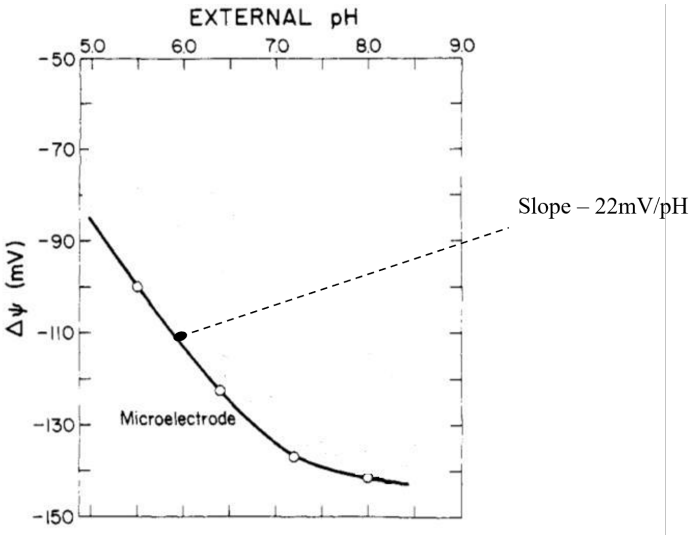


FIGURE 2.5 – *Evolution du potentiel Zeta en fonction du pH pour une souche Escherichia coli K12 depuis [164]*

Sur la figure 2.5 est illustrée la variation du potentiel zeta en fonction du pH externe sur des cellules *Escherichia coli*. Comme l'indique l'étude à l'origine de la figure 2.5, dans le domaine de pH où les cellules restent intactes (intégrité membranaire conservée), la portion du tracé correspondante est quasi linéaire avec une pente d'environ $-22\,mV$ par unité de pH. Pour une valeur de pH 7 dans cette étude, on trouve un potentiel zeta proche de $-130\,mV$. L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de la structure membranaire et de l'intégrité cellulaire dans la régulation du potentiel de membrane en fonction du pH externe. Les cellules bactériennes sont donc complètement dépendantes du milieu dans lesquelles elles évoluent.

2.1.2.3 Nombre de charges associées à une bactérie

Comme nous l'avons vu précédemment, les bactéries évoluent dans un milieu grâce à des échanges ioniques. La présence d'ions liée à la différence de potentiel aux alentours de leurs parois créent une double couche électrique, phénomène fondamental en électrochimie et en microbiologie, souvent décrit par le modèle de Gouy-Chapman-Stern. On dénombre deux couches : une couche de Stern, composée d'ions fortement liés à la surface bactérienne, et une couche diffuse, selon le modèle de Gouy-Chapman, où les ions, plus éloignés de la surface, sont répartis de manière plus diffuse sous l'influence des forces électrostatiques et de diffusion. Cette double couche est représentée graphiquement sur la figure 2.6.

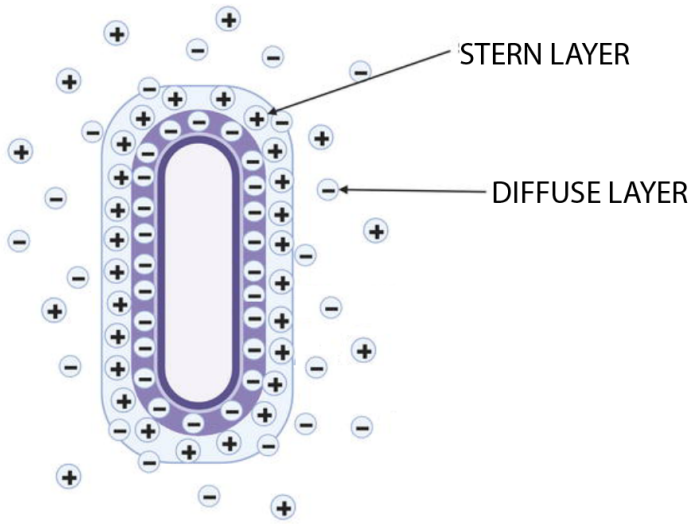


FIGURE 2.6 – *Représentation d'un système bactérien colloïdal illustrant les propriétés de la double couche électrique de Gouy–Chapman–Stern (figure simplifiée d'après [165])*

L'épaisseur de cette double couche dépend de la force ionique du milieu : plus la concentration ionique est élevée, plus la double couche est comprimée, réduisant ainsi la portée du potentiel électrique de surface (souvent approché expérimentalement par le potentiel zêta)

En électrochimie bactérienne, la longueur de Debye (λ_D) caractérise l'épaisseur de la couche diffuse entourant la bactérie. Elle est inversement proportionnelle à la racine carrée de la concentration ionique du milieu, ce qui signifie qu'une augmentation de la force ionique réduit λ_D, comprimant ainsi la double couche. Typiquement, dans des milieux biologiques, λ_D varie de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres. Une longueur d'onde de Debye λ_D plus courte favorise les interactions à courte portée, tandis qu'une λ_D plus longue permet une influence électrostatique plus étendue de la bactérie. La longueur de Debye est donnée par :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 k_B T}{2 N_A e^2 I}} \tag{2.5}$$

où :

— k_B est la constante de Boltzmann, en $[J/K]$.

— T est la température absolue, en $[K]$.

— N_A est le nombre d'Avogadro, en $[mol^{-1}]$.

— e est la charge élémentaire, en $[C]$.

— I est la force ionique, en $[mol/m^3]$ suivant les unités du SI).

La force ionique quantifie l'effet des ions sur les interactions électrostatiques en tenant compte de leur concentration c_i et z_i. z_i est la valence de l'ion i, c'est-à-dire le nombre de charges élémen-

taires qu'il porte (exemple : $z = +1$ pour Na^+). La force ionique est calculée selon la concentration des ions dans la solution :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \tag{2.6}$$

où :

— c_i est la concentration molaire de l'ion i en mol/L.

— z_i est la valence de l'ion i.

D'autre part, la condition de neutralité électrostatique de la double couche impose la relation :

$$\sigma_0 + q_{\text{Stern}} + q_{\text{diffuse}} = 0 \tag{2.7}$$

où :

— σ_0 est la charge de surface de la bactérie.

— q_{Stern} est la charge dans la zone de Stern.

— q_{diffuse} est la charge dans la zone diffuse.

Cette formule permet de quantifier le nombre de charges dans les deux zones autour de la bactérie.

Couche de Stern En ce qui concerne la couche de Stern, nous définissions la densité de charge par unité de surface comme étant :

$$\rho_{\text{Stern}} = \varepsilon_0 \varepsilon_{\text{r}} \cdot \frac{1}{\lambda_D} \cdot V_\zeta \tag{2.8}$$

où :

— ε_0 : Permittivité du vide, en $[F/m]$ $(C^2/(J.m))$.

— ε_{r} : Permittivité relative du milieu (sans unité).

— λ_D : Longueur de Debye, en $[m]$.

— V_ζ : Potentiel zêta, en $[V]$.

On peut voir que nous avons besoin de connaître la force ionique pour pouvoir calculer la longueur de Debye et la densité de charge de la couche de Stern.

Couche diffuse La deuxième zone à décrire correspond à la zone diffuse. Elle s'étend plus loin de la surface et fait l'objet de l'approximation de Gouy-Chapman. Dans ce qui suit, nous détaillons comment la répartition des ions dans cette zone diffuse peut être décrite par l'équation de Poisson couplée à l'hypothèse de Boltzmann, avant d'appliquer l'approximation de petit potentiel (Debye-Hückel). La densité de charge dans la zone diffuse peut être déterminée à partir de l'équation de Poisson :

$$\rho(r) = -\varepsilon_{\text{r}} \varepsilon_0 \cdot \frac{d^2 \psi(r)}{dr^2} \tag{2.9}$$

Pour rappel, le potentiel transmembranaire V_m correspond à la différence de potentiel électrique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, générée par l'activité métabolique et les gradients ioniques à travers la membrane plasmique. Quand à lui, Le potentiel électrostatique local $\psi(r)$ décrit la distribution du potentiel dans le milieu aqueux autour de la cellule, décroissant exponentiellement avec la distance à la surface selon la théorie de Gouy–Chapman. Enfin, le potentiel zêta V_ζ est une valeur particulière de $\psi(r)$ mesurée au plan de cisaillement, qui sert d'indicateur expérimental de la charge de surface bactérienne et de ses variations avec le pH ou la force ionique.

Dans ce cadre, nous faisons l'hypothèse que la distribution des ions suit une loi de type Boltzmann. La couche diffuse peut être assimilée à un électrolyte où tous les ions ont la même valence. La densité de charge $\rho(r)$ d'un tel milieu s'exprime alors comme : $\rho(r) = -ze \cdot (n_+ - n_-)$, où n_+ et n_- désignent respectivement les concentrations des ions positifs et négatifs, z la valence de ces ions, et e la charge élémentaire. Sous l'hypothèse de Boltzmann, les concentrations des ions sont données par :

$$n_+ = n_0 \exp\left(-\frac{ze\psi(r)}{k_B T}\right), \quad n_- = n_0 \exp\left(\frac{ze\psi(r)}{k_B T}\right) \tag{2.10}$$

où n_0 est la concentration des ions en solution en l'absence de perturbation par un potentiel. La densité de charges peut alors être exprimée comme :

$$\rho(r) = -zen_0 \left[\exp\left(-\frac{ze\psi(r)}{k_B T}\right) - \exp\left(\frac{ze\psi(r)}{k_B T}\right)\right] \tag{2.11}$$

Afin de simplifier ces expressions, on effectue l'approximation de petit potentiel, ou approximation de Debye-Hückel, en considérant : $\frac{ze\psi(r)}{k_B T} \ll 1$

En utilisant une approximation de la série de Taylor sur l'exponentielle on peut alors évaluer la densité de charges. Ce développement linéaire est légitime dans les systèmes où le potentiel électrique reste modeste comme c'est le cas dans le voisinage proche d'une bactérie. En substituant cette approximation dans la définition de $\rho(r)$, on obtient l'expression de la densité de charge suivante :

$$\rho(r) \approx \frac{2z^2 e^2 n_0}{k_B T} \psi(r) \tag{2.12}$$

Cette forme montre clairement que, pour des faibles potentiels, la densité de charges libres est directement proportionnelle au potentiel local $\psi(r)$, avec un coefficient de proportionnalité qui dépend de la concentration ionique (n_0), de la valence (z) et de la température (T). En insérant cette expression de $\rho(r)$ dans l'équation de Poisson (2.9), on obtient :

$$-\varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{d^2\psi(r)}{dr^2} = \frac{2z^2 e^2 n_0}{k_B T} \psi(r) \tag{2.13}$$

En réarrangeant, on arrive à :

$$\frac{d^2\psi(r)}{dr^2} = \kappa^2 \psi(r) \tag{2.14}$$

où :

$$\kappa^2 = \frac{2z^2 e^2 n_0}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T} \tag{2.15}$$

La quantité κ^{-1} correspond à la *longueur de Debye* λ_D définie précédemment.

Pour un potentiel zêta V_ζ, nous avons :

$$\psi(r) = V_\zeta e^{-r/\lambda_D} \tag{2.16}$$

Cette solution montre que le potentiel électrostatique décroît rapidement, sur une distance de l'ordre de λ_D, pour tendre vers zéro en s'éloignant à grande distance de la surface de la bactérie, là où la solution est électriquement neutre.

Enfin, pour estimer la densité de charges totale $\rho(r)$ dans la zone diffuse, on réutilise la relation reliant $\rho(r)$ à $\psi(r)$ au voisinage de la surface ($r = 0$) pour établir l'équation (2.17).

Dans ce contexte, le terme « surface » correspond à la limite externe de la paroi bactérienne, c'est-à-dire au début de la couche ionique qui entoure la cellule. Concrètement, c'est à partir de cette position ($r = 0$) que l'on décrit la décroissance du potentiel $\psi(r)$ dans la couche diffuse selon le modèle de Gouy–Chapman. La couche de Stern, qui correspond aux ions fortement adsorbés

directement sur la paroi, est considérée comme faisant partie de la surface effective et n'est pas explicitement décrite par l'équation (2.16).

$$\rho_{\text{diffuse}} = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{V_\zeta}{\lambda_D^2} \tag{2.17}$$

Le modèle de Poisson-Boltzmann linéarisé (ou Debye-Hückel) permet ainsi de décrire le comportement du potentiel électrique et de la densité de charges dans la zone diffuse lorsque l'écart de potentiel reste faible. Malgré sa simplicité, il fournit une approximation dans de nombreux contextes (électrochimie, interactions à la surface des microorganismes, etc.), en particulier pour des concentrations ioniques et des potentiels modérés.

2.1.2.4 Nombre de charges au voisinage de la paroi d'une bactérie

Grâce aux équations (2.8) et (2.17) qui établissent les densités de charges des couches de Stern et diffuse, nous pouvons calculer le nombre de charges à l'extérieur d'une bactérie pour plusieurs types d'ions. Cette démarche permet d'abord de quantifier l'ordre de grandeur des charges électriques présentes autour de la bactérie, en considérant à la fois la couche de Stern et la zone diffuse. Elle répond au besoin de disposer d'une estimation initiale pour interpréter d'éventuelles variations de conductivité lorsque les bactéries sont mises en suspension. Finalement, la mise en évidence d'un nombre de charges significatif autour de la bactérie démontre l'intérêt de cette approche pour comprendre et prédire le comportement électrochimique cellulaire.

Pour réaliser une estimation nous allons prendre les paramètres suivants en compte :

— Une bactérie cylindrique de $2\,\mu$m de long et de $0.5\,\mu$m de large
— La force ionique associée à une solution de Na^+Cl^- à $5\,g/L$ soit $0.0856\,mol/L$ vaut : $85,6\,mol/m^3$
— Longueur de Debye associée : $1,04 * 10^{-9}\,m$
— La surface de la bactérie considérée : $3,14 * 10^{-12}\,m^2$
— Le volume autour de la bactérie avec une présence de charges prise en compte pour la zone diffuse de : $3,14 * 10^{-12} * 1,04 * 10^{-9} = 3,14 * 10^{-21}\,m^3$.
— Un potentiel zêta de $-50\,mV$ [166-168]

Dans ces conditions, nous pouvons réaliser une estimation du nombre de charges dans la couche de Stern grâce à l'équation (2.8). En effet, le nombre de charges est obtenu en calculant la densité de charges sur l'ensemble de la surface divisée par la charge élémentaire. Le nombre de charges dans la couche de Stern vaut alors $1,625 \times 10^6$.
En ce qui concerne la couche diffuse, avec ces mêmes conditions, nous pouvons réaliser une estimation via l'équation (2.17). Le nombre de charges dans la couche diffuse vaut alors 2×10^6.
Ces deux estimations permettent d'obtenir un ordre de grandeur du nombre de charges présent autour d'une bactérie. Cette approche en termes de charges permet d'anticiper des résultats de conductivité lors de mise en suspension des bactéries. Ces valeurs donnent seulement un ordre de grandeur et restent à pondérer. En effet, la valeur du potentiel membranaire est sous-estimée par ce calcul. En pratique le nombre de charges impliquées est plus grand pour les couches de Stern et diffuse. De plus cette application numérique ne prend en compte que des ions Na^+Cl^- or les milieux où évoluent les bactéries sont bien plus complexes. Finalement, cette valeur n'inclut pas les ions résiduels du milieu de suspension ainsi que le contenu cytoplasmique potentiellement partiellement diffusé dans la solution.

2.1.2.5 Dispersion électrique des matériaux biologiques

Lorsqu'une suspension liquide de bactéries est insérée entre deux électrodes planaires et qu'une tension sinusoïdale à fréquence variable est appliquée on observe des phénomènes de polarisation et de dispersion diélectrique dus aux ions dans le milieu.

La figure 2.7 illustre le spectre de permittivité complexe des milieux contenant des cellules biologiques dans de telles conditions, mettant en évidence les différentes gammes de dispersion en fonction de la fréquence appliquée. La permittivité réelle atteint sa valeur maximale à basse fréquence et diminue progressivement en formant des paliers successifs, définissant des plages de fréquences. Sur cette figure, des fréquences typiques sont présentées mais les limites des plages diffèrent selon le matériel biologique étudié. Ce comportement traduit la réponse diélectrique des divers éléments du milieu et des bactéries soumis au champ électrique. On observe principalement trois types de dispersion : (i) En basse fréquence (moins de 100 Hz), la dispersion α, liée aux processus de diffusion des espèces ioniques proche des électrodes (phénomènes abordés dans le chapitre 3), comme l'illustre la figure 2.8 ; (ii) Pour les fréquences autour de 10 KHz, la dispersion β, attribuée à la polarisation de la membrane et aux interactions entre les électrolytes intra et extra-cellulaires comme présenté sur la figure 2.9 ; et (iii) Autour de 10 GHz, la dispersion γ, qui résulte de la contribution dipolaire de l'eau et des petites molécules dans le milieu cellulaire.

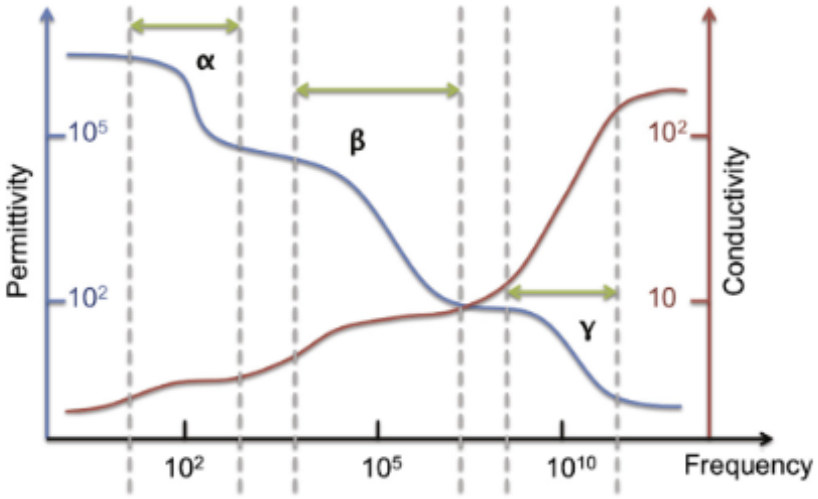


FIGURE 2.7 – *Spectre de permittivité et de conductivité d'un milieu biologique en fonction de la fréquence mettant en évidence les dispersions α, β et γ. [124].*

De manière générale, par nature, les résultats expérimentaux obtenus dans la gamme de fréquence correspondant à la dispersion α dépendent très fortement de l'état de surface des électrodes qui servent à appliquer un champ électrique au milieu ionique dans lequel baignent les bactéries. Nous nous intéresserons donc plutôt aux fréquences entre 1 kHz et 100 MHz pour évaluer l'état des bactéries. Ceci correspond à la dispersion β (représentée sur la figure 2.9).

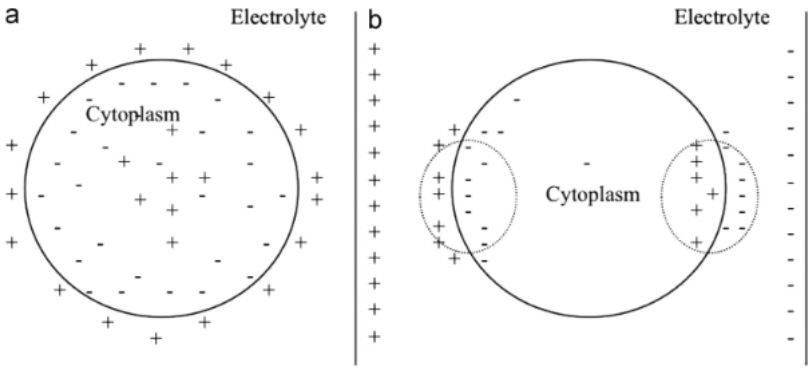


FIGURE 2.8 – *Représentation de la répartition des charges autour d'une bactérie dans le régime de la dispersion alpha : (a) schéma d'une cellule immergée dans un milieu (électrolyte) comme une culture bactérienne, la membrane de cette cellule est considérée comme un diélectrique parfait ; et (b) la formation d'un dipôle dû au champ électrique appliqué. [71]*

La figure 2.8 illustre le phénomène de polarisation interfaciale décrit par l'effet Maxwell-Wagner. Lorsqu'une cellule est immergée dans un milieu de culture contenant des ions, elle développe une double couche électrique autour de sa membrane plasmique non conductrice comme vu précédemment. Dans le début des plages de fréquence de la dispersion β cette distribution de charges est modifiée entraînant une accumulation des charges à l'interface paroi milieu.

Ainsi le début de la dispersion β permet de donner un état sur la qualité des parois cellulaires en tant que barrière ionique. Ceci demande un contrôle fin du milieu et de la concentration cellulaire.

En effet, cette dispersion β permet d'étudier plus spécifiquement la paroi grâce aux variations de permittivité induites par les lignes de champ qui commencent à traverser les parois dans cette plage de fréquences comme le montre la figure 2.9. De plus, cette gamme de fréquences permet de s'affranchir de l'influence de la réponse diélectrique liée à la polarisation du milieu proche des électrodes.

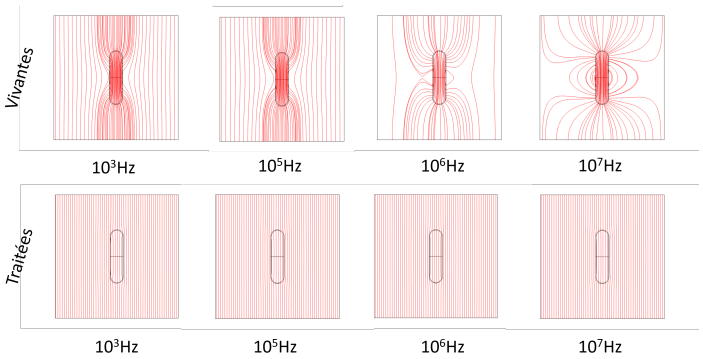


FIGURE 2.9 – *Représentation de la distribution des lignes de courant dans un système contenant deux cellules ; premièrement saine (vivantes) et deuxièmement dont les parois sont endommagées (Traitées) en fonction de fréquences (*10^3,10^5,10^6 *et* 10^7 Hz*) dans de l'eau désionisée.*

À haute fréquence, la membrane devrait théoriquement devenir quasi transparente, mais la différence de conductivité entre le cytoplasme et le milieu externe (rapport $\sim 10^3$) maintient un contraste marqué aux interfaces. Ce contraste explique la persistance de la distorsion des lignes de champ jusqu'au GHz (non illustré sur la figure 2.9).

2.1.3 Physiologie des populations bactériennes

Cette section introduit quelques éléments de biologie pour prendre en compte l'évolution de la bactérie dans son environnement. Pour cela nous abordons la division cellulaire des bactéries puis la dynamique de croissance d'une population bactérienne et sa mesure. Nous concluons ce cadrage en évoquant la mort cellulaire.

2.1.3.1 Scissiparité

La scissiparité, ou fission binaire, est le mode de reproduction le plus courant chez les procaryotes. L'ensemble de ce processus est présenté sur la figure 2.10. Elle commence par la réplication du chromosome circulaire. La réplication progresse dans deux directions, ce qui permet un dédoublement rapide du matériel génétique. Pendant ce temps, la cellule s'allonge et la protéine FtsZ se concentre au milieu pour former un anneau. Cet anneau, appelé anneau FtsZ, définit le site où se formera le septum séparant les deux futures cellules. C'est au niveau de l'anneau FtsZ que la synthèse de la nouvelle paroi se déroule. Les éléments de la membrane et de la paroi, notamment le peptidoglycane, s'accumulent au niveau du septum. Le peptidoglycane est crucial pour la rigidité et la protection contre la pression osmotique. Une fois le septum formé, la cellule se scinde en deux cellules filles génétiquement identiques. Cependant, cette synthèse de la paroi, notamment du peptidoglycane, est un point de fragilité et une cible privilégiée pour modifier la viabilité cellulaire. Une mauvaise structuration du septum pourra entraîner une incapacité de se reproduire. Une UFC (Unité Formant Colonie) correspond à une entité viable (cellule ou agrégat) capable de former une colonie visible après incubation sur milieu gélosé. Les concentrations sont exprimées en UFC/mL pour les milieux liquides.

2.1.3.2 La croissance bactérienne

La reproduction bactérienne repose sur la fission cellulaire, donnant naissance à deux cellules filles génétiquement identiques à la cellule mère. Pour croître et se multiplier, les bactéries nécessitent des sources de nutriments et d'énergie. Ces ressources sont puisées dans leur environnement. Dans le cadre de cette étude, le type de bactéries étudiées est chimiotrophes, tirant leur énergie de réactions chimiques, et aérobies (ou microaérobies). Elles se développent dans des conditions de température modérée (mésophiles), typiques des espèces fréquemment rencontrées dans les environnements communs et associés aux être vivants. Pour leur culture, un milieu nutritif adapté est utilisé, en particulier le milieu Lysogeny Broth (LB) appelé souvent de manière abusive Luria Bertani en raison de son inventeur G. Bertani [170], une solution contenant du NaCl et divers nutriments. L'incubation des cultures est réalisée à 30 °C ou 37 °C selon l'espèce étudiée. Les bactéries peuvent être présentes sous forme de cellules libres en suspension. La croissance bactérienne englobe à la fois la division des bactéries et le nombre de bactéries dans un milieu nutritif fixe comme présenté sur la figure 2.11. On retrouve alors six phases distinctes :

— **Une phase de latence :** Le nombre de divisions bactériennes par unité de temps est nul, il s'agit du temps nécessaire aux bactéries pour s'adapter au milieu.

— **Une phase d'accélération de la croissance :** La division des bactéries commence à avoir lieu.

— **Une phase de croissance exponentielle :** Le taux de production bactérien est alors à son maximum, suivant une relation exponentielle.

— **Une phase de décélération :** Le manque progressif d'éléments nutritifs dans le milieu entraîne un ralentissement de la division bactérienne.

— **Une phase de stabilisation :** Le nombre de bactéries reste stable, la division des bactéries à toujours lieu mais elle est compensée par la mort des bactéries due à une saturation du nombre de bactéries ou à un manque d'éléments nutritifs.

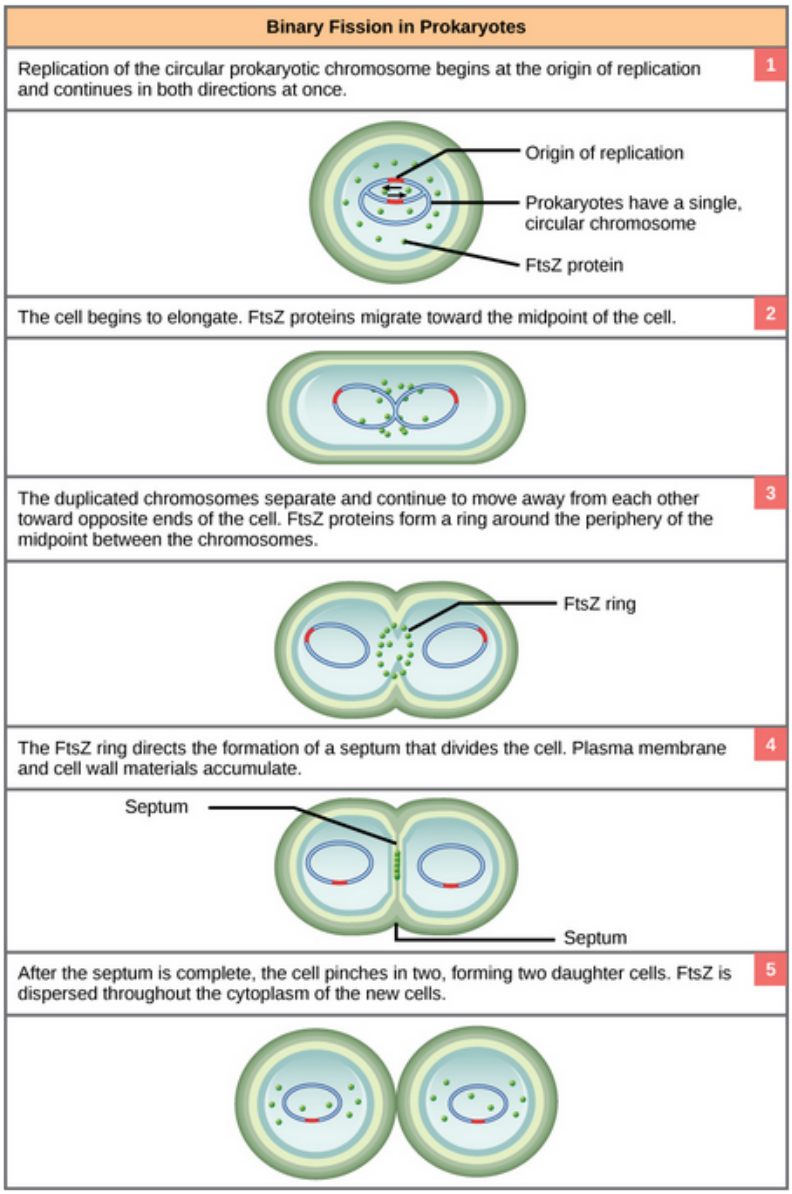


FIGURE 2.10 – *Schéma montrant la fission des cellules procaryotes nommée scissiparité [169].*

— **Une phase de déclin :** Le manque d'éléments nutritifs ou l'augmentation des déchets entraîne une diminution du nombre de bactéries.

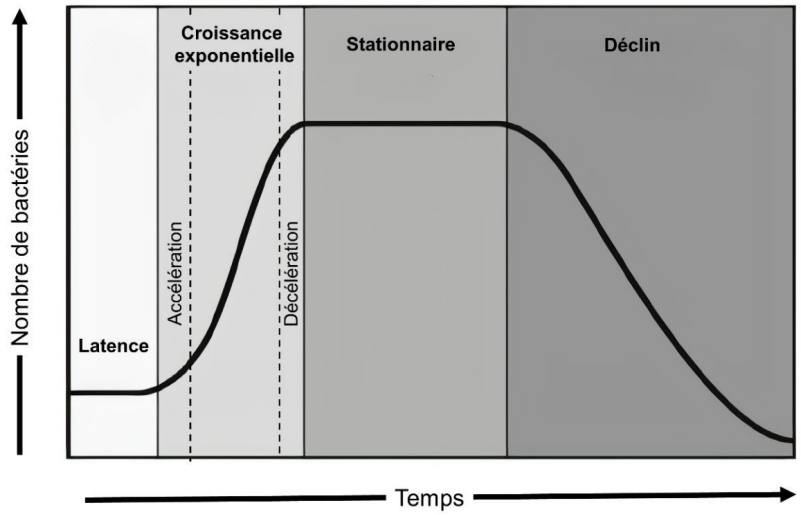


FIGURE 2.11 – *Courbe de la croissance bactérienne [171].*

2.1.3.3 Lien entre la concentration bactérienne et la densité optique

Lors de l'incubation dans le milieu de croissance d'une Unité Formant Colonie (UFC) nous observerons ces quatre étapes. La bactérie *Escherichia coli* peut réaliser une division cellulaire toutes les 20 minutes, ce qui permettra à la solution d'atteindre, après 6 à 7h, une concentration de plusieurs milliards de bactéries par millilitre comme présenté sur la figure 2.12. Afin de mesurer la quantité de matériel biologique dans nos échantillons, nous utiliserons une mesure par densité optique (DO) à une longueur d'onde proche de $600\,nm$. La DO est une mesure d'absorbance optique largement répandue en microbiologie qui exploite la diffusion de Mie exercée par les cellules sur un signal lumineux traversant l'échantillon. Il est ainsi possible de suivre la progression du nombre de bactéries lors de la croissance d'une solution. On remarquera que les mesures, calibrées et indiquées OD_{600} sur la figure, inférieures à 0,01 correspondent à la fin de la phase de latence. On peut également associer la phase de décélération à une OD_{600} supérieure à 1.

2.1.3.4 La mort cellulaire

Dans l'objectif d'être le plus précis possible sur le vocabulaire associé à la mort cellulaire, nous allons dans un premier temps établir les éléments de langage associés à cette mort puis proposer une terminologie.

Compte tenu de l'approche diélectrique employée dans le cadre de cette étude, nous nous intéressons aux conséquences de différents traitements sur la permittivité complexe de la bactérie. Nous abordons donc tout d'abord les effets d'un traitement par la chaleur, puis ceux entraînés par un choc osmotique et enfin nous abordons les traitements par polluant. Dans un deuxième temps nous quantifions à l'aide de la littérature les conséquences de ces traitements sur le milieu entourant la bactérie.

La mort cellulaire est un concept anthropomorphique qui est confronté à une capacité opératoire car nous transposons les états de l'humain vivant et mort sur l'état des bactéries. A ce concept s'oppose celui de la capacité à se reproduire. Ces définitions sont toujours discutées [173], [174], [175] car on peut distinguer les cellules viables et cultivables (celles qui peuvent se multiplier sur

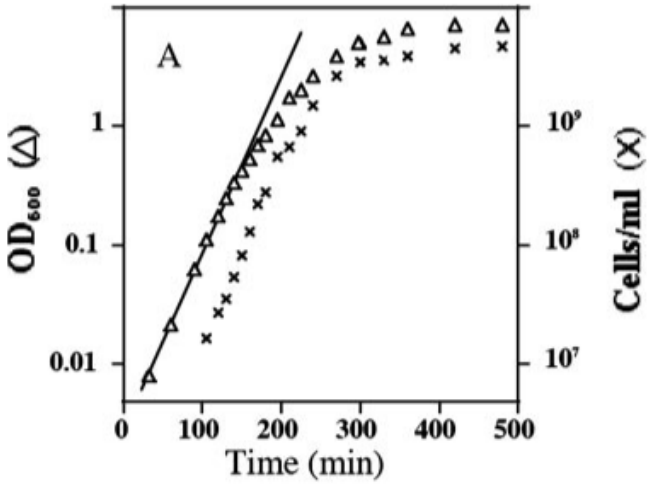


FIGURE 2.12 – *La croissance de Escherichia coli en milieu LB. La densité optique à la longueur d'onde de* 600 *nm (*DO_{600}*, triangles), la concentration cellulaire (croix). Tiré de [172].*

un milieu approprié) des cellules actives mais non-cultivables, qui présentent une activité métabolique sans former de colonie. Il existe aussi des cellules dormantes [174], qui sont inactives mais sont capables de redevenir cultivables. Finalement, les cellules réellement mortes n'impliquent aucune capacité à se multiplier ou s'activer. Cependant, même pour les cellules mortes, on observera que le vocabulaire dédié peut varier selon le domaine d'étude.
Les termes d'apoptose ou de nécrose sont souvent utilisés pour décrire les morts programmées des cellules animales [176] mais peu en microbiologie. Pourtant même dans ce cas de cellules dites mortes (par exemple paroi cellulaire brisée) on observe des cas de restructuration de la cellule [173]. Cependant, la lyse cellulaire est utilisée en microbiologie pour désigner des cellules qui sont mortes et dont les parois cellulaires sont endommagées. Mais, utiliser la lyse cellulaire pour parler de mort bactérienne revient à imposer une vision orientée car pour les bio-électroniciens, les parois cellulaires sont endommagées dès lors que les canaux ioniques sont ouverts.
Nous proposons également d'éviter un anthropomorphisme évasif en spécifiant l'effet appliqué aux cellules comme le traitement par antibiotique (ou traitement par chaleur) puis à spécifier l'état présupposé. De même, cette étude n'abordera pas la cultivabilité ni la viabilité des cellules post-traitement.
Dans le cas d'expérimentation avec des polluants nous utiliserons donc le terme traitement par polluant. Si nous voulons étudier la viabilité de la souche cellulaire en plus des effets directs du polluant alors nous utiliserons le terme de traitement par polluant induisant une incapacité reproductrice.

Température L'élévation de la température n'augmente pas significativement l'épaisseur de la membrane bactérienne ce qui n'a pas d'incidence sur la permittivité de la paroi, comme l'a souligné Seeman [177]. Pour endommager une bactérie, on peut utiliser un traitement thermique par autoclave (centaine de degrés et plusieurs bars) [86] [87] ou encore par conduction (bain marie, contact métallique).[2] Selon [178], [179] et [180], ce phénomène entraîne généralement une augmentation de la perméabilité de la paroi bactérienne, conduisant à une incapacité de reproduction.

La capacité équivalente de la bactérie a tendance à diminuer lors des traitements par chaleur [126],[181],[133]. Asami [182] postule que, dans la zone de fréquences de la dispersion β, la

2. Dans ces références, bien que les expériences portent parfois sur des levures, le principe d'inactivation par la chaleur reste comparable pour des bactéries.

capacité d'ionisation diffère entre bactéries vivantes et traités par chaleur et se traduit, pour ces dernières par un plus petit nombre de charges proche de la membrane, ce qui réduit la permittivité observée.

Cependant, Holzel [183] observe quand à lui que la capacité membranaire varie peu après le traitement par chaleur, alors que la conductivité du milieu augmente nettement. Cette divergence de conclusion dépend fortement du type de bactérie et du type de test, mais un consensus apparaît tout de même : un traitement par chaleur peut causer une augmentation de la conductivité de la solution lorsque la membrane n'assure plus la même répartition de charges.

Polluant L'effet de diverses substances sur les bactéries est un sujet d'étude très varié. De manière générale, la mort cellulaire entraîne une baisse de capacité électrique équivalente de la suspension. Il a été rapporté [184] qu'en cas d'inactivation cellulaire, la capacité électrique mesurée (en basses fréquences) se trouve notablement réduite, traduisant une détérioration de la membrane [185], ce qui semble en accord avec les travaux plus anciens [85][186][187][188]. Les solvants peuvent accentuer cette chute de permittivité en déstructurant la couche lipidique [189], comme le souligne aussi une revue récente [150]. Pour les antibiotiques, la plupart des études portent sur l'impédance globale [140] [79] , la conductivité [145] ou encore la résistivité [143] [77]. Cependant quelques travaux indiquent un effet spécifique sur la capacité qui diminue avec le traitement [79][190][146][150][191]. La capacité équivalente peut augmenter lors de certains traitements [192], tandis qu'une diminution de capacité se produit en cas de mortalité cellulaire [79][190], allant jusqu'à 3% de variation sur des surfaces fonctionnalisées [191]. Notamment, lors de traitement des bactéries avec des ions Cuivre, il a été avancé que la permittivité de la membrane extérieure à tendance à augmenter alors que celle de la membrane interne diminue [76].

Impact des traitements sur la conductivité Lors d'un traitement entraînant une incapacité de reproduction cellulaire ou une perforation de la membrane, il a été proposé comme hypothèse [193] qu'un défaut localisé sur la paroi induise une modification marquée dans la plage de fréquences de la dispersion α se traduisant par une augmentation de la conductivité de la solution.

Des expériences menées sur des membranes artificielles montrent également que la libération d'ions depuis le cytoplasme peut affecter notablement la conductivité globale [194][195]. Concernant la diffusion ionique lors de traitement par antibiotique, on mentionne des substances comme le chitosane [196] qui exercent une action menant à une incapacité de reproduction, bien que leur influence exacte sur la capacité membranaire demeure peu documentée. Néanmoins, un consensus apparaît sur le fait que l'endommagement de la paroi implique une diffusion d'ions du cytoplasme vers le milieu et donc une augmentation de la conductivité.

Par effet bactéricide ou bactériostatique, le traitement par polluant entraîne une perméabilisation accrue [197][195]. Cette perméabilisation se traduit par un largage des ions de l'intérieur de la cellule vers le milieu en fonction des gradients de concentration comme présenté sur la figure 2.13. Ainsi, si le milieu externe est moins conducteur que le milieu interne alors on observera une augmentation de la conductivité de la solution. Il y a donc un lien entre la conductivité globale de la solution et l'état membranaire des bactéries.

Toutes les méthodes d'analyse n'observent pas les mêmes effets des traitements. Par exemple, l'Iodure de Propidium, un colorant utilisé pour détecter les bactéries dont la paroi est endommagée va émettre à la longueur d'onde de 635 nm après être rentrée dans la bactérie [198]. C'est le passage de ce composant dans les bactéries traitées que l'on observe par microscope. Les microbiologistes visualisent donc l'endommagement de la membrane cellulaire.

Les méthodes électrocinétiques comme l'électroporation ou l'électro-orientation (parfois nommée électrorotation) vont étudier quant à elles les mouvements de la bactérie sous un champ électrique.

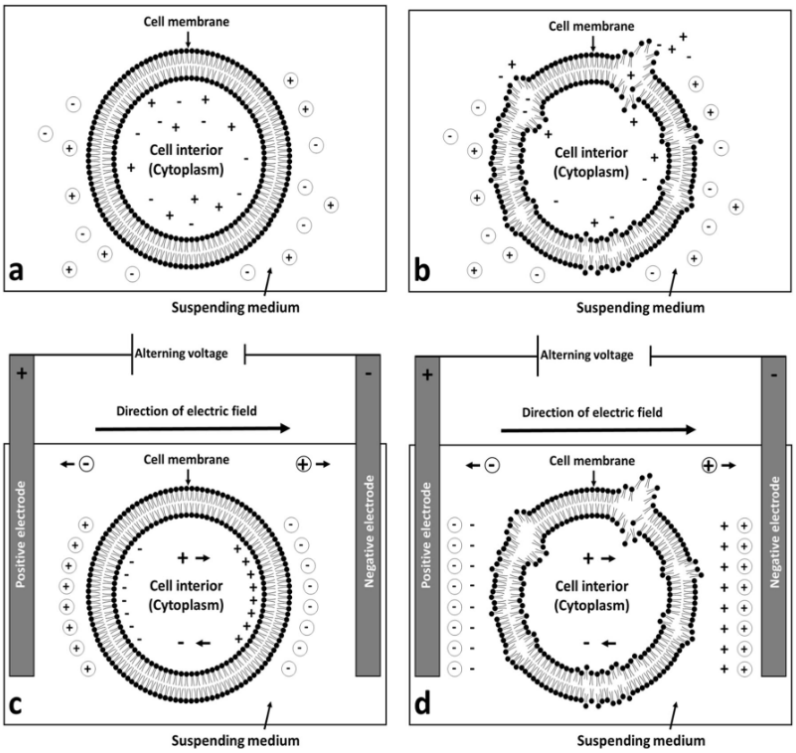


FIGURE 2.13 – *Schémas de principe de mesures diélectriques des solutions bactériennes. a) Cellule intacte. b) Cellule endommagée. c) Cellule intacte soumise à un champ électrique. d) Cellule endommagée soumise à un champ électrique. Tiré de [150]*

.

Finalement, la mesure des changements des propriétés de permittivité de la paroi (capacité à stocker des charges et donc fonctionnement de la bactérie) sous l'application d'un champ électrique alternatif se nomme la spectroscopie diélectrique.

Chacune de ces méthodes vient observer sous un prisme particulier une propriété de la bactérie. Par exemple, un traitement par endommagement de l'ADN, ARN ou de la synthèse des protéines sera observable directement suivant des méthodes et pas directement selon d'autres. Dans cette thèse nous analyserons les propriétés du milieu aqueux et tenterons de remonter aux propriétés diélectrique des parois bactériennes par spectroscopie diélectrique via une mesure de spectroscopie d'impédance.

2.2 Influence de l'environnement sur la physiologie bactérienne

Cette section a pour but de quantifier les influences de l'environnement sur la physiologie bactérienne, à savoir l'environnement d'étude (polluant appliqué) et l'environnement expérimental (métaux constituant les électrodes). Ces travaux de thèse ont été réalisés sur une souche unique de bactérie d'*Escherichia coli* (K-12 C600 CIP 103931) obtenue en partenariat avec l'Institut des Géo-sciences de l'Environnement de Grenoble (IGE). La bactérie *Escherichia coli* est largement connue et étudiée depuis les années 1930 [199]. Elle est facilement cultivable, robuste, et ses sensibilités sont très documentées. Par exemple, cette souche, connue pour posséder une résistance à la Rifampicine (antibiotique), a été sélectionnée pour d'autres travaux du laboratoire IGE.

2.2.1 Description des effets des polluants

Ces travaux se concentreront sur les effets de deux polluants. Il s'agit de l'Ampicilline et de l'Ivermectine. L'Ampicilline est un antibiotique à spectre large qui a été choisi pour ses propriétés bactéricides et son efficacité sur les parois bactériennes. En cohérence avec le projet Babiosqa présenté dans la section 1.5.2 du chapitre 1, nous avons choisi ce polluant pouvant se retrouver dans les stations d'épuration. Par exemple, des valeurs d'Ampicilline ont été relevées jusqu'à 1 mg/L en Iran près d'une station d'épuration [200]. De manière analogue au choix de la souche bactérienne, nous avons cherché à travailler sur un polluant modèle bien référencé dans la littérature. De fait, l'effet de l'Ampicilline sur *Escherichia coli* est très documenté depuis 1960 [201]. Ce polluant est donc un bon candidat compte tenu des connaissances établies et de son utilisation massive.

Quant à l'Ivermectine, c'est un antiparasitaire peu étudié sur *Escherichia coli* mais dont les impacts sur l'environnement sont avérés. On relève dans la littérature la détection de l'Ivermectine dans des zones inondables aux abords d'élevage de bovin près de la rivière Panama [17]. Des échantillons de sédiments prélevés dans les rivières montrent la présence d'Ivermectine [20]. Des relevés avec de fortes concentrations ont eu lieu dans des exploitations de saumons [18],[19]. Ainsi, L'Ivermectine est un antiparasitaire que l'on peut retrouver en aval d'exploitations agricoles.

Nous postulons que les biocapteurs à base de bactéries peuvent permettre la détection de ces polluants ayant un effet néfaste sur les bactéries. La présence dans l'environnement aquatique et la toxicité de ces deux polluants est attestée [202],[203].

Le choix n'a pas été porté sur des métaux lourds ou des solvants car ces composés, bien que pertinents sur le plan environnemental, présentent des difficultés expérimentales. Leur impact sur la conductivité électrique ou leur toxicité rendent complexe une analyse électrochimique dans notre cadre instrumental. En revanche, l'Ampicilline et l'Ivermectine sont deux polluants qui peuvent être manipulés aisément dans un laboratoire de physique sans nécessiter d'infrastructure de confinement spécifique et tout en restant représentatifs de conditions environnementales réalistes. Enfin, ces deux molécules traduisent des activités humaines concrètes et répandues comme l'usage médical pour l'Ampicilline ou agricole et vétérinaire pour l'Ivermectine.

2.2.1.1 Effet de l'Ampicilline

L'Ampicilline est un antibiotique de la famille des Pénicillines, classé parmi les β-Lactamines. L'Ampicilline agit en bloquant la synthèse de la paroi bactérienne, un élément crucial pour la survie et la rigidité des bactéries. Sur le plan structural, elle comporte un cycle bêta-lactame, ce qui permet une fixation aux protéines de liaison des pénicillines (PLP) comme présenté sur la figure 2.14.

Ces PLP interviennent durant la dernière étape de construction du peptidoglycane qui est indispensable à la solidité de la paroi car sa production est particulièrement intense lors de la création du septum. En se liant aux PLP (en particulier aux transpeptidases et carboxypeptidases), l'Ampicilline empêche l'assemblage des sous unités structurales de peptidoglycane. Privée de ce lien

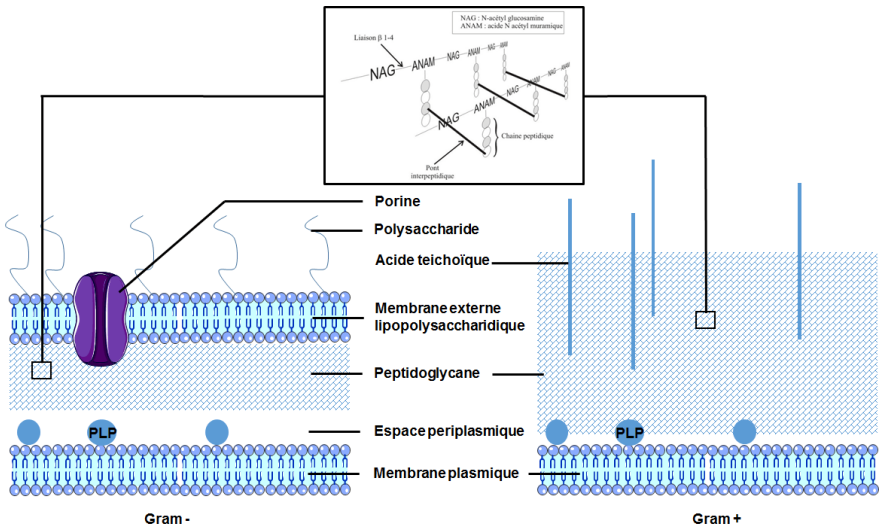


FIGURE 2.14 – *structure de la paroi bactérienne avec effet de l'Ampicilline [204]*

(pont sur la figure), la paroi se fragilise et finit par se rompre sous la pression osmotique, entraînant la rupture de la paroi.

Chez les bactéries à GRAM− négatif, l'efficacité de l'Ampicilline est moindre car elle dépend aussi de sa capacité à traverser la membrane externe via de petits canaux appelés porines. Les porines permettent un mode de transfert principalement passif. Si ces porines sont modifiées ou moins nombreuses, la diffusion de l'Ampicilline s'en trouve réduite, offrant ainsi une résistance naturelle à certaines espèces. Malgré l'émergence de diverses formes de résistances, l'Ampicilline conserve une place fondamentale dans le traitement de nombreuses infections bactériennes, illustrant l'importance du cycle bêta-lactame pour le ciblage sélectif de la paroi cellulaire.

2.2.1.2 Effet de l'Ivermectine

L'Ivermectine est connue pour ces propriétés antiparasitaires depuis les années 1980 [205] [206]. Elle est isolée à partir d'une bactérie nommée *Streptomyces avermitilis*. L'Ivermectine fait partie des Avermectines, du groupe des Lactones Macrocycliques (LM). Bien que l'Ivermectine ne soit pas conçue pour combattre des bactéries, nous allons ici développer les interactions connues de cette dernière avec les invertébrés. L'Ivermectine, molécule lipophile, traverse aisément la membrane cellulaire des invertébrés et se distribue rapidement dans leurs tissus. Elle se fixe principalement sur les canaux chlorure glutamate-dépendants présents dans les cellules nerveuses et musculaires comme l'illustre la figure 2.15. Cette liaison prolonge l'ouverture des canaux, provoquant une entrée massive d'ions chlorure. Ce changement de concentration bloque la transmission de l'influx nerveux, entraînant une paralysie et parfois la mort de l'organisme cible. Spécifique aux invertébrés, cette action n'affecte que très peu les mammifères, car leurs récepteurs glutamate ne sont pas sensibles à l'Ivermectine. Finalement, la molécule perturbe de façon ciblée le système nerveux, empêchant les parasites de se nourrir et de se maintenir chez l'hôte.

2.2.2 Concentration Minimale Inhibitrice

Cette partie se concentre sur la quantification pratique des effets d'un polluant sur une souche bactérienne. Dans cette étude, nous nous sommes basés sur une méthode permettant de quantifier la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). La CMI est une valeur issue d'un test permettant de trouver la sensibilité d'une bactérie à un élément. La CMI (ou MIC en anglais) correspond à la plus faible concentration d'un composé chimique, généralement un médicament, pour laquelle on observe une inhibition de la croissance à la suite d'un temps défini, comme présenté sur la figure

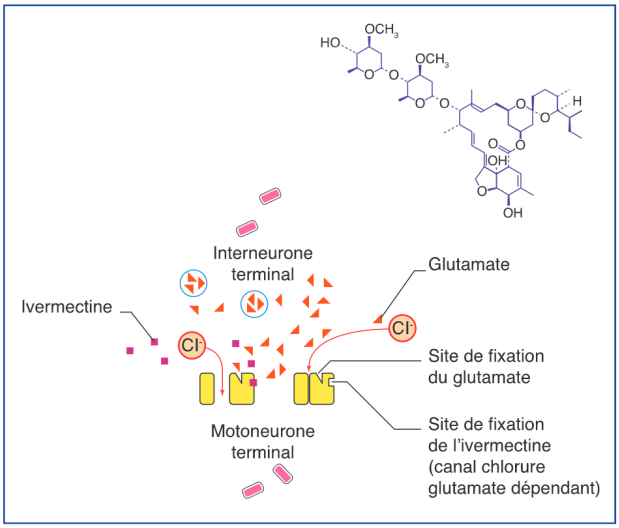


FIGURE 2.15 – *Mécanisme d'action schématisé de l'Ivermectine sur les canaux chlorures glutamate-dépendants des invertébrés. Tiré de [207]*

2.16. Il est possible de réaliser la CMI via des appareils du commerce ou de manière manuelle. Nous développerons ici les conditions de réalisation de la CMI puis la méthode associée.

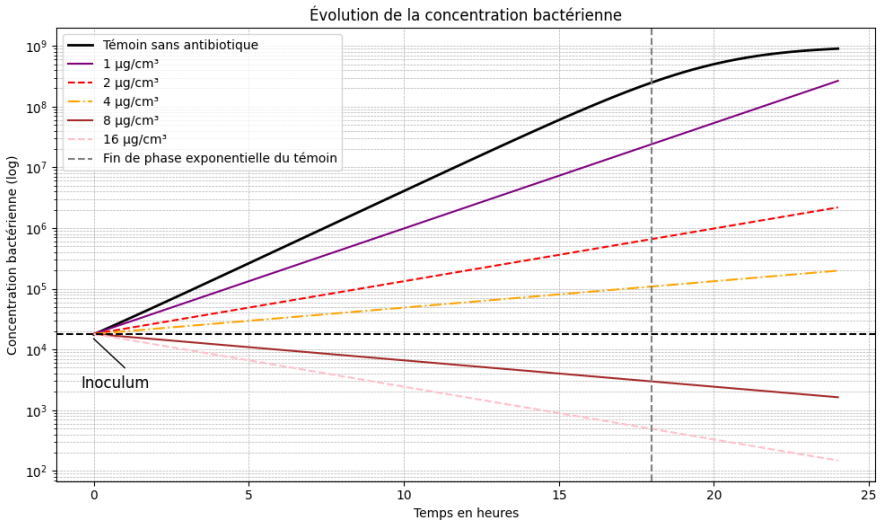


FIGURE 2.16 – *Dynamique théorique de la population bactérienne dans le temps suite au traitement par polluant [208]*

La CMI est très utilisée en microbiologie, mais certaines conditions sont nécessaires à son exécution :

— Culture bactérienne jeune (moins de 48h)

— Inoculum fixe pour chaque test

— Milieu spécifique (Mueller-Hinton)

— Conditions et durée d'incubation similaire

— Culture monomicrobienne

Le milieu Mueller-Hinton [209] a été sélectionné par les organismes comme le Clinical Laboratory Standards Institute ou encore le Comité de l'antibiogramme de la Société Française de

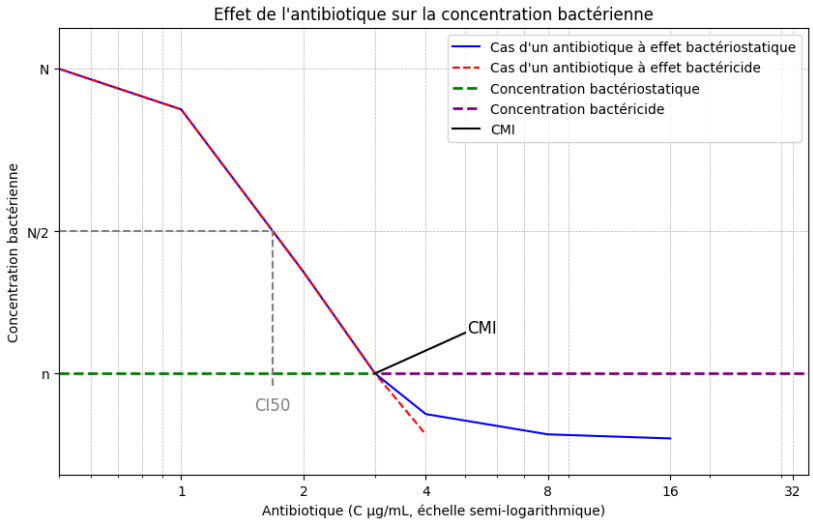


FIGURE 2.17 – *Évolution théorique de la concentration bactérienne à un temps fixe en fonction de la concentration en agent chimique*

Microbiologie CA-SFM comme milieu de référence. Nous avons donc utilisé ce dernier pour nos tests.

Pour l'espèce moins classique de l'Invermectine nous avons réalisé un test selon le protocole ci-dessous. La CMI est déterminée en préparant une série de dilutions du composé chimique, en ajoutant le milieu de culture puis en l'inoculant avec l'espèce bactérienne ciblée, et ceci à température optimale de croissance. La valeur de la concentration de bactéries vivantes est relevée après un temps donné (généralement une base de 10h, 12h ou 24h). On détermine la valeur de la CMI en trouvant la plus petite concentration de polluant à partir de laquelle le nombre de bactéries vivantes est inférieur à l'inoculum de départ. Cette dernière est souvent exprimée en microgrammes par millilitre. La représentation des concentrations de bactéries vivantes en fonction de la concentration de polluant et à un temps donné est proposée sur la figure 2.17. Nous pouvons observer sur cette dernière l'évolution du nombre de bactéries vivantes dans le temps après l'ajout d'un inoculum d'une valeur arbitraire mais égale pour toutes les solutions. L'évolution du nombre de bactéries dépendra de l'effet du polluant sur la population cible. L'ajout de cet inoculum ne déroge pas aux règles de croissance bactérienne et notamment au temps de latence déjà illustré sur la figure 2.11. Le test d'où résulte la valeur de la CMI permet d'obtenir d'autres informations comme la CI50, définie comme la concentration inhibitrice médiane comme présenté sur la figure 2.17. Ces tests permettent d'évaluer les propriétés bactériostatique et bactéricide de chaque élément testé. Un effet bactériostatique se traduira par une concentration de la population bactérienne inférieure où proche de l'inoculum pendant toute la durée du test, tandis qu'un effet bactéricide se traduira par l'absence partielle de bactéries lors du relevé. Il est donc nécessaire d'avoir un référentiel tout en prenant en compte son caractère unique par souche et par relation temporelle.

2.2.3 CMI de l'Ampicilline

Certaines espèces chimiques sont plus étudiées que d'autres par les microbiologistes, c'est le cas de l'Ampicilline. Pour ces dernières, des tests à bandelettes sont disponibles sur le marché. Les bandelettes regroupent les diverses dilutions du composé chimique pour effectuer une CMI.

Dans nos travaux, la CMI de l'Ampicilline a été déterminée à l'aide d'une bandelette issue du marché afin de spécifier la CMI de cette souche (AMPICILLIN AM 256 WW S30 - Biomerieux) comme présenté sur la figure 2.14. Une bandelette a été positionnée au milieu d'une boite de culture, les différentes concentrations d'Ampicilline sont lisibles sur la bandelette. Cette bande-

lette est posée sur un milieu liquide déposé sur une plaque d'Agar Agar. On distingue également une zone plus nette autour de la partie haute de la bandelette où la croissance bactérienne n'a visiblement pas eu lieu au bout du temps relevé (ici 24h).

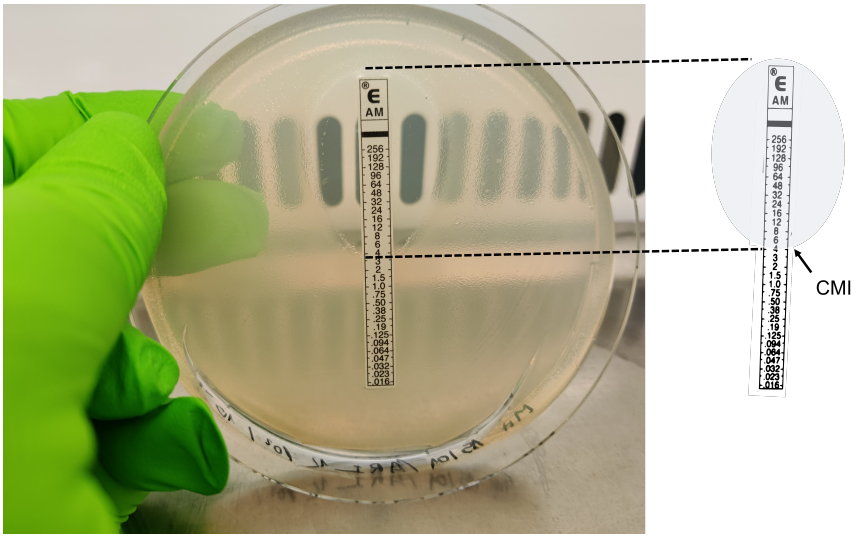


FIGURE 2.18 – *Résultat de la CMI de l'Ampicilline sur Escherichia coli à 24 heures.*

La CMI a été réalisée avec les paramètres précédemment développés, soit une monoculture d'*Escherichia coli* de moins de 48h et un milieu Mueller-Hinton. Nous avons obtenu un CMI à 24h de $4\,\mu g/mL$ tel que visible sur la figure 2.18. La CMI d'autres souches de *Escherichia coli* à été observée à quelques $\mu g/mL$ ce qui semble cohérent avec notre mesure.

2.2.4 CMI de l'Ivermectine

L'Ivermectine étant un antiparasitaire, la CMI de ce dernier sur des bactéries est peu étudiée. On trouve cependant des études sur des bactéries GRAM+ comme *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* [210],[211]. Ces études rapportent des CMI de $6,25$ et $12,5\,\mu g/mL$ pour *S. aureus*, avec un effet bactériostatique supposé. En complément, pour des isolats cliniques de *M. tuberculosis*, la CMI observée est nettement plus élevée, atteignant $40\,mg/L$. Ces résultats fournissent un cadre de référence pour concevoir le plan de dilution en vue d'expérimentations sur notre souche bactérienne (K-12 C600). La CMI de l'Ivermectine sur *Escherichia coli* a été obtenue à l'aide d'un TECAN infinite 200pro. Ce dernier permet de faire des acquisitions d'absorbance OD_{600nm} sous incubation (température et agitation). Compte tenu de contraintes pratiques de manipulation de ce polluant (mis en suspension aqueuse) nous avons décidé de réaliser une CMI pour des concentrations allant de $0,5\,\mu g/L$ à $66,0\,\mu g/L$ comme présenté sur le plan de mesure de la plaquette 96 puits du tableau 2.1. Chaque test est répété pour deux autres populations bactériennes. La colonne Medium correspond à la population de bactéries utilisée et les colonnes de 1 à 10 correspondent au différentes concentrations d'Ivermectine testées dans les puits.

La CMI ayant été obtenue à une valeur plus importante que $10\,\mu g/L$, les résultats pour les concentrations inférieures à cette valeur ont été regroupées en annexe A.

L'évolution de la densité optique de ces solutions ayant permis de trouver la CMI est présentée sur la figure 2.19. L'ensemble des courbes correspondent à un résultat différentiel obtenu en normalisant avec une valeur d'absorbance obtenue sur une solution contenant uniquement du milieu de croissance. La courbe de référence de croissance bactérienne est quant à elle composée de bactéries dans un milieu de croissance prélevé à hauteur de $150\,\mu L$, là où les autres relevés sont composés de $50\,\mu L$ de cette solution et $100\,\mu L$ d'une solution contenant du milieu de croissance et une certaine concentration de polluant. Les valeurs à 10h et à 12h sont les mêmes pour la courbe

Medium	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Volume total
E.coli 1	66,0	59,4	52,8	46,2	39,6	33,0	26,4	19,8	13,2	6,6	150 μL
E.coli 2	66,0	59,4	52,8	46,2	39,6	33,0	26,4	19,8	13,2	6,6	150 μL
E.coli 3	66,0	59,4	52,8	46,2	39,6	33,0	26,4	19,8	13,2	6,6	150 μL
E.coli 1	-	66,0	33,0	16,5	8,3	4,1	2,1	1,0	0,5	-	100 μL
E.coli 2	-	66,0	33,0	16,5	8,3	4,1	2,1	1,0	0,5	-	100 μL
E.coli 3	-	66,0	33,0	16,5	8,3	4,1	2,1	1,0	0,5	-	100 μL

TABLEAU 2.1 – *Tableau avec concentrations d'Ivermectine en μg/L lors de la CMI effectuée sur Escherichia coli*

de croissance et pour les tests contenant les concentrations les plus faibles. On observe bien la dynamique théorique de la figure 2.16. L'évolution de la concentration bactérienne à 10h est en annexe A. Quant à la correspondance à 12h elle est présentée sur la figure 2.20.

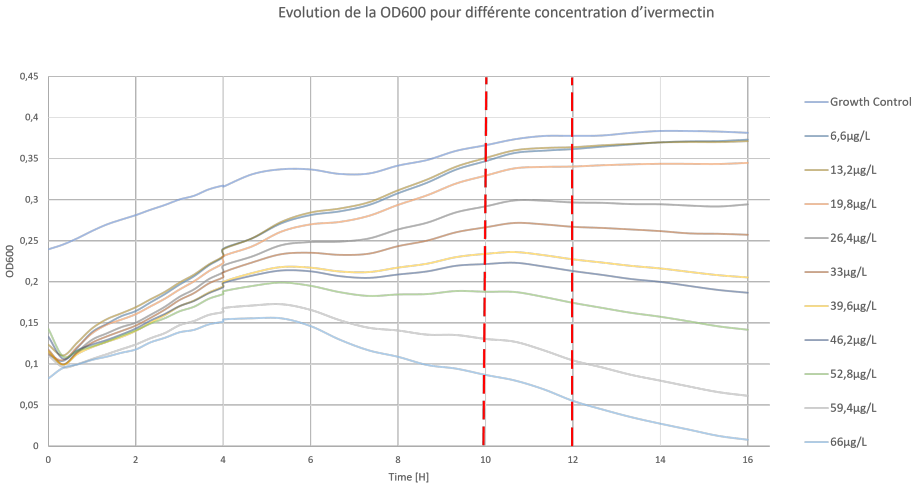


FIGURE 2.19 – *Évolution de la densité optique dans le temps pour différentes solutions contenant un milieu de culture, Escherichia coli et des concentrations d'Ivermectine*

De manière analogue à la théorie présentée sur la figure 2.17, les résultats sur la figure 2.20 permettent de déterminer la CMI à 12h de l'Ivermectine sur cette souche d'*Escherichia coli*. Ainsi, la CMI est visuellement obtenue et vaut 36 μg/L.

On remarquera que l'Ivermectine peut être considérée comme un agent à effet bactéricide compte tenu de la pente de la CMI sur cette souche bactérienne. Ces deux expérimentations nous permettent d'avoir un ordre de grandeur de la quantité d'Ivermectine et d'Ampicilline nécessaire pour impacter une solution bactérienne. Concernant l'Ivermectine, les résultats sont de deux ordres de grandeur supérieurs à ce qui a été observé par [210]. Mais également deux ordres de grandeurs inférieur à ceux observés par [211]. Nous vérifierons la cohérence de ces résultats lors de l'étude expérimentale menée dans cette thèse.

2.2.5 Biocompatibilité des dispositifs de test

.

Les enjeux des mesures qui vont être menées sur nos souches bactériennes ne se limitent pas à déterminer l'impact d'un polluant mais aussi à quantifier les effets éventuels des matériaux utilisés

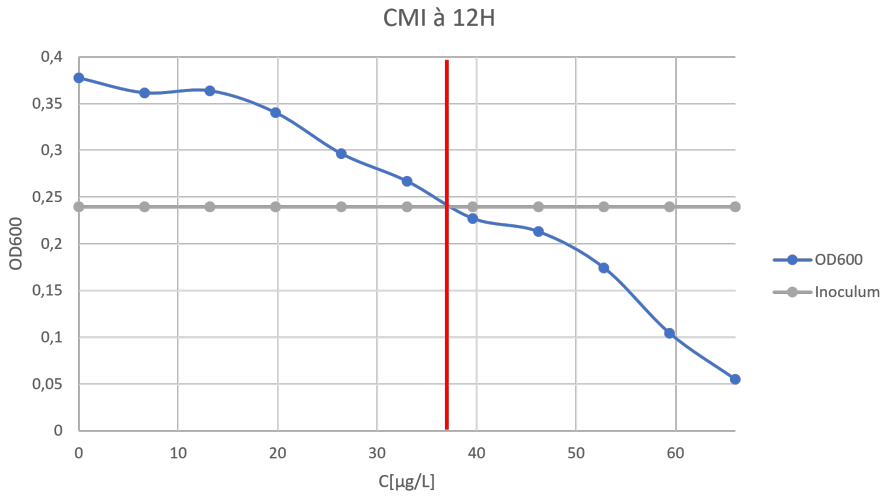


FIGURE 2.20 – *Évolution de la concentration bactérienne via la densité optique à 12h après traitement par Ivermectine*

dans le dispositif expérimental. Nous allons ici quantifier l'impact des électrodes en cuivre et en étain sur la population bactérienne.

2.2.5.1 Biocompatibilité du cuivre et de l'étain

Le cuivre et l'étain sont deux métaux couramment présents sur les surfaces des électrodes fabriquées sur des cartes électroniques. Nous commençons cette partie en définissant la biocompatibilité pour ces deux métaux puis nous détaillons la procédure conçue afin de quantifier les impacts de ces métaux sur les bactéries. Finalement, nous analysons les résultats obtenus.

Cette notion de biocompatibilité transposée aux métaux [212] correspond à la capacité d'un métal à ne pas interférer ni à dégrader le milieu biologique avec lequel il est en contact. Cependant, la propriété d'un matériau à être biocompatible dépend du temps car il faut prendre en compte :

— La corrosion électrochimique

— L'oxydation

— Les frottements et débris

Il est ainsi limitant d'attribuer un caractère immuable à la biocompatibilité d'un matériau. Concernant le cuivre, il est connu pour être biocide [213] à l'inverse de l'étain. Cependant, dans cette étude de Noyce [213], ce sont des petits débris de cuivre et en grand nombre, qui sont mis au contact d'une solution bactérienne en suspension. On remarque dans cette étude que le nombre de bactéries diminue après 40 minutes. Or il y a une grande différence entre un contact de bactéries avec une électrode plane ou des petites débris dispersés dans un volume. En effet, nous supposons que c'est la combinaison de ces trois facteurs (temps, volume, état) qui influe sur la biocompatibilité du cuivre. Il nous paraissait donc important de vérifier la biocompatibilité du cuivre dans notre configuration de mesure, lorsque nous utilisons des électrodes planes et sur un temps de test ne dépassant pas 40 minutes.

Par la suite, nous développons comment nous avons quantifié le ratio de bactéries endommagées et donc la viabilité bactérienne au contact du cuivre et de l'étain.

2.2.5.2 Mode opératoire

Pour cette expérience, nous avons utilisé quatre cartes électroniques. Deux d'entre elles étaient recouvertes d'un alliage SnCu (99.7% Sn et 0.3% Cu). Les deux autres étaient recouvertes de cuivre pur. Toutes ces cartes possédaient 6 électrodes qui étaient disposées en vis-à-vis par type de matériau et séparées de $800\,\mu$m ($+-1\,\mu$m). Ainsi, nous avons défini 6 volumes entre des électrodes en étain et 6 volumes entre des électrodes en cuivre. Le protocole suivant a été mis en place pour analyser le ratio de perte bactérienne pour ces matériaux :

1. Faire croître des cultures de *Escherichia coli* (30 mL) jusqu'à la phase exponentielle tardive dans un milieu nutritif (LB à $5\,$g$/$L de NaCl).
2. La densité optique (OD_{600}) doit être environ à 1 (1×10^9 CFU [172]) dans des cuvettes à absorption acrylique de 1 centimètre de largeur.
3. Nettoyer les électrodes à l'alcool, attendre l'évaporation total
4. Ajouter $500\,\mu$L de la solution *Escherichia coli* entre les électrodes espacées de $800\,\mu$m
5. Attendre 40 minutes
6. Appliquer les colorants SYTO9 et Iodure de Propidium IP
7. Compter les bactéries mortes à l'aide d'un microscope inversé
8. Répéter cette étape pour les 11 autres électrodes
9. Répéter toutes ces étapes pour deux autres populations bactériennes
10. Comparer les résultats avec des bactéries vivantes mises de côté et des bactéries traitées par chaleur pendant 10 minutes à 90°C.

Nous avons utilisé la coloration par Syto9 et par Iodure de propidum combinée avec une cellule de numération de Malassez sur un microscope inversé. Cette méthode est largement répandue dans les domaines d'études microbiologiques pour son efficacité sur les bactéries et le traitement visuel associé. En effet, le SYTO 9 se fixe à l'ensemble des cellules bactériennes (membrane et ARN). A la suite d'une excitation optique, via le microscope inversé, le SYTO 9, fixé sur la celle va émettre une lumière à la longueur d'ondes du vert, de 490 nm environ. L'Iodure de Propidium (IP) va rentrer uniquement dans les cellules dont les parois sont endommagées et permettre d'émettre dans le rouge à la longueur d'onde de 635 nm [198]. Ces procédés sont visibles sur la figure 2.21 où l'on peut apercevoir une bactérie morte et de nombreuses bactéries vivantes. Le quadrillage en arrière-plan correspond à la cellule de comptage permettant de faire des ratios sur le volume total.

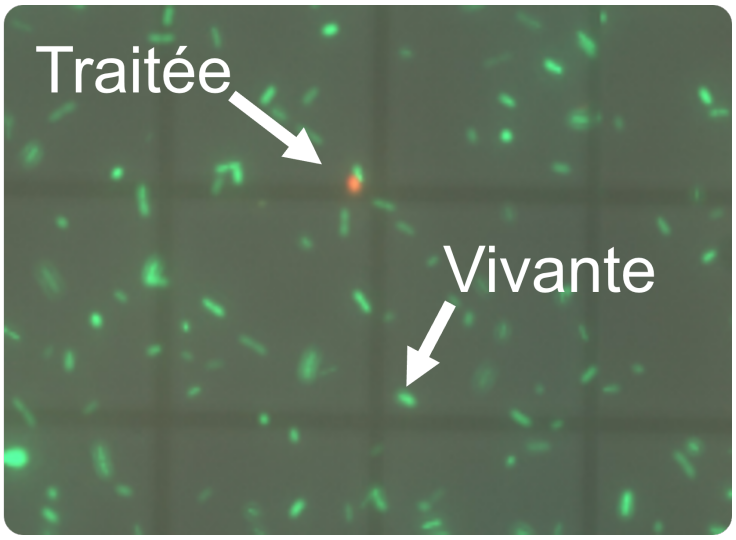


FIGURE 2.21 – *Exemple d'utilisation des colorants SYTO9 et IP sur une cellule de comptage type Malassez*

2.2.5.3 Résultat

Le tableau 2.2 représente le résultat des décomptes visuels de bactéries après la mise en contact de 40 minutes. La première colonne présente la couche de contact métallique avec le milieu liquide. L'ensemble des opérations de comptage n'a pas relevé de cas de mort cellulaire dans un ratio supérieur à 2%. Pour rappel, l'article cité précédemment [213] relève des pertes de 90% pour 40 minutes de mise en contact.

Metal	Alive [unit]	Dead [unit]	Ratio Dead/Alive	C/mL
Cu	520	6	$< 2\%$	$2,630 * 10^7$
Cu	557	11	$<2\%$	$2,840 * 10^7$
Cu	698	6	$<1\%$	$3,520 * 10^7$
Sn	674	7	$< 2\%$	$3,405 * 10^7$
Sn	721	4	$< 1\%$	$3,605 * 10^7$
Sn	792	5	$< 1\%$	$3,905 * 10^7$

TABLEAU 2.2 – *Table d'analyse des bactéries comptées à l'aide de cellule de Neubauer*

Cette différence de résultat peut être attribuée à deux facteurs : premièrement, le rapport entre la surface métallique ($12,5\,cm^2$ contre $6,25\,cm^2$ pour notre étude) combiné au volume de liquide ($20\,\mu L$ contre $500\,\mu L$ pour notre étude) ; deuxièmement, l'état des électrodes, qui n'ont pas été nettoyées avec de l'acétone dans le cadre de notre étude, était différent. Cette expérience indique que le cuivre peut être considéré comme biocompatible pour des procédures telles que la spectroscopie d'impédance électrochimique d'une durée inférieure à 40 minutes.

En ce qui concerne l'étain, l'étude démontre également sa compatibilité biologique dans les conditions expérimentales étudiées. Ce résultat n'est pas surprenant mais reste essentiel pour pouvoir utiliser des électrodes comportant une couche d'étain.

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons d'abord proposé un prisme de compréhension des cellules bactériennes en tant que biorécepteurs. Le comportement bactérien a été étudié au travers de son cycle de vie puis complété avec une analyse d'un point de vue diélectrique. Dans un second temps, l'influence de l'environnement sur la physiologie bactérienne a été soulignée. Finalement, l'importance de la nature et de la préparation des électrodes sur la fiabilité des mesures électriques a été montrée.

Nous verrons dans le chapitre suivant comment ces mêmes électrodes servent de transducteurs dans le cadre de la spectroscopie d'impédance, une technique clé pour caractériser les interactions électrochimiques. En effet, l'électrode convertit le phénomène physique ou biologique étudié en un signal électrique mesurable. Une conception adéquate assure des réponses reproductibles et limite les artefacts liés à l'interface électrode-échantillon.

3
Impédancemétrie

Ce chapitre pose les fondements de l'impédancemétrie appliquée aux milieux aqueux. La première partie rappelle les notions d'électricité essentielles et détaille les principes de mesure, en intégrant les contraintes géométriques spécifiques aux prototypes développés. Les méthodes d'analyse par impédance, régression et distribution des temps de relaxation sont détaillées. Enfin, la modélisation par éléments finis est présentée afin de caractériser la réponse diélectrique théorique des suspensions bactériennes et de prévoir des comportements électriques.

3.1 Cas généraliste d'une mesure d'impédance en milieu aqueux

Nous avons vu à travers les chapitres précédents les différents éléments physiques essentiels à la compréhension des enjeux de ces travaux de thèse. Nous faisons ici un rappel de notions d'électricité nécessaires à l'étude et présentons le principe d'impédancemétrie. Puis, nous développons les contraintes liées aux différents prototypes de cette thèse. Dans un second temps, nous allons brièvement exposer les différentes notions électrochimiques pouvant intervenir dans cette étude. Finalement nous aborderons des simulations impédancemétriques de solutions aqueuses contenant des bactéries.
La figure 3.1 ci-dessous est une représentation de notre modèle impédancemétrique global. Elle permet de détailler l'analyse générale de notre système d'un point de vue électrique.

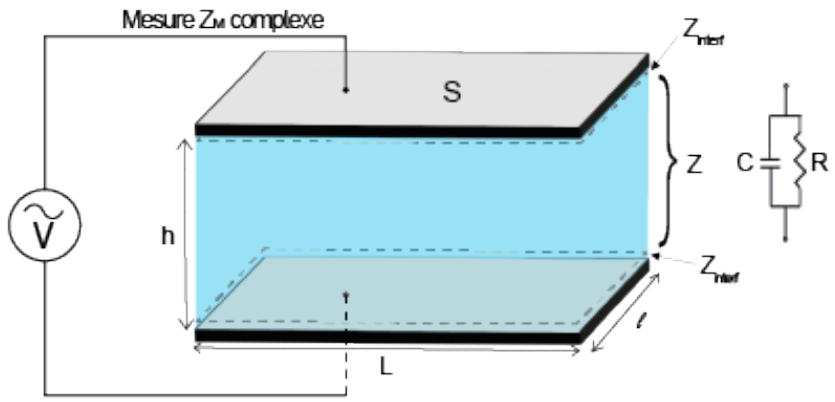


FIGURE 3.1 – *Géométrie du système global contenant le milieu aqueux et modèle électrique RC.*

De manière simplifiée, nous pouvons associer notre milieu aqueux à une résistance et une capacité en parallèle comme montré sur la figure 3.1 qui représente la capacité de ce dernier à se polariser et à être un conducteur. Ce couple RC correspond à l'impédance Z indiquée sur la droite de la figure 3.1. Les deux autres impédances notées Z_{interf} seront abordées dans la section 3.3 de ce chapitre.

Dans ce milieu aqueux simplifié et avec une approximation linéaire (conductivité électrique σ et permittivité relative ε_r indépendantes de la fréquence et de l'amplitude du champ) on a :

$$C = \varepsilon_r \varepsilon_0 \frac{S}{h} \tag{3.1}$$

$$R = \frac{1}{\sigma}\frac{h}{S} \tag{3.2}$$

On ainsi définir l'admittance Y à une pulsation ω :

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{1}{R} + jC\omega = \frac{S}{h}(\sigma + j\omega\varepsilon_r\varepsilon_0) \tag{3.3}$$

On peut prendre en considération la permittivité relative équivalente complexe ε_r^* et en posant :

$$Y = \frac{S}{h}(j\omega\varepsilon_0\varepsilon_r^*) = Y' + jY'' \tag{3.4}$$

En utilisant (3.3) et (3.4), on peut ainsi exprimer la permittivité complexe :

$$\varepsilon_r^* = \varepsilon_r - j\frac{\sigma}{\omega\varepsilon_0} = \varepsilon_r^{'} - j\varepsilon_r^{''} \tag{3.5}$$

ε_r et σ sont respectivement la partie réelle de la permittivité diélectrique équivalente et de la conductivité équivalente. On considère ici qu'elles sont constantes et donc que le milieu est non dispersif même si ce n'est en réalité pas le cas des suspensions bactériennes.

L'intérêt est qu'on peut extraire ces paramètres des mesures d'impédance étant donnée que les dimensions du volume sont connues. On obtient à partir de (3.4) et (3.5) :

$$\varepsilon_r^{'} = \frac{Y^{''}}{\omega\varepsilon_0}\frac{h}{S} \tag{3.6}$$

$$\sigma = \sigma_{eq} = Y^{'}\frac{h}{S} \tag{3.7}$$

Sachant que :

$$Y = Y^{'} + jY^{''} = \frac{1}{Z} = \frac{Z^{'}}{|Z|^2} - j\frac{Z^{''}}{|Z|^2} \tag{3.8}$$

Nous pouvons donc conclure avec ce modèle simple en prenant $\phi = arg(Z)$ que :

$$\varepsilon_r^{'} = -\frac{1}{\omega\varepsilon_0}\frac{h}{S}\frac{sin(\phi)}{|Z|} \tag{3.9}$$

$$\sigma_{eq} = -\frac{h}{S}\frac{cos(\phi)}{|Z|} \tag{3.10}$$

Cet exemple permet de relier les mesures impédancemétriques aux propriétés diélectriques du milieu aqueux observé. Ainsi, dans les plages de fréquences où la conductivité et la permittivité relative sont indépendantes de la fréquences et où le modèle équivalent du milieu peut se ramener à un simple circuit RC parallèle, on pourra alors analyser ces propriétés diélectriques directement à travers des données d'impédance.

3.2 Dispositif Physique

Cette sous-partie est dédiée à la description des différents dispositifs créés durant ces travaux de thèse. Nous abordons en premier lieu le dispositif de taille mésoscopique. Ce dispositif est composé d'électrodes planaires de $2.5\,\text{cm} \times 2.5\,\text{cm}$ séparées par une distance de $800\,\mu\text{m}$. Nous étudions plus particulièrement l'influence de la planéité des électrodes, des effets d'évaporation et de la fréquence sur la réponse en impédance de ce dispositif. Dans un deuxième temps, nous présentons les micro-dispositifs intégrés sur verre leur procédé de fabrication et leurs particularités.

3.2.1 Différents dispositifs de la littérature

Plusieurs types d'électrodes sont possibles [214] comme présenté sur la figure 3.2 aboutissant à trois configurations de mesure. Dans le premier cas, le système comporte deux électrodes nommées électrode de travail et contre-électrode. Un signal sinusoïdal est appliqué. Ce type de montage est sensible aux processus en basse fréquence (inférieur à 1 kHz).

Dans la deuxième configuration, une troisième électrode est ajoutée : l'électrode de référence. Dans ce cas de figure, la tension sera appliquée entre l'électrode de référence et l'électrode de travail. La contre-électrode permet alors de suivre le courant passant entre les deux autres. Le courant

n'affectant pas la contre électrode, ce système permet de s'affranchir des interactions sur l'une des deux électrodes. Finalement, la troisième configuration est composé de quatre électrodes : deux d'entre elles permettent d'appliquer une tension et deux servent à la mesure du courant. le système peut s'appliquer autrement avec deux électrodes qui imposent un courant et deux qui permettent de relever la tension. Ce dernier type de configuration est très utilisé pour l'ampérométrie et la potentiomètrie. Pour notre système, pour des raisons de simplicité et parce que nous avons choisi de travailler à des fréquences suffisamment élevées pour ne pas avoir d'effets de polarisation des électrodes, nous allons utiliser la première configuration avec deux électrodes. Cette dernière permet en effet d'appliquer un champ uniforme à l'ensemble du milieu aqueux. Cela simplifie l'étude par élément fini sur une représentation simpliste d'une bactérie en bâtonnet.

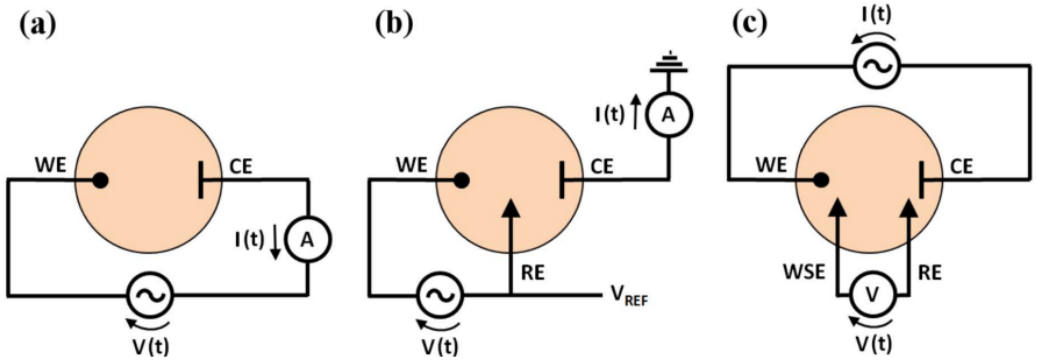


FIGURE 3.2 – *trois types de configuration d'électrodes de mesure. (a) deux, (b) trois et (c) quatre électrodes [214]*

La géométrie des électrodes est également très variable. Pour ce qui est des mesures impédancemétriques, on retrouve principalement deux cas de figure : des électrodes en vis-à-vis comme présenté sur la figure 3.1. [125, 215-218] et les électrodes interdigitées [219-226]. La figure 3.3 présente une vue des lignes de champ qui s'établissent entre les électrodes interdigitées. Ce sont des électrodes composées de peignes à plat permettant un système exploitable en deux dimensions. Les dispositifs en vis-à-vis permettent d'avoir un champ uniformément appliqué sur le milieu de mesure. Cependant, ils sont soumis à des contraintes de conception mécanique lors de la diminution d'échelle du dispositif. Les électrodes interdigitées quant à elles sont très faciles à mettre en place et permettent de travailler sur des petits volume, ce qui, dans le domaine des capteurs intégrés est devenu la norme.

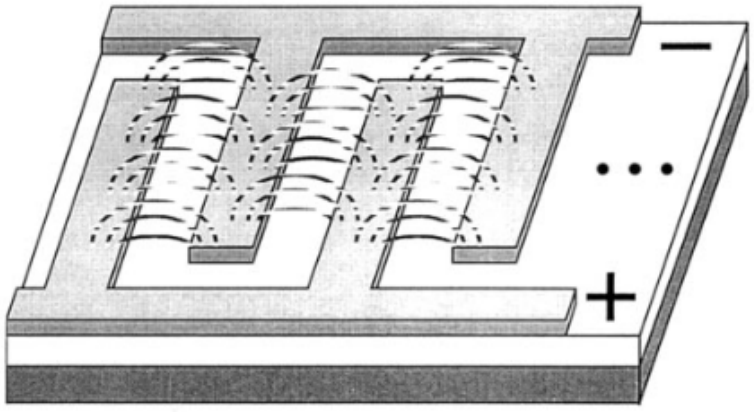


FIGURE 3.3 – *Champ électrique généré par des électrodes interdigitées. [220]*

3.2.2 Dispositif mésoscopique

Lors de ces travaux de thèse nous avons conçu un dispositif de taille mésoscopique afin de réaliser des premières mesures biologiques plus aisément qu'avec un dispositif intégré. L'objectif était d'avoir plusieurs électrodes sur un même substrat pour paralléliser les mesures et sur des volumes liquides compris entre 500 μL et 1 mL. Ce volume de 500 μL correspond à des électrodes de 25 mm $\times$ 25 mm espacées de 800 μm. Nous avons décidé d'utiliser un analyseur d'impédance de précision Agilent 4294A.

Cet appareil permet d'étudier une large bande de fréquence allant de 40 Hz à 110 MHz et a déjà fait ses preuves pour des mesures de spectroscopie d'impédance sur des bactéries en solution [227]. Nous appliquons 100 mV aux électrodes, des travaux préliminaires ayant montrées une linéarité de fonctionnement autour de cette tension. Cet appareil peut être piloté par GPIO-B et être supervisé à l'aide d'un logiciel du commerce tel que LabVIEW. L'ensemble de cette chaîne de mesure est présentée de façon schématique sur la figure 3.4. Concernant la distance entre les électrodes nous avons choisi de la contrôler précisément en utilisant des pinces venant presser les deux substrats autour de cales en verre préalablement poncées pour avoir une hauteur fixe et définie. Finalement, pour le substrat, nous avons choisi une plaque de résine époxy chargée de fibres de verre (FR4) et cuivrée en double face pour la facilité qu'elle offre concernant la fabrication d'électrodes gravées. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 nous avions ainsi à notre disposition des électrodes en cuivre (communément appelé PCB pour Printed Circuit Board) ou en cuivre étamé à froid.

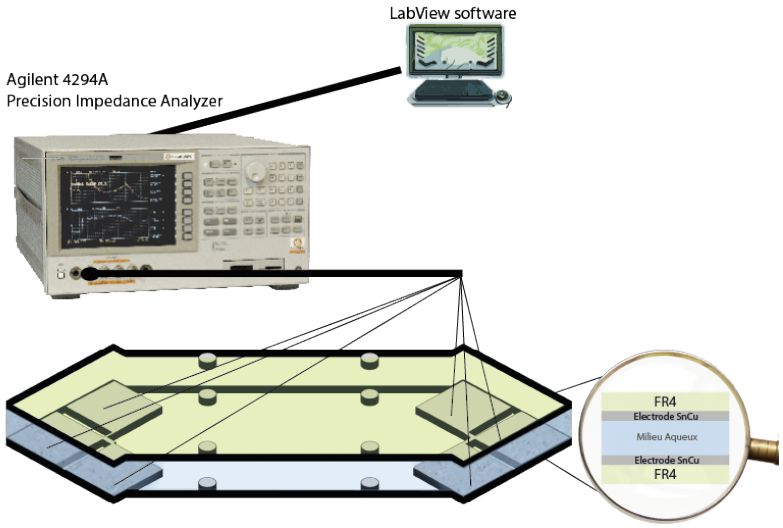


FIGURE 3.4 – *Schéma de principe du banc de test mésoscopique*

La section suivante développe les limites lié à l'évaporation et aux fréquences d'utilisation de notre capteur.

3.2.2.1 Évaporation des liquides

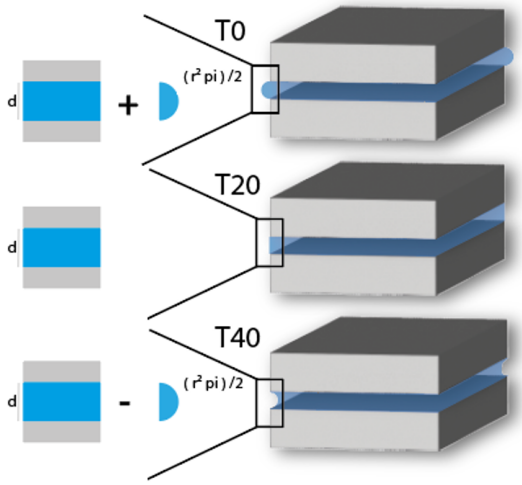
Réaliser un dispositif mésoscopique pour des volumes de l'ordre du mL pose la question du temps d'évaporation de ces derniers. Nous avons donc réalisé une campagne de mesures d'évaporation de l'eau entre deux électrodes carrées de 25 mm de côté espacés de 800 μm.

La figure 3.5 illustre la comparaison entre le modèle théorique de la forme du ménisque et l'évolution expérimentale du volume d'eau dans un pont capillaire de 800 μm sur une durée de 40 minutes.

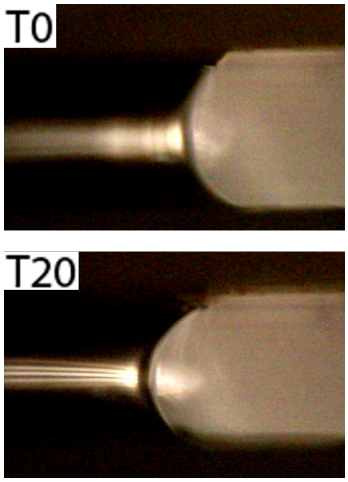
À gauche sur la figure, la représentation théorique (a) modélise la perte de volume par le passage d'un ménisque convexe (T0), ajouté au volume rectangulaire initial, vers un ménisque concave (T40) soustrait à ce même volume. À droite, les relevés expérimentaux (b) illustrent cette dynamique au sein du canal formé par deux plaques de verre horizontales (en noir en haut et en bas des images). Le liquide apparaît en noir sur les clichés, tandis que l'air environnant est représenté par les zones grisées. L'interface entre ces deux milieux, soulignée par un trait noir coupant la réflexion de la lumière, permet de suivre la rétractation du liquide vers l'intérieur du dispositif sous l'effet de l'évaporation.

Sur la figure 3.5a, la géométrie du bord libre est tracée selon la représentation de Young–Laplace, montrant clairement L'évolution de la courbure du ménisque attendue dans ce cas de figure. Le profil illustré met en évidence une rétractation du liquide se traduisant par un amincissement du col du pont capillaire par rapport à ses zones de contact avec les substrats.

Sur la figure 3.5b, la mesure par caméra du volume indique une perte d'environ 3% en 40 minutes, traduisant l'évaporation quasi négligeable du liquide. Cette observation de la variation volumique a été obtenue par profilométrie de surface et par traitement d'images acquises toutes les cinq minutes. Le faible taux d'évaporation souligne l'efficacité du confinement capillaire à ralentir la perte de liquide par évaporation. Ils fournissent ainsi une base solide pour le dimensionnement du dispositif mésoscopique et assurent une stabilité des mesures compte tenu du temps réel de mesure (inférieur à 5 minutes).



(a) Représentation théorique de la diminution du volume de liquide d'un pont capillaire dans le temps



(b) Relevés expérimentale de la mesure d'évaporation en 20 minutes.

FIGURE 3.5 – *Représentation théorique (a) et mesure pratique (b) de l'évaporation des liquides au cours du temps pour le dispositif mésoscopique*

3.2.2.2 Tailles des dispositifs, fréquence d'étude et perturbation

Afin de dimensionner le dispositif mésoscopique nous devons prendre en compte la taille des électrodes, le milieu à étudier, les fréquences de travail et les perturbations radio-fréquences qui peuvent intervenir. Nous proposons de regrouper l'influence de la taille et du milieu sur la figure de mérite 3.6.

La figure présente la capacité et la résistance en fonction de la surface des électrodes. On y reconnaît les courbes, en nuances de rouge, correspondant à la capacité définie par l'équation (3.1) pour trois épaisseurs $h = 600\,\mu$m, $800\,\mu$m et $1000\,\mu$m (traits plein, tiret, pointillé), et les trois familles de courbes de résistance R comme défini par l'équation (3.2) pour $\sigma = 10^{-4}\,\mathrm{S/m}$, $10^{-3}\,\mathrm{S/m}$

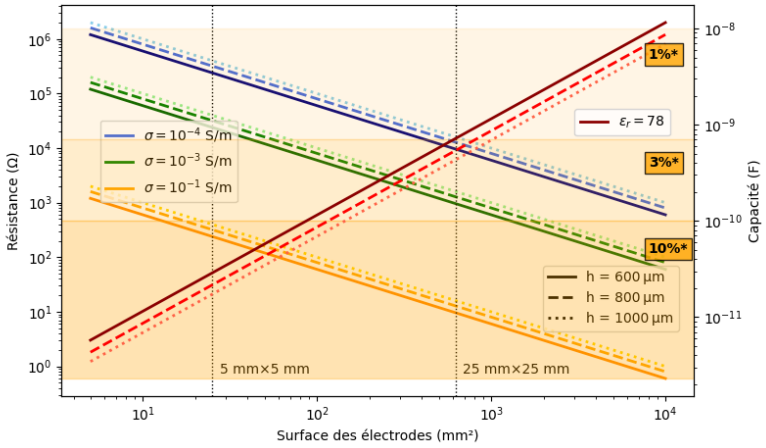


FIGURE 3.6 – *Caractérisation de la dépendance de la résistance R et de la capacité C d'un dispositif à électrodes parallèles face-à-face, en fonction de la surface S de chaque électrode (en mm²) et pour trois espacements h = 600 µm (traits pleins), 800 µm (tirets) et 1000 µm (pointillés). Les zones 1%, 3% et 10% correspondent à la sensibilité de l'Agilent 4294A sur la mesure de capacité à 10 kHz.*

et $10^{-1}\,\mathrm{S/m}$ (nuances de bleu, vert et orange respectivement), toujours pour les trois valeurs de hauteur h citées précédemment. Deux lignes verticales en pointillés noirs marquent les valeurs de surface $S = 25\,\mathrm{mm}^2$ et $S = 625\,\mathrm{mm}^2$, et des zones d'incertitude de 10 %, 3 % et 1 % liées à la sensibilité de l'Agilent 4294A à 10 kHz sont ombrées sur l'axe de la capacité. Cette figure permet de réaliser un choix sur la taille des électrodes. En effet, dans la zone de la dispersion beta (de 10 kHz à 1 MHz), la contribution majeure de l'impédance revient aux propriétés du milieu entre les électrodes.

Il faut donc s'assurer d'avoir la capacité la plus grande possible afin d'être dans la zone d'incertitude de l'appareil la plus faible possible. De plus, une plus grande capacité permettra une meilleure sensibilité sur les variations de la solution car les valeurs seront éloignées du plancher de bruit. Pour cela, nous devrions choisir un dispositif avec des électrodes les plus grandes possibles. Cependant, comme vu dans la sous-section 2.1.3.4 les traitements infligés aux bactéries risquent de changer la conductivité des milieux aqueux d'étude. Il faut donc également prendre en compte la conductivité du milieu dans nos choix.

Il s'agit donc de choisir un compromis de taille de d'électrodes afin d'obtenir des résistances supérieures à la centaine d'ohm ce qui permettra de conserver une précision suffisante sur la lecture de la résistance.

De même, il faut prendre en compte l'approximation du régime quasi–stationnaire (ARQS) qui suppose que toutes les dimensions caractéristiques d'un système électrique restent inférieures à un dixième de la longueur d'onde λ associée à la fréquence d'excitation afin de ne pas avoir d'effets propagatifs qui viendraient perturber la mesure. Cette fréquence est exprimée sous la forme :

$$f_d = \frac{c}{10\,d} \tag{3.11}$$

Avec d représentant soit l'espacement h, soit la taille caractéristique L des électrodes. En considérant des électrodes carrées de côté $\mathrm{L} = 25\,\mathrm{mm}$ et un espacement $\mathrm{h} = 800\,\mu\mathrm{m}$, on obtient $\mathrm{f_h} = \frac{\mathrm{c}}{10\mathrm{h}} \approx 37{,}5\,\mathrm{GHz}$ et $\mathrm{f_L} = \frac{\mathrm{c}}{10\mathrm{L}} \sim 1{,}2\,\mathrm{GHz}$, ce qui impose la condition pratique $\mathrm{f} \ll 1{,}2\,\mathrm{GHz}$ pour rester dans le régime quasi–stationnaire. Pour des électrodes deux fois plus grandes on aurait une fréquence d'excitation deux fois plus petite.
Cette limite en fréquence est largement compatible avec notre gamme d'étude, s'étendant de 10 kHz à 1 MHz, au sein de laquelle la permittivité de l'eau sera considérée comme constante pour l'observation cellulaire. Cette approche est cohérente avec les modèles de la littérature négli-

geant les variations de permittivité dans cet intervalle fréquentiel [228]. Notre choix d'électrodes de 25 mm par 25 mm nous permet ainsi d'avoir une bonne tenue mécanique, d'être loin de la limite de l'ARQS et d'optimiser la valeur de la capacité comme celle de la résistance tout en ayant une incertitude de la capacité de l'appareil à 1 %.

Cette configuration mésoscopique, utilisant l'analyseur Agilent 4294A et des électrodes en vis-à-vis sur substrat FR4, assure des mesures d'impédance précises pour des volumes de 500 μL à 1 mL. La modélisation du condensateur plan idéal relie directement la capacité à la géométrie de l'électrode et à la permittivité du milieu. Cette configuration assure également un lien direct entre la résistivité et la conductivité du milieu. De plus l'analyse d'un éventuel défaut de parallélisme lors du montage du système met en évidence un impact maximal de 3 % sur la capacité totale. Le détail de ce calcul est présenté en annexe B.
Ce montage offre donc une plateforme robuste et reproductible pour la spectroscopie d'impédance de suspensions biologiques.

3.2.3 Dispositif sur verre

La conception des électrodes interdigitées (IDE) est connue depuis les années 1990 [229-231]. L'étude des caractéristiques physiques des espacements des doigts et la longueur des peignes est déjà établie [232]. Elle repose sur l'analyse du modèle faite par Zaretsky *et al.* [233], qui établit la distribution des lignes de champs élecriques aux niveau des électrodes. Jacobs *et al.* 1995, proposent quant à eux un modèle de conception d'électrodes planes. L'utilisation d'électrodes interdigitées pour la mesure d'impédance est déjà largement exploitée [234]. Elle découle d'une analyse électronique des électrodes interdigitées présentée par Van Gerwen *et al.* [220]. Cependant, leurs études concernent des électrodes d'épaisseur nanométrique et non micrométrique comme envisagé dans cette étude.

Cette section est dédiée à l'étude de dispositifs de mesure impédancemétrique sur verre, dans une perspective d'intégrer ce capteur sur le dispositif multiphysique présenté dans le chapitre 1. Pour cela, nous avons sélectionné des électrodes interdigitées afin de nous affranchir de la connectique complexe d'un dispositif de petite échelle en trois dimensions. Nous détaillerons dans un premier temps l'utilisation des électrodes interdigitées dans la littérature et leur modélisation électrique. Nous présenterons dans un second temps deux autres types d'électrodes en configuration 2D : les électrodes serpentines et circulaires. Nous poursuivrons avec les procédés de fabrication de ces électrodes sur un substrat de verre et nous finirons par le plan de conception des jeux d'électrodes choisis.

3.2.3.1 Électrodes interdigitées

Pour un capteur interdigité immergé dans un électrolyte, le circuit équivalent comporte traditionnellement deux capacités appelées C_{dl} correspondant aux phénomènes proches des électrodes. La nature de ces capacités C_{dl} sera abordé dans le section 3.3 de ce chapitre. Ces deux capacités sont en série avec le couple RC de la solution modélisé sur la figure 3.1. Pour des électrodes interdigitées on a :

$$R = \frac{K_{\mathrm{cell}}}{\sigma_{\mathrm{sol}}} \tag{3.12}$$

$$C = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_{r,\mathrm{sol}}}{K_{\mathrm{cell}}} \tag{3.13}$$

où σ_{sol} est la conductivité de l'électrolyte et $\varepsilon_{r,\mathrm{sol}}$ sa permittivité relative [235]. On voit donc apparaître un coefficient K_{cell} permettant de relier les dimensions des électrodes aux valeurs mesurées par le dispositif. La constante de cellule K_{cell} dépend uniquement de la géométrie périodique

des doigts (largeur W, espacement S, longueur L, nombre de doigts N) :

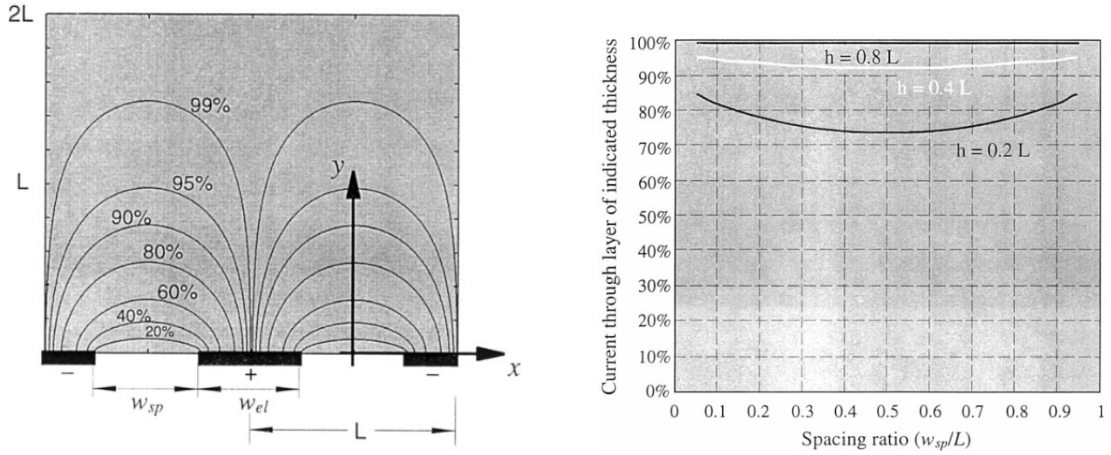
$$K_{\text{cell}} = \frac{2}{(N-1)L}\frac{K(k)}{K(\sqrt{1-k^2})}, \quad k = cos(\frac{\pi}{2}\frac{W}{W+S}), \tag{3.14}$$

avec $K(\cdot)$ l'intégrale elliptique complète de première espèce [230].

La capacité augmente quand on allonge la longueur des doigts (L), qu'on multiplie leur nombre (N), qu'on élargit leur largeur (W) ou qu'on utilise un milieu à permittivité plus élevée. En revanche, elle diminue dès que l'espacement entre doigts (S) s'accroît ou que la permittivité du milieu baisse. Ainsi, un calcul un peu plus lourd est nécessaire pour définir les géométries des électrodes interdigitées permettant d'obtenir une capacité désirée.

L'analyse par éléments finis [236] permet de calculer directement la valeur de la capacité associée à un motif précis. Il est également possible de réaliser des prototypes d'électrodes interdigités pour en mesurer la valeur de la capacité [237].

L'analyse part du principe que si les bords des électrodes sont assez espacés, on peut ne prendre en compte que le champ généré entre les peignes tel que présenté sur la figure 3.7.



(a) Champ électrique en coupe pour des électrodes interdigitées [220]

(b) Conductivité électrique en fonction de la distance entre les peignes des électrodes [220]

FIGURE 3.7 – *Comparaison des caractéristiques des électrodes interdigitées : (a) distribution du champ électrique, (b) variation de la conductivité électrique selon l'espacement des peignes.*

Cette figure présente la répartition du champ électrique et du courant entre les électrodes avec comme paramètres w_{sp} la largeur entre les électrodes et w_{el} la largeur d'une électrode. Enfin, L représente la somme des deux longueurs. Dans l'article [220] d'où est tirée cette figure, ils appliquent un tension symétrique de $\frac{+V}{2}$ et de $\frac{-V}{2}$ aux deux électrodes. Pour des électrodes de $250\,nm$ de largeur(w_{el}) et $250\,nm$ d'espacement ($L = 500\,nm$) plus de 80% du courant circule à moins de 250 nm de la surface substrat.

Un deuxième exemple d'implémentation proposé par (Van Gerwem et al. 1998) [220] donne un ratio entre l'espacement inter-électrodes S et la largeur L de $\frac{S}{L} = 0,5$. en prenant également une épaisseur égale à $0,4 \times L$. Cette configuration laisse passer 92% du courant à une distance inférieure à $0.4 \times L$ de la surface du substrat. Cette analyse montre qu'une configuration d'électrodes interdigitées confine le courant proche de la surface des électrodes. Cela permet d'envisager des volumes de mesure avec une épaisseur très faible, de l'ordre de grandeur de la période des électrodes, et ainsi d'intégrer fortement le capteur.

La dépendance de la constante de cellule K_{cell} vis à vis des dimensions physiques peut être étudiée grâce à la résolution numérique des intégrales elliptiques du premier ordre intervenant dans

l'équation (3.14). La figure 3.8 représente l'influence des paramètres physiques (longueur, largeur, espacement et nombre de doigts) sur le paramètre K_{cell}. On observe que tous les paramètres sauf l'espacement entre les doigts font diminuer K_{cell}.

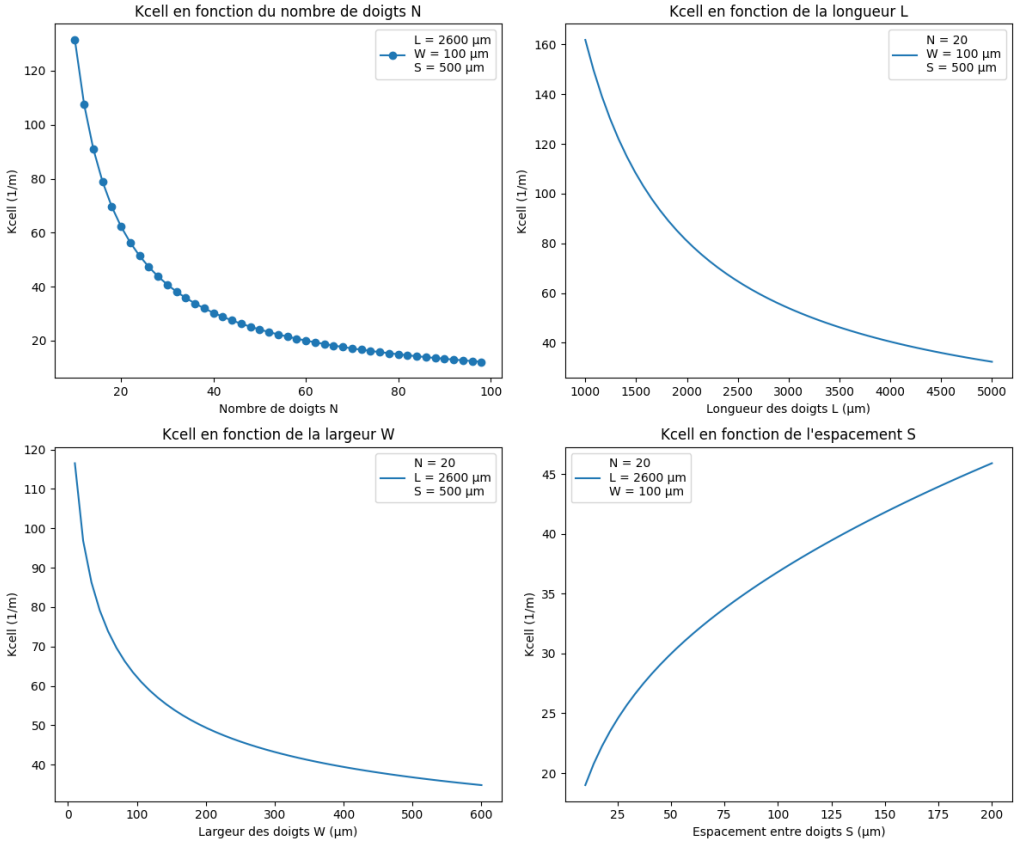


FIGURE 3.8 – *Évolution de la constante de cellule K_{cell} en fonction de quatre paramètres géométriques caractéristiques des électrodes interdigitées : **(a)** nombre total de doigts N (avec $L = 1000\,\mu m$, $W = 20\,\mu m$, $S = 30\,\mu m$); **(b)** longueur des doigts L (avec $N = 20$, $W = 20\,\mu m$, $S = 30\,\mu m$); **(c)** largeur des doigts W (avec $N = 20$, $L = 1000\,\mu m$, $S = 30\,\mu m$); **(d)** espacement inter-doigts S (avec $N = 20$, $L = 1000\,\mu m$, $W = 20\,\mu m$). On observe que K_{cell} décroît avec L et W, et croît avec N et S*

3.2.3.2 Procédés sur substrat de verre

Dans le cadre du projet global de détection multiphysique, nous avons besoin d'intégrer le dispositif de mesure sur du verre. Le laboratoire CROMA, à la pointe de la recherche sur la photonique intégrée sur verre possède l'infrastructure et moyens de microfabrication nécessaires pour réaliser le dépôt d'électrodes sur du verre. Dans un premier temps un substrat de verre BF33 de chez Schott® est successivement nettoyé à l'aide de d'acétone, d'isopropanol et eau désionisée. Suite à cela nous avons réalisé un dépôt par évaporation d'une couche de 400 nm d'aluminium. Nous avons déposé une couche de résine photosensible positive afin de pouvoir l'exposer aux UV via un masque de lithographie. La couche de photosensible insolée a ensuite été développée et l'aluminium gravé par voie humide grâce à un mélange contenant de l'acide orthophosphorique. Finalement, la couche de résine masquante est retirée pour dévoiler les électrodes en aluminium. L'ensemble de ces étapes est représentée sur la figure 3.9.

Par ce procédé, nous avons réalisé et caractérisé un prototype d'électrodes interdigitées IDE. Ce dispositif comporte 100 doigts, de largeur 40 μm, espacés de 40 μm, pour une longueur 2 mm,

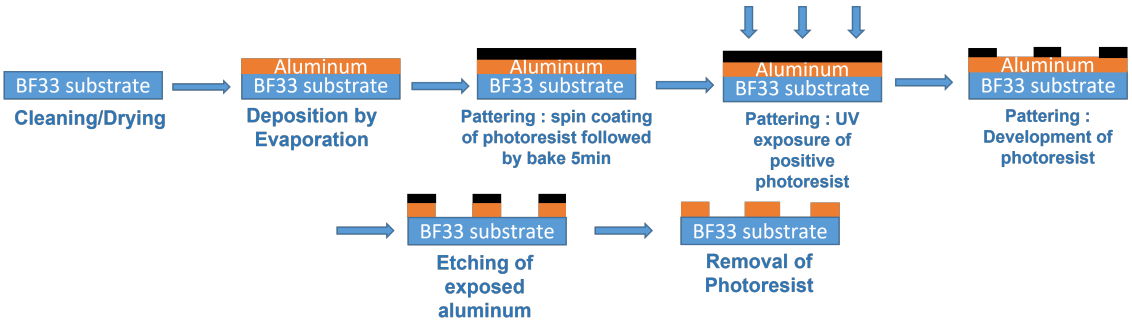


FIGURE 3.9 – *Représentation schématique du processus de fabrication utilisé pour obtenir des électrodes sur verre par un procédé de photolithographie. Tirée de [154]*

ce qui définit une une aire active de $32\,\mathrm{mm}^2$. Afin de calculer les valeurs de capacités et de résistance équivalentes de cette géométrie d'électrodes interdigitées ($N = 100$, $W = S = 40\,\mu\mathrm{m}$, $L = 2$ mm) nous allons prendre des conditions de milieu pour une eau désionisée ($\sigma_{sol} = 10^{-4}\,\mathrm{Sm}^{-1}, \varepsilon_{r,sol} = 78$). L'application des équations (3.12) et (3.13) conduit à une résistance de solution $R = 101\,\mathrm{k\Omega}$ et à une capacité équivalente $C = 68,4\,\mathrm{pF}$. À 10 kHz, la mesure de cette capacité avec l'analyseur d'impédance Agilent 4294A se situe dans la plage où l'incertitude spécifiée est de l'ordre de 10 % pour des capacités inférieures à $10^{-10}\,\mathrm{F}$ comme indiqué sur la figure 3.6. Ainsi ces électrodes 2D de faible dimension permettent d'étudier de faibles volumes bien que la valeur de capacité soit impactée par ces incertitudes.

L'analyse présentée au chapitre 4 dans la dernière section porte exclusivement sur ce design.

3.3 Propriétés de transport électrique dans les milieux aqueux

Cette section a pour objectif de présenter les processus électrochimiques élémentaires qui ont lieu dans les solutions aqueuses salines (eau et ions $(\mathrm{Na}^+, \mathrm{Cl}^-)$) et comment ceux-ci se traduisent dans la mesure d'impédance effectuée par le dispositif mésoscopique. Pour cela, nous commencerons par définir les processus électrochimiques les plus communs ainsi que leurs représentations sous forme de circuits électriques. Nous décrirons alors le comportement fréquentiel de ces différents circuits électriques. Finalement, nous étudierons la réponse impédancemétrique du dispositif mésoscopique lors de l'analyse des solutions salines. Cette étude se basera sur la comparaison avec l'état de l'art des mesures de conductivité électrique des solutions salines et de leur compréhension théorique.

3.3.1 Approche électrochimique

Dans trois articles successifs, en 1977, 1990 et 1992, James Ross Macdonald [238-240] a décrit diverses constructions de circuits équivalents électriques tenant compte des phénomènes électrochimiques et dont la réponse peut être en accord avec les mesures de spectroscopie d'impédance. Ces constructions mettent en oeuvre divers éléments que nous listons d'abord avant de les décrire plus en détail.

1. **Réponse électrique en volume de la solution :** Elle se modélise souvent via un circuit composé d'une résistance (R_{bulk}) en parallèle avec une capacité (C_{bulk}), représentant respectivement la conduction des ions et la polarisation des molécules dans la solution. La réponse des ions mobiles

dépend principalement de la fréquence de la tension appliquée, de la masse des ions considérés et de la viscosité dynamique de la solution.

2. **Réactions aux électrodes :** Des réactions électrochimiques se produisent aux interfaces entre l'électrode et l'électrolyte. La résistance de contact (R_{ct}) et la capacité de double couche (C_{dl}) modélisent cette interaction, reflétant des processus de transfert de charge.

3. **Adsorption aux électrodes :** Le phénomène d'adsorption se combine au phénomène précédent et peut influencer les mesures d'impédance aux fréquences proches du Hz. Une résistance d'adsorption (R_A) et une capacité associée en parallèle (C_A) sont ajoutées au circuit pour représenter cette adsorption sur la surface des électrodes.

4. **Génération et recombinaison en vrac :** Les effets de génération et recombinaison des charges (comme les paires d'ions) au sein du matériau (dans notre cas un liquide) peuvent être pris en compte par des éléments diffusifs distribués. Ceux-ci modélisent la dissipation d'énergie dans le système et sont également représentés par un circuit RC en série avec celui du milieu.

5. **Diffusion :** Ce phénomène correspond au déplacement des espèces ioniques sous l'effet de gradients de concentration, souvent modélisé par une impédance dite "de Warburg" dans le circuit équivalent. Cette impédance a la particularité d'avoir une phase constante en fréquence. Cela affecte surtout la réponse à basse fréquence.

3.3.1.1 Réponse électrique en volume de la solution

Les effets résistifs-capacitifs dans les systèmes électrochimiques traduisent la réponse électrique intrinsèque du milieu aqueux conducteur et diélectrique que constitue la solution contenant du NaCl. Ils sont liés en premier lieu aux interactions entre les charges mobiles (ions ou électrons) et le champ électrique appliqué. En effet, la solution aqueuse contient des ions mobiles qui lui confèrent une conductivité électrique (comportement résistif) tout en ayant une permittivité diélectrique (due notamment à l'orientation des molécules dipolaires de l'eau), ce qui lui confère aussi un comportement capacitif. Le modèle résistif-capacitif est souvent représenté par une résistance en parallèle avec un condensateur représentant respectivement la conduction ionique dans la solution et la capacité diélectrique du volume de solution. En pratique, R_{bulk} correspond à la résistance ohmique de la solution entre les deux électrodes, et C_{bulk} à la capacité géométrique associée à la permittivité de l'eau confinée entre les plaques. Ce modèle ne suppose aucune réaction chimique car il s'agit simplement de la conduction ionique et de la polarisation électrique de la solution dans tout le volume entre les deux électrodes. A l'image d'un circuit RC, la fréquence de coupure dépendra des propriétés du milieu. A mesure que la fréquence de mesure augmente, le système passera d'un comportement résistif pur à un comportement capacitif pur car l'inversion rapide du champ ne permet plus aux ions de la suivre lorsque la fréquence est bien au-dessus de la fréquence de coupure. Ce comportement résistif-capacitif est souvent prédominant dans la réponse du système (tout comportement confondu) comme nous le verrons plus tard au dessus de 1 KHz et en dessous de 1 GHz bien que les fréquences de relaxation des molécules d'eau soient aux alentours de 10 GHz [228].

3.3.1.2 Réactions aux électrodes

Les réactions électrochimiques aux interfaces électrode-électrolyte jouent un rôle crucial dans la spectroscopie d'impédance, car elles impliquent le transfert de charges entre le matériau solide de l'électrode et les espèces ioniques ou moléculaires en solution. Lorsqu'une perturbation AC est appliquée, les ions à l'interface peuvent échanger des électrons avec l'électrode (réaction faradique) si le potentiel local le permet. La cinétique de telles réactions est caractérisée par la nature des charges transférées et par la formation d'une double couche électrique à l'interface. En régime AC, la réponse dépend de la vitesse relative de la réaction par rapport à la fréquence. Aux alentours du Hz, la réaction a le temps de s'accomplir quasiment jusqu'à l'équilibre faradique à chaque demi-période, ce qui se traduit par un courant faradique significatif (dissipatif). Pour des

fréquences supérieures au Hz mais inférieures au KHz, en revanche, le courant n'a pas le temps de passer sous forme faradique car la réaction n'a pas le temps de se dérouler pleinement avant l'inversion du signal. Le courant va alors résulter d'une charge/décharge capacitive de la double couche.

Le composant principal est la résistance de charge de transfert R_{ct}, représentant la dissipation associée au courant faradique traversant l'interface. En parallèle à cette résistance se trouve la capacité de double couche C_{dl}, qui caractérise le stockage non faradique de charges à cette même interface. Notons que la valeur de C_{dl} est généralement beaucoup plus faible que celle des pseudo-capacités associées à l'adsorption ou à la diffusion, ce qui rend difficile de distinguer le processus faradique des autres contributions présentes à basse fréquence.

3.3.1.3 Adsorption aux électrodes

L'adsorption aux électrodes concerne la fixation d'ions ou de molécules à la surface des électrodes sans transfert de charge immédiat (adsorption non faradique). En effet, les espèces adsorbées portent une charge (totale ou partielle) à la surface, ce qui équivaut à stocker de la charge électrique de manière réversible. Le modèle électrochimique correspondant à ce phénomène inclut une résistance d'adsorption (R_{ads}) et une capacité associée (C_{ads}), qui sont ajoutées au circuit équivalent pour modéliser l'interaction des espèces adsorbées avec la surface de l'électrode.

À basse fréquence, notamment en dessous de 10 Hz, l'adsorption devient particulièrement visible, car les espèces ioniques ou moléculaires ont suffisamment de temps pour interagir avec la surface de l'électrode, augmentant ainsi la résistance d'adsorption R_{ads}.

Pour un capteur non fonctionnalisé comme présenté en introduction de ce chapitre, sans espèce spécialement adsorbante, ce phénomène peut être négligé.

3.3.1.4 Génération et recombinaison en vrac

Les effets de génération et recombinaison en vrac se produisent lorsque des paires de charges, telles que des paires d'ions ou d'électrons-trous, sont créées ou annihilées au sein d'un matériau électrochimique. Ces processus influencent fortement la réponse électrochimique, car ils entraînent un changement de conductivité, souvent observée sous forme de pertes ohmiques dans le système. Pour les solutions contenant un électrolyte, ce phénomène peut exister via l'association transitoire d'un cation et d'un anion en une paire neutre.

La génération/recombinaison se produit dans le volume de la solution (en vrac), de manière homogène, et n'implique pas directement les électrodes. Il s'agit d'une propriété de l'électrolyte lui-même.

On peut représenter un processus de génération-recombinaison par un dipôle RC supplémentaire en volume, analogue à un processus de relaxation de Debye dans le milieu. La capacité associée C_{gr} représente la capacité du milieu à stocker des charges sous forme de paires d'ions (il s'agit, en d'autres termes, de la capacité chimique liée à la variation de concentration de porteurs). Ce dipôle $R_{gr}C_{gr}$ aura une constante de temps τ_{gr} gouvernée par la cinétique de recombinaison des ions (ou la constante d'équilibre de formation des paires). Dans une solution aqueuse, le temps de vie des paires d'ions ou des complexes ion-solvant est de l'ordre de la nano à microseconde, ce qui correspond à des fréquences de relaxation de l'ordre de 10^5 à 10^7 Hz. Ainsi, on peut s'attendre à ce que la relaxation par recombinaison ionique apparaisse dans la gamme 1 kHz à 1 MHz, jusqu'à quelques MHz selon la force ionique de la solution. Dans un diagramme d'impédance, un tel processus pourrait apparaître comme un couple RC additionnel, souvent confondu dans la réponse diélectrique du volume. En effet, la relaxation de génération-recombinaison est fréquemment noyée dans la réponse globale du milieu, mais théoriquement elle constitue une contribution distincte, que des analyses fines peuvent théoriquement extraire. Dans une solution d'électrolytes composée de NaCl, les ions sont majoritairement dissociés en permanence. La recombinaison ionique étant faible dans ce cas, ce processus peut être difficile à discerner. Cependant, cet effet peut

être présent et pertinent pour le cas d'électrolytes faibles. En effet, ces électrolytes influencerons la réponse électrochimique sans avoir des propriétés de conductivité et de permittivité remarquables par l'effet résistif/capacitif.

3.3.1.5 Diffusion

Le phénomène de diffusion dans les systèmes électrochimiques correspond au transport massique par diffusion des ions en solution, généralement mis en jeu lorsqu'une réaction ou un gradient de concentration apparaît aux électrodes. Si les électrodes consomment ou produisent des ions (par réaction faradique) ou même si elles accumulent des charges (double couche), cela crée un gradient de concentration dans la solution adjacente (couche de diffusion). Cet effet est lié aux effets mentionnés précédemment, ce qui lui impose une dépendance en fréquence. Le résultat est une impédance de diffusion qui se manifeste souvent par un comportement complexe, ni purement capacitif ni purement résistif.

Le processus de diffusion prend naissance dans une couche de diffusion qui s'étend de la surface de l'électrode vers la solution. Ainsi, la diffusion implique principalement la région de solution adjacente aux électrodes (quelques dizaines à centaines de micromètres, selon la fréquence et le coefficient de diffusion). Dans une cellule de mesure ayant deux électrodes en vis à vis, chaque électrode aura sa propre couche de diffusion.

Macdonald note que la pseudocapacité basse fréquence, due à la diffusion, peut être très grande, souvent bien supérieure à la capacité de double couche. Ainsi, le modèle équivalent peut inclure une capacité de diffusion C_{diff} en parallèle qui domine à très basse fréquence (représentant l'accumulation quasi-statique d'excès d'ions près des électrodes quand le flux diffusif ne peut plus les évacuer). Pour nos besoins, on retiendra que la diffusion apparaît comme une augmentation conjointe de la partie résistive et capacitive à basse fréquence, signature du transport de masse limité.

3.3.1.6 Bilan fréquentiel

Le tableau 3.1 présente une synthèse des principaux processus électrochimiques décrits par Macdonald [240], en fonction des plages de fréquences caractéristiques et des milieux étudiés. Chaque interaction est associée à un modèle de circuit équivalent permettant de l'identifier dans un spectre d'impédance. Cette cartographie sert de référence pour interpréter les réponses expérimentales selon la nature du milieu et la gamme fréquentielle utilisée.

Interactions / Milieux	**1 Hz - 1 kHz**	**1 kHz - 1 MHz**	**1 MHz - 100 MHz**
Milieu Théorique			
Effets résistifs-capacitifs (volume)	$R_{\text{bulk}} \parallel C_{\text{bulk}}$	$R_{\text{bulk}} \parallel C_{\text{bulk}}$	$R_{\text{bulk}} \parallel C_{\text{bulk}}$
Réactions aux électrodes	$R_{ct} \parallel C_{dl}$		
Adsorption aux électrodes	$R_{\text{ads}} \parallel C_{\text{ads}}$		
Génération et recombinaison (ion pairing)	$R_{\text{gr}} \parallel C_{\text{gr}}$	$R_{\text{gr}} \parallel C_{\text{gr}}$	
Diffusion	Z_W		

TABLEAU 3.1 – *Résumé des processus électrochimiques et circuits équivalents selon les plages de fréquences.*

Dans le cadre de notre étude, nous nous concentrerons principalement sur la gamme de fréquences comprise entre 1 kHz et 100 MHz, qui permet de sonder les propriétés du milieu électrolytique lui-même, sans que dominent les processus de surface lents (comme la diffusion ou

l'adsorption). Cette bande fréquentielle met en évidence les contributions résistives-capacitives du volume (modèle $R_{\text{bulk}}C_{\text{bulk}}$) et potentiellement, dans certains cas, des phénomènes rapides de recombinaison. Toutefois, dans une solution de NaCl diluée, les ions sont considérés comme totalement dissociés, ce qui rend négligeable tout processus de génération/recombinaison en volume. Par conséquent, aucune relaxation supplémentaire de type $R_{\text{gr}}C_{\text{gr}}$ n'est attendue dans cette plage de fréquence. Cela permet de simplifier l'analyse en attribuant les variations d'impédance principalement à la structure conductrice et diélectrique du milieu entre les électrodes.

3.3.2 Propriétés électriques des milieux aqueux ioniques

Dans cette partie nous allons définir les éléments nécessaires à l'analyse de signaux d'impédancemétrie dans des solutions ioniques. Il sera nécessaire dans un premier temps de comprendre les interactions entre le champ électrique et les ions dans les solutions aqueuses. Dans un second temps nous définirons la conductivité des solutions ioniques. Finalement, nous verrons des cas de figures d'études de conductivité ionique à l'aide de mesures d'impédance.

3.3.2.1 Mobilité des ions

Dans une solution aqueuse contenant des ions (un électrolyte dissous) et deux électrodes, le passage du courant se fait via le déplacement dirigé de ces ions. Sous l'action d'un champ électrique E imposé entre deux électrodes, un ion de charge $q = z_i \cdot e$ (avec e la charge élémentaire et z_i la valence, positive pour un cation, négative pour un anion) subit une force électrique $F_{elec} = qE$ orientée vers l'électrode opposée à sa charge. Ce mouvement est freiné par les forces de frottement visqueux dues aux interactions de l'ion avec le solvant. À l'échelle microscopique, on modélise cette force de friction $f = -k\eta v$, proportionnelle à la vitesse v de l'ion et au coefficient de viscosité η de l'eau (le coefficient k dépend de la taille effective de l'ion solvaté).

Sous l'effet d'un champ E en Vm^{-1}, l'ion atteint rapidement une vitesse limite (dite "vitesse de dérive" ou "vitesse de migration") v_{lim} en ms^{-1} lorsque la force électrique et la force de frottement s'équilibrent. On a alors $|q|E = k\eta v_{lim}$, d'où $v_{lim} = \frac{q}{k\eta}E$. On définit la mobilité ionique μ de l'ion comme le rapport de sa vitesse à l'intensité du champ :

$$\mu = \frac{v_{lim}}{E} \tag{3.15}$$

La mobilité μ a donc pour unité $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ et représente la vitesse par unité de champ. D'après l'équation précédente, on a $\mu = \frac{q}{k\eta}$. Ainsi, plus un ion a une petite taille (hydrodynamique) ou une charge élevée, plus sa mobilité est grande, et plus le solvant est fluide (faible η), plus les ions se déplacent aisément. En solution aqueuse diluée à $25°C$, les mobilités typiques des ions sont de l'ordre de 10^{-8} $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La mobilité des ions dans l'eau à $25°C$ est largement documentée [241]. Le tableau 3.2 résume les valeurs des mobilités pour des ions classiquement utilisés.

Ion	Mobilité $10^{-8}\ m^2V^{-1}s^{-1}$	Ion	Mobilité $10^{-8}\ m^2V^{-1}s^{-1}$
Ag^+	6,42	K^+	7,62
Al^{3+}	5,47	Li^+	4,01
Ba^{2+}	7,09	Mg^{2+}	5,36
Br^-	8,09	Na^+	5,19
Ca^{2+}	6,17	NH_4^+	7,63
Cl^-	7,91	NO_3^-	7,40
Cs^+	8,55	OH^-	20,64
H^+	36,23	Rb^+	8,06
I^-	7,68		

TABLEAU 3.2 – *Table des valeurs de mobilités pour les ions dans l'eau à 25°C. Tirée de [241].*

3.3.2.2 Conductivité électrique et loi de Kohlrausch

La conductivité électrique σ d'une solution électrolytique mesure sa capacité à conduire le courant électrique (elle est l'inverse de la résistivité). Microscopiquement, σ reflète la somme des contributions de tous les ions présents en solution.

Considérons un électrolyte fort entièrement dissocié, par exemple le chlorure de sodium NaCl dissous dans l'eau. En solution, cette dissolution donne naissance à deux ions : un cation Na^+ et un anion Cl^-. Sous champ électrique continu, les cations migrent vers la cathode (pôle négatif) et les anions vers l'anode (pôle positif), chacun contribuant au courant. La conductivité totale peut s'exprimer comme la somme des conductivités partielles de chaque type d'ion :

$\sigma = \sigma_{Na^+} + \sigma_{Cl^-}$

À dilution suffisante (ions indépendants les uns des autres), Friedrich Kohlrausch a établi en 1875 que chaque ion apporte une contribution additive à la conductivité, indépendante de la présence des autres ions. C'est la loi de Kohlrausch de migration indépendante des ions, qui stipule que la conductivité molaire limite Λ_m^0 d'un électrolyte (conductivité pour 1 mole d'électrolyte dans un volume donné, à dilution infinie) est la somme des conductivités molaires ioniques de ses ions. Dans le cas d'un électrolyte binaire A^+B^- entièrement dissocié, on a :

$\Lambda_m^0(A^+B^-) = \lambda_{A^+}^0 + \lambda_{B^-}^0$

où $\lambda_{A^+}^0$ et $\lambda_{B^-}^0$ sont les conductivités molaires ioniques (ou équivalentes ioniques) à dilution infinie du cation et de l'anion, respectivement. Pour NaCl par exemple, $\Lambda_m^0(\text{NaCl}) = \lambda_{Na^+}^0 + \lambda_{Cl^-}^0$.

La conductivité molaire ionique λ_i d'un ion i (exprimée en Sm^2/mol) représente la contribution en conductivité d'une mole de cet ion en solution. Elle est reliée à la mobilité de l'ion. En effet, lorsqu'un ion se déplace sous champ, il transporte sa charge électrique. Plus précisément, la relation fondamentale est :

$$\lambda_i = z_i F \mu_i \tag{3.16}$$

où z_i est la valence, et F la constante de Faraday correspondant au produit de la charge élémentaire par la constante d'Avogadro N_A et μ_i la mobilité de l'ion. Cette formule (3.16) et les travaux qui lui sont associés sont très répandus dans la littérature et donnent les valeurs de référence pour les chimistes.

3.3.2.3 Formulation de la conductivité : cas de l'électrolyte (NaCl)

Nous proposons d'utiliser une formule dérivée de la loi de Kohlrausch. Elle redéfinit la conductivité , pour une solution de NaCl, comme étant :

$$\sigma = ne\left(\mu_{Na^+} + \mu_{Cl^-}\right) \tag{3.17}$$

Cette expression est cohérente avec la loi établie précédemment. On reconnaît la participation de la somme des éléments ioniques à la conductivité générale. De plus, on prend comme postulat que les concentrations des deux éléments sont égales. La valence des ions Na^+ et Cl^- vaut 1, ce qui nous permet de ne pas l'inclure. La constante de Faraday est développée pour, d'une part, faire apparaître la charge élémentaire e et, d'autre part, inclure la constant d'Avogadro dans n. En effet, ici n correspond au nombre d'ions par mètre cube. Pour déterminer ces valeurs en atomes par litre, il faut donc inclure la constante d'Avogadro N_A $(6,022 \times 10^{23})$.

La pertinence de l'équation proposée précédemment (éq. (3.17)) peut être démontrée en établissant le lien direct avec la densité de courant électrique dans une solution de NaCl sous l'action d'un champ électrique $\mathbf{E}$. Dans ce cas de figure, deux types d'ions sont présents : les cations sodium (Na^+) et les anions chlorure (Cl^-). Lorsqu'un champ électrique est appliqué, chaque type d'ion contribue au courant électrique total par son déplacement. La densité d'ions, notée n, correspond au nombre d'ions par unité de volume (en ions/m^3), chacun portant une charge électrique élémentaire e. La densité de courant électrique $\mathbf{j}$ (en A/m^2) générée par chaque type d'ion est définie comme le produit de la charge volumique, de la mobilité ionique correspondante et du champ électrique. Pour les cations sodium (Na^+), positifs, se déplaçant vers la cathode, et pour les anions chlorure (Cl^-), négatifs, leur déplacement vers l'anode on obtient :

$$j_{Na^+} = ne\mu_{Na^+}E \tag{3.18}$$

$$j_{Cl^-} = n(-e)(-\mu_{Cl^-})E \tag{3.19}$$

La densité de courant électrique totale $\mathbf{j}$ dans la solution est donc la somme de ces deux contributions ioniques :

$$j = j_{Na^+} + j_{Cl^-} = ne(\mu_{Na^+} + \mu_{Cl^-})E \tag{3.20}$$

Par ailleurs, par définition générale, la densité de courant est liée à la conductivité σ par la relation :

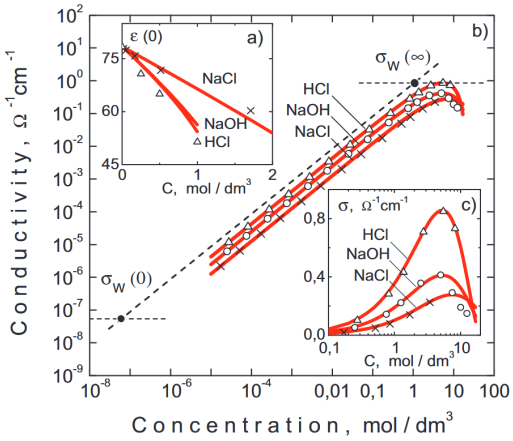
$$j = \sigma E \tag{3.21}$$

En comparant les deux expressions (3.20) et (3.21), on identifie clairement la conductivité électrique σ comme similaire à la formule (3.17). Ainsi, cette approche confirme non seulement la pertinence physique et théorique de la loi proposée, mais elle met également en évidence la proximité des domaines de la chimie et de l'électricité. Sur le tableau 3.3 nous proposons l'évolution de la conductivité théorique de solutions aqueuses de NaCl selon leur concentration en utilisant la formule (3.17).

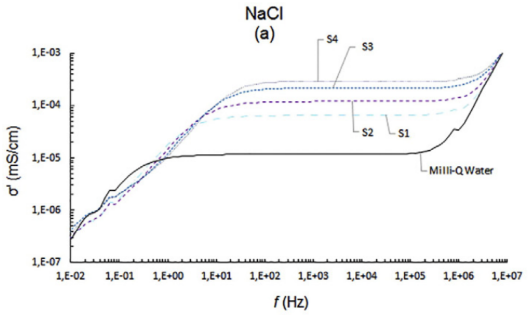
Concentration ($mmol/L$)	Concentration (mol/m^3)	Nombre d'ions n ($ions/m^3$)	Conductivité théorique ($\mu S/cm$)	Conductivité théorique (S/m)
0,1	0,1	$6,02 \times 10^{19}$	12,4	0,00124
0,2	0,2	$1,20 \times 10^{20}$	24,8	0,00248
0,5	0,5	$3,01 \times 10^{20}$	62,0	0,00620
1	1	$6,02 \times 10^{20}$	124	0,0124
10	10	$6,02 \times 10^{21}$	1180	0,118
100	100	$6,02 \times 10^{22}$	10700	1,070

TABLEAU 3.3 – *Valeurs théoriques de conductivité pour différentes concentrations de solutions aqueuses de NaCl.*

Nous allons maintenant passer en revue des travaux publiés en 2015 par V. G. Artemov [242] et en 2017 par L. F. Lima [243] présenté sur la figure 3.10. Ces travaux sur les conductivités aqueuses à l'aide de l'impédancemétrie ne sont pas présentés de la même manière. En effet, dans la figure de gauche, Artemov représente les conductivités en fonction des concentrations pour plusieurs espèces ioniques (NaCl, HC et NaOH) alors que Lima représente l'évolution des conductivités en fonction de la fréquence et chaque courbe présente sur le graphique, correspond à une concentration. Ces deux représentations sont affichées sur la figure 3.10.



(a) Évolution de la conductivité en fonction de la concentration en NaCl, HCl, NaOH .



(b) Évolution de la conductivité en fonction de la concentration en NaCl (S0=0mM, S1=0,118mM, S2=0,23mM, S3=0,471mM, S4=0,706mM) .

FIGURE 3.10 – *Analyse impédancemétrique de la conductivité du milieu : (a) variation avec la concentration des ions (Artemov et al. [242]), (b) variation avec la fréquence pour différentes concentrations de NaCl (Lima et al. [243]).*

Afin de comparer ces résultats à notre système mésoscopique présenté dans la section 3.2, nous avons réalisé des dilutions de NaCl avec de l'eau désionisée. De plus, les données de conductivité seront extraites du plateau central de chaque courbe obtenue en extrayant la conductivité par les formules (3.3) présentées pour le cas pratique d'un circuit RC , en introduction de ce chapitre. Le tableau 3.4 représente les concentrations choisies et les résultats retirés de ces études.

Solution	**Concentration** $mmol/L$	**Conductivité observé** $\mu S/cm$	**Conductivité théorique** $\mu S/cm$	$\delta_{theorique}$ $\mu S/cm$
Mesure de Lima				
S0	0,118	6,68	14,9	-8,22
S1	0,235	12,63	29,8	-17,17
S2	0,471	24,51	59,6	-35,09
S3	0,706	34,28	89,2	-54,92
Mesure d'Artemov				
S0	0,017	2,47	2,15	0,32
S1	0,05	7,10	6,45	0,65
S2	0,172	25,90	21,74	4,16
S3	0,5	75,19	62	13,19
Comparaison expérimentale				
S1	0,1	20,9	12,4	8,5
S2	0,2	37,1	24,8	12,3
S3	0,5	79,6	62	17,6
S4	1	158	124	34

TABLEAU 3.4 – *Valeurs de conductivité pratique et théorique pour différentes concentrations de solutions aqueuses de NaCl, issues des mesures de Lima, Artemov et avec notre dispositif mésoscopique.*

La comparaison croisée des données publiées (Lima, Artemov) et de nos mesures mésoscopiques montre que les trois jeux de résultats se situent dans le même ordre de grandeur que les prédictions théoriques. Les mesures d'Artemov présentent l'écart le plus faible, tandis que celles de Lima sous-estiment systématiquement les valeurs théoriques, avec un écart $\delta_{theorique}$ approximativement deux fois supérieur à celui observé avec notre dispositif. Nos résultats se placent ainsi entre ces deux références et demeurent compatibles avec le cadre théorique, indiquant que notre dispositif mésoscopique et l'interprétation préliminaire par un modèle électrique équivalent RC sont valides et prometteurs pour la suite des travaux.

3.4 Simulation du comportement électrique d'une bactérie

La simulation du comportement électrique des bactéries en solution est possible grâce à la modélisation par éléments finis. Dans la continuité des études passées [244] et [245], nous avons utilisé le logiciel COMSOL®. Nous proposons d'étudier dans cette partie la spectroscopie d'impédance d'une bactérie comme celle présentée sur la figure 3.11.

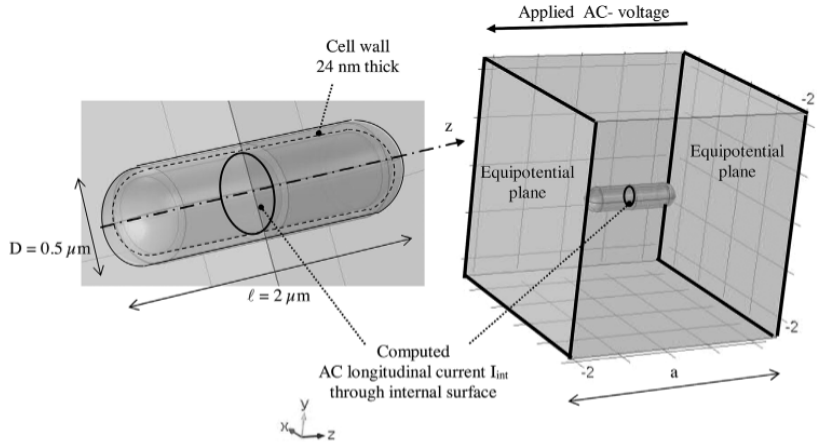


FIGURE 3.11 – *Représentation des conditions de modélisation de la bactérie en solution sous COMSOL®. D'après [245].*

De manière analogue aux travaux de Rauly [244], nous avons modélisé un volume élémentaire par un cube. Au milieu de ce dernier se trouve la représentation choisie d'une bactérie. Cette dernière est modélisée par un tube de longueur $1,5\,\mu$m et de diamètre $0,5\,\mu$m terminé par deux demi-sphères de diamètre $0.5\,\mu$m. Afin de représenter la paroi bactérienne et le cytoplasme nous avons soustrait à cette structure une forme similaire. Cette deuxième forme permet de définir un volume intérieur entouré d'une paroi de 0.24 nm.

Nous avons ainsi 3 domaines distincts : le milieu entourant la bactérie, la paroi cellulaire et le cytoplasme. C'est en choisissant les propriétés diélectriques de ces éléments que nous pourrons étudier divers cas tels que la bactérie vivante ou traitée par chaleur.

3.4.1 Modèle et valeur

L'analyse de la conductivité d'un milieu qui contient plusieurs millions de bactéries permet d'observer l'impact de l'ensemble de cette population sur la conductivité. Si les bactéries sont vivantes, un faible nombre de charges électriques (ions) présent aux abords de la bactérie se retrouvera mélangé au milieu. D'un autre côté, traiter les bactéries par chaleur induit un arrêt des fonctions de contrôle des canaux ioniques [194][195]. Les ions présents dans les bactéries vont se retrouver mélangés au milieu jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint. Ainsi, nous avons décidé d'étudier deux cas de figure, les bactéries vivantes dans un milieu peu conducteur et les bactéries traitées par chaleur dans le même milieu.

Le tableau 3.5 regroupe les valeurs choisies de conductivité et de permittivité pour les trois domaines de la simulation. En accord avec les calculs du chapitre 2 dans la sous-section 2.1.2.4, le nombre de charges amené par l'extérieur d'une bactérie est d'environ $7-8\times10^6$. Cette estimation se décompose en $1,6\times10^6$ charges liées à la couche de Stern, $6,25\times10^5$ à la couche de diffuse, et $4,8\times10^6$ par des reliquats de centrifugation.

Ces valeurs concernent uniquement les estimations pour une solution contenant des ions NaCl. Or, nous utilisons un milieu aqueux LB pour faire croître les populations bactériennes comme précisé dans la partie 2.2.5.2. Comme l'a montré [155], le nombre de charges amené par une bactérie

plongée dans un milieu type LB et dans un milieu NaCl peut être doublé. Pour les simulations, nous avons donc choisi de considérer environ 16×10^6 charges ramenées par la bactérie pour un milieu d'eau désionisé de conductivité $1\,\mu\mathrm{S/cm}$. Ce nombre de charges est ramené à une conductivité de $3,5\,\mu\mathrm{S/cm}$ en utilisant la formule (3.17). Il s'agit ici de prendre en compte l'effet des charges ramenées par la bactérie sur la conductivité avec ou sans traitement des bactéries par chaleur. Nous avons choisi de prendre la permittivité de l'eau à la valeur de 78. Ainsi nous avons réalisé quatre simulations. Les deux premières contiennent un milieu homogène dont la conductivité est liée au nombre de charge amené par la bactérie ('vivante' ou 'traitée par chaleur') Les deux autres correspondent à la simulation présentée dans la figure 3.11. Dans le cas "Simulation milieu traité sans bactérie", la conductivité est ajustée pour simuler l'équilibrage des ions intra et extracellulaires. Ces différentes configurations de simulation permettent d'isoler la contribution diélectrique de chaque compartiment (cytoplasme, paroi et milieu de suspension) selon l'état physiologique, sain ou dégradé, des populations bactériennes.

Configuration	**Cytoplasme**		**Paroi cellulaire**		**Milieu**	
	ε_r	$\sigma\,(S/m)$	ε_r	$\sigma\,(S/m)$	ε_r	$\sigma\,(S/m)$
Simulation milieu "vivant" sans bactérie	–	–	–	–	80	$3,5 \times 10^{-4}$
Simulation milieu "traité" sans bactérie	–	–	–	–	80	$4,2 \times 10^{-4}$
Simulation bactéries vivantes	40	0,22	13,6	$3,7 \times 10^{-5}$	80	$3,5 \times 10^{-4}$
Simulation bactéries traitées	80	$4,2 \times 10^{-4}$	13,6	$3,7 \times 10^{-5}$	80	$4,2 \times 10^{-4}$

TABLEAU 3.5 – *Représentation des constantes diélectriques (ε_r) et conductivités (σ) choisies pour les différentes simulations*

Les valeurs utilisées pour décrire les parois cellulaires et le cytoplasme sont connues de la littérature [227] [246]. En accord avec l'hypothèse énoncée en début de section, nous avons homogénéisé la conductivité du milieu avec celle du cytoplasme pour le cas des bactéries traitées par chaleur. C'est ainsi que pour le milieu aqueux de simulation nous avons une permittivité de 80 et une conductivité de $4,2\,\mu\mathrm{S/cm}$.

3.4.2 Homogénéisation des mesures

Dans notre étude, nous avons d'abord simulé un volume élémentaire cubique de dimensions $10\,\mu m \times 10\,\mu m \times 10\,\mu m$ qui comporte une bactérie immergée dans l'eau. En conditions expérimentales, le système réel se compose d'un volume d'eau de dimensions $25\,mm \times 25\,mm \times 800\,\mu m$ (environ $500\,\mu\mathrm{L}$), contenant plusieurs millions de bactéries ($5 \times 10^8\,\mathrm{CFU}$ pour une concentration initiale de $1 \times 10^9\,\mathrm{CFU/mL}$ et par extension le même nombre de blocs élémentaires de simulation si l'on considère une équirépartition des bactéries dans le volume (ce point est cependant sujet à caution et sera débattu plus loin dans cette section).

Ainsi, la taille du bloc unitaire de simulation définit la concentration de bactéries entre les électrodes. Le tableau 3.6 regroupe les relations d'échelle entre le bloc unitaire de simulation et la concentration bactérienne équivalente.

Longueur x (μm)	$k = \frac{800}{x}$	**Volume simulation** (μm^3)	**Nb structure sur** $500\,mm^3$	**CFU/mL**
10	80	$1,00 \times 10^3$	1×10^8	2×10^8
8	100	$5,12 \times 10^2$	$9,77 \times 10^8$	$1,95 \times 10^9$
4,6	173,91	$9,73 \times 10^1$	$5,1 \times 10^9$	$1,02 \times 10^{10}$
4	200	$6,40 \times 10^1$	$7,81 \times 10^9$	$1,56 \times 10^{10}$

TABLEAU 3.6 – *Variation du nombre d'éléments unitaires selon la taille x, pour un volume total de* $25 \times 25 \times 0,8\,mm^3$

Les concentrations naturelles de bactéries dans un milieu de croissance, présenté lors du chapitre 2 sur la figure 2.12 atteignent une limite d'environ $5 \times 10^9\,\mathrm{CFU/mL}$. Cette limite confond les bactéries vivantes et les bactéries mortes en raison de la phase stationnaire de croissance.

Pour comparer les résultats de simulation à ceux de l'expérience, nous procédons en deux étapes. Premièrement, nous sommons l'impédance de 80 cubes (pour l'exemple à $10\,\mu m$ de côté) le long de la dimension z, afin d'avoir une impédance continue le long d'une pile de ces cubes. La somme des impédances unitaires en série donne ainsi l'impédance d'une colonne de hauteur $800\,\mu m$. Deuxièmement, sur le plan expérimental ($25 \times 25\,mm$) contient $(25\,mm/10\,\mu m)^2$ colonnes identiques en parallèle. En divisant l'impédance de la colonne unique par ce nombre de branches, on obtient l'impédance équivalente du volume total. L'utilisation de cette méthode sera détaillée dans le chapitre 4. Cependant, la validité de l'approche repose sur un milieu homogène car le modèle prend comme hypothèse une répartition uniforme et isolée des bactéries en solution. Compte tenu de la concentration et du cycle de scissiparité, cette hypothèse reste rudimentaire. En effet, les bactéries n'auront pas toutes les mêmes formes et peuvent s'agglomérer en amas. Entre chaque jeu de mesures, on aura donc possiblement une variation de l'état de la population de bactéries qui induira une possible variation de conductivité.

3.4.3 Analyse des résultats de simulation

Afin d'étudier les potentielles spécificités apportées par la bactérie sur la réponse en fréquence, nous avons analysé les simulations correspondant à une bactérie selon la taille du cube de simulation. A titre de comparaison nous avons étudié le même cube sans la présence de la bactérie, soit un milieu uniforme. Le module et la phase de ce cas d'étude sont présentés sur la figure 3.12 et correspondent aux trois graphiques du dessus. Afin d'illustrer notre propos, la taille du cube de simulation a été réduite pour atteindre $4\,\mu m$ de côté (soit une concentration bactérienne équivalente de $1,56 \times 10^{10}\,\mathrm{CFU/mL}$).

Premièrement, nous pouvons remarquer qu'il n'y a pas de différence caractéristique entre le module de l'impédance des simulations comportant une bactérie (traits tirets) et celle correspondant au milieu aqueux (traits pleins). Le plateau de l'impédance est une image directe de la conductivité. Il n'y a donc pas de différence majeure en termes de conductivité. Cela est dû au fait que les charges proches de la bactérie sont déjà prises en compte par la conductivité du milieu et que la bactérie est considérée comme étanche dans le modèle de simulation.
Deuxièmement, on observe des valeurs de seuil différentes pour chaque simulation en fonction de la taille du cube de simulation. Ceci est dû au fait que les simulations présentées sur les figures a), b), c) correspondent à l'impédance non homogénéisée sur un cas pratique. En effet, lors d'une mise à l'échelle vers la géométrie réelle du capteur, ces différences s'accentuent car la réponse globale devient le cumul d'une multitude de ces volumes élémentaires répartis sur toute la surface des électrodes.

Finalement, on remarque la présence d'un épaulement sur la courbe de phase entre 1 MHz et 10 MHz, et ceci uniquement pour les simulations contenant une bactérie et pour un volume

inférieur à $10\,\mu m^3$. La polarisation des parois bactérienne induit en effet un changement de signe sur la dérivée de la phase.

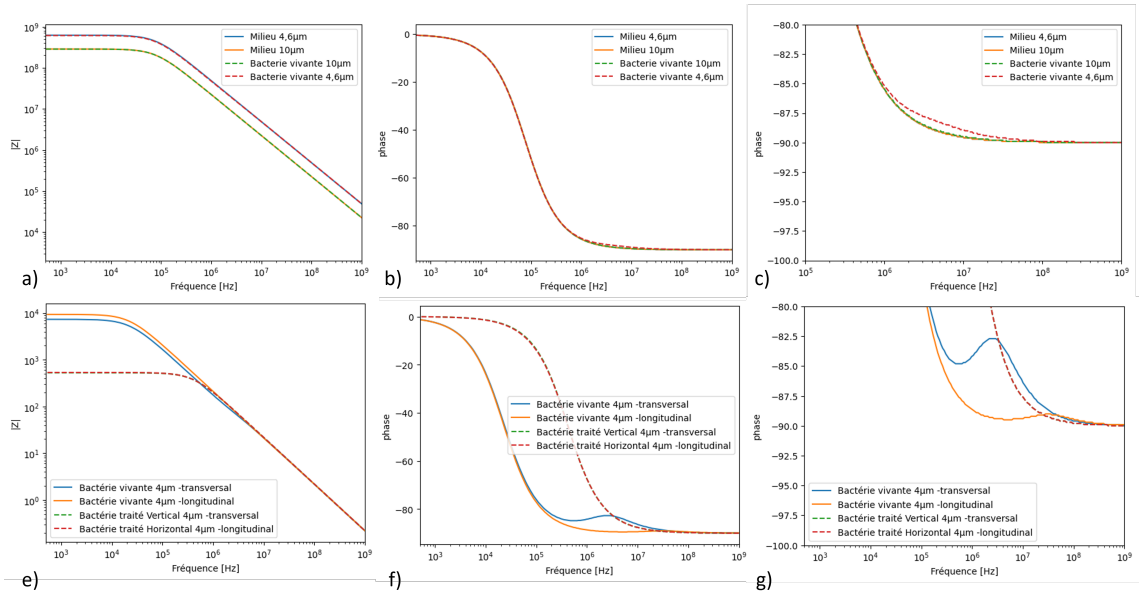


FIGURE 3.12 – *Spectroscopie d'impédance obtenue par simulation COMSOL.* ***(a–b–c)*** *Comparaison entre une bactérie isolée dans un milieu aqueux et un milieu aqueux homogène, pour deux tailles de domaine de simulation :* $4,6\,\mu m$ *et* $10\,\mu m$. ***(e–f–g)*** *Simulation d'une bactérie seule pour deux états (vivante et traitée) dans un volume de* $4\,\mu m$*, selon deux configurations spatiales (transversale et longitudinale).* ***(a)*** *et* ***(e)*** *module de l'impédance en fonction de la fréquence ;* ***(b)*** *et* ***(f)*** *phase de l'impédance ;* ***(c)*** *et* ***(g)*** *zoom sur la phase dans la plage* 10^5–$10^8\,Hz$.

Afin d'étudier l'effet de l'orientation des bactéries entre les électrodes planes, nous avons choisi d'effectuer des simulations suivant deux cas extrêmes. Premièrement, une tension alternative d'un volt est appliquée transversalement, sur les faces les plus proches de chaque demi-sphère. Dans un second temps, nous avons imposé une tension appliquée longitudinalement.

Tout d'abord, on remarque que l'orientation de la bactérie n'a pas d'impact sur la valeur de plateau du module de l'impédance dans le cas des bactéries traitées.

Ensuite, on remarque une variation de plus d'un facteur dix entre les simulations avec une bactérie vivante ou traitée. La variation du plateau entre les deux cas d'étude permet d'anticiper que notre dispositif sera efficace pour différencier les états bactériens. Les simulations contenant des bactéries traitées, et donc un milieu homogène électriquement, ne présentent pas de variation de la phase comme nous avons pu l'observer sur la figure c). En effet, la paroi bactérienne est devenue totalement transparente comparée au cas précédent car il n'y pas de changement de permittivité et de conductivité entre les deux milieux (cytoplasme et milieu).
Finalement, on remarque que cette réponse de la bactérie sur la phase peut varier en amplitude (plusieurs degrés) et en fréquence (entre 2MHz et 20MHz) selon la polarisation de la bactérie.

Pour conclure, ces simulations nous ont permis de comprendre plusieurs phénomènes. La réponse impédancemétrique semble être un moyen efficace de différenciation dans l'hypothèse d'une conductivité homogénéisée lors du traitement des bactéries. Étudier le plateau du module de l'impédance permet d'analyser la viabilité cellulaire. Deuxièmement, une réponse singulière et propre à la bactérie a été observée sur le signal de la phase de l'impédance. Cette réponse varie selon la polarisation de la bactérie. La faible variation du module d'impédance, liée à la polarisation de la bactérie, ne sera pas un problème lors de futures expérimentations. En effet, dans cette

simulation nous partons du postulat que toutes les bactéries ont la même orientation, sont isolées et sont réparties de façon homogène. Nous savons que ces trois postulats sont erronés, mais ils permettent une première approche des spécificités de mesure liée à la détection bactérienne. En effet, ces configurations fournissent une première estimation des amplitudes attendues. Dans une suspension réelle où l'orientation des bactéries est mélangée, la réponse expérimentale devrait se situer entre ces extrêmes (plateau du module et signature en phase).

3.5 Analyse des données de mesure

Cette section a pour objectif de présenter les différents moyens pour analyser nos données d'impédance et les éléments à étudier pour des populations bactériennes. Il existe de nombreuses études qui utilisent la variation d'impédance comme outil d'analyse des biocapteurs [128], [132], [125]. Dans le chapitre 4 nous utiliserons la variation d'impédance pour discriminer les mesures. Pour relier les informations obtenues aux propriétés diélectriques de la bactérie, nous allons associer nos mesures à un circuit électrique équivalent. La représentation du module de l'impédance ou de la phase impose un traitement avec uniquement deux dimensions soit fréquence et module ou fréquence et phase. Ces représentations des données ne permettent donc qu'un traitement partiel des informations d'impédance. Pour éviter cela, de nombreuses études utilisent la représentation de Nyquist [247]. Cette représentation a l'avantage de relier le module et la phase tout en gommant l'information sur la fréquence (qui se retrouve incluse dans chaque point de ce diagramme). Sur un diagramme de Nyquist, on voit généralement un demi-cercle pour un ou deux circuit RC ayant des valeurs similaires en résistance et en fréquence. Ces diagrammes sont pertinents bien qu'ils ne permettent pas de distinguer l'influence des comportements résistifs et capacitifs de même amplitude.

Dans les parties suivantes nous commencerons par modéliser le comportement diélectrique du système par une approche de type Maxwell-Wagner puis nous aborderons les différentes méthodes pour traiter les données d'impédance : la régression linéaire puis la distribution des temps de relaxation.

3.5.1 Le modèle Maxwell-Wagner

Les sections précédentes ont établi le lien entre les géométries des électrodes et les grandeurs électriques mesurées. Nous allons maintenant chercher à relier ces mesures aux mécanismes diélectriques du milieu sondé, de façon à interpréter les variations spectrales en termes d'état cellulaire et de conditions externes.

Dans cette perspective, on introduit à présent une description homogénéisée de type Maxwell–Wagner, visant premièrement à modéliser une bactérie comme particule à simple coque (cytoplasme entouré d'une membrane) et deuxièmement à décrire la permittivité complexe effective d'une suspension (milieu et une bactérie) en fonction de la fréquence, de la permittivité et de la conductivité du milieu. Ce cadre permet de prévoir les variations fréquentiel de $\varepsilon'(\omega)$ et $\varepsilon''(\omega)$ (plateaux, dispersion β, rôle de σ_{ext}) et de mettre en correspondance les signatures théoriques sur les spectres d'impédance avec des paramètres physico-biologiques. Nous considérons une bactérie modélisée par une sphère avec une simple couche (noyau interne cytoplasmique entouré d'une membrane). La permittivité complexe de tout matériau est définie par : $\varepsilon^* = \varepsilon^{'} - j\varepsilon^{''}$
Avec ε' la partie réelle (permittivité de stockage) et ε'' la partie imaginaire (pertes diélectriques). Dans un modèle à simple couche (single shell en anglais), la permittivité équivalente de la cellule (c'est-à-dire la permittivité complexe d'une sphère homogène équivalente) dépend des propriétés

de la membrane. Si ε^*_{ri} est la permittivité complexe de l'intérieur (cytoplasme) et ε^*_{rm} celle de la membrane, on obtient pour la sphère bicouche d'un rayon externe r_{ext} et d'un rayon interne r_{int} :

$$\varepsilon^*_{rp} = \varepsilon^*_{rm} \frac{\varepsilon^*_{ri} + 2\varepsilon^*_{rm} + 2\nu(\varepsilon^*_{rm} - \varepsilon^*_{ri})}{\varepsilon^*_{ri} + 2\varepsilon^*_{rm} - \nu(\varepsilon^*_{rm} - \varepsilon^*_{ri})} \tag{3.22}$$

où $\nu = (r_{int}/r_{ext})^3$ est la fraction volumique du noyau (rayons interne r_{int} et externe r_{ext}). Cette formule de Maxwell-Wagner pour une sphère montre comment la permittivité membranaire intervient sur le comportement homogénéisé. La membrane se comporte comme un condensateur, ce qui induit une forte polarisation interfaciale à basse fréquence (dispersion β). À haute fréquence, la membrane ne peut plus se charger et ε'_{rp} retombe vers une valeur gouvernée par le cytoplasme et le milieu. Quand ε_{rm} augmente (membrane intacte, plus polarisable ou plus épaisse, donc C_m plus grande), la polarisation interfaciale se renforce : le plateau basse fréquence de ε'_{rp} s'élève, le pic de pertes dans la bande β de ε''_{rp} gagne en amplitude et la relaxation se décale vers des fréquences plus basses (processus plus lent). À l'inverse, si ε_{rm} diminue ou si la membrane se perméabilise (conductivité membranaire effective en hausse), la barrière capacitive s'affaiblit : ε'_{rp} au plateau basse fréquence décroît, le pic β de ε''_{rp} s'aplatit et tend à se déplacer vers des fréquences plus hautes, tandis que le fond ohmique à très basse fréquence augmente. Nous utiliserons les valeurs utilisées dans l'étude de Xavier [245], résumées dans le tableau 3.7. Il s'agit d'une homogénéisation des différents paramètres diélectriques de la paroi cellulaire pour obtenir un couple de propriétés diélectriques équivalent à l'ensemble de la paroi cellulaire.

	Outer membrane	Periplasm	Inner membrane	Equiv. cell wall (ε^*_{rm})	Cytoplasm (ε^*_{ri})
Thickness (nm)	7	10	7	24	r_{int}
Rel. permittivity (ε')	5,5	60	12,1	13,6	~ 80
Conductivity σ (S/m)	10^{-7}	3,2	$< 10^{-4}$	$3{,}7 \times 10^{-5}$	0,5

TABLEAU 3.7 – *Équivalence diélectrique des trois couches de la membrane cellulaire. D'après [245].*

La courbe 3.13 illustre la relation de Maxwell–Wagner précédemment définie dans l'équation (3.22) : une cellule modélisée comme une sphère bicouche se ramène à une permittivité complexe homogénéisée $\varepsilon^\star_{rp}$. Pour ces calculs, les propriétés diélectriques du milieu interne sont fixées aux valeurs de la littérature, soit une permittivité relative $\varepsilon'_{ri} = 80$ et une conductivité $\sigma_{ri} = 0{,}5\,\mathrm{S/m}$, conformément aux travaux de Kell et Harris [188]. Quand la permittivité de la paroi ε'_{rm} passe de 3,6 à 23,6, la composante réelle ε'_{rp} croît presque linéairement, tandis que la composante imaginaire ε''_{rp} suit une loi plus convexe car le terme ohmique $\sigma_{rm}/(\omega\varepsilon_0)$ reste constant. La dispersion β (polarisation interfaciale) est d'autant plus marquée que le contraste $\varepsilon'_{rm} - \varepsilon'_{ri}$ est grand : à 100 kHz la capacité de stockage de la membrane domine le comportement et fait grimper ε'_{rp} au-delà de 10^3. Inversement, pour une paroi quasi isolante ($\varepsilon'_{rm} \simeq 4$), le champ traverse essentiellement le cytoplasme et la cellule se comporte comme un dipôle de permittivité modérée. Ce balayage met donc en évidence que la signature diélectrique d'une bactérie est extraordinairement sensible aux altérations physiques ou chimiques de la membrane plasmique.

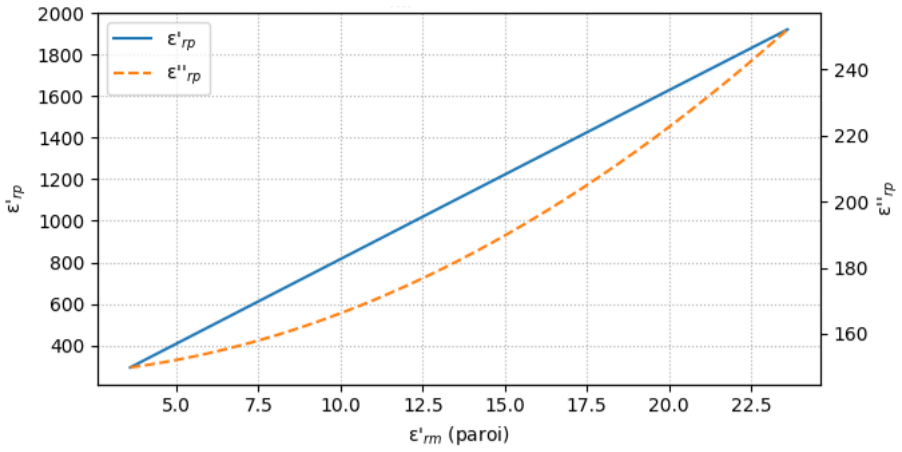


FIGURE 3.13 – *Variation de permittivité sur le modèle homogénéisé d'une bactérie à 100KHz*

La conductivité de la solution externe joue un rôle primordial dans la composante ε'' (pertes) et dans le comportement en fréquence. Dans la permittivité complexe, la partie imaginaire provient en partie de la conduction électrique : pour un matériau ayant une conductivité σ, on retrouve la relation $\varepsilon''(\omega) = \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega}$, qui découle de $\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j\frac{\sigma}{\varepsilon_0 \omega}$. Ainsi, un milieu très conducteur (grande conductivité σ_{ext}) présente une permittivité imaginaire élevée à basse fréquence, car ε'' évolue comme $1/\omega$ et diverge quand ω tend vers zéro. Concrètement, une augmentation de la concentration en ions du milieu (donc σ_{ext}) entraîne une augmentation de ε''. Cette augmentation de la conduction tend aussi à masquer la polarisation interfaciale : les charges libres du milieu compensent partiellement les charges liées s'accumulant aux membranes. Il en résulte généralement une diminution de l'amplitude de la dispersion β observée (la différence $\Delta\varepsilon'$ entre basse et haute fréquence se réduit) lorsque σ_{ext} augmente, car une partie de la capacité membranaire est court-circuitée par le courant ionique. À l'opposé, dans un milieu peu conducteur, la relaxation est décalée vers des fréquences plus hautes (la membrane doit attendre plus longtemps le passage de charges du fait du milieu isolant). Il convient de noter que $\varepsilon''(\omega)$ inclut à la fois les pertes par conduction pure (proportionnelles à σ) et les pertes diélectriques liées aux relaxations. Les deux contributions s'additionnent. Par exemple, autour de la fréquence de dispersion β, $\varepsilon''(\omega)$ exhibe un pic associé à l'absorption maximale d'énergie par la polarisation interfaciale (pertes de relaxation de Debye), s'ajoutant à un fond continu $\sigma/(\varepsilon_0\omega)$. À très basse fréquence, ce terme continu domine et ε'' diverge, tandis qu'à très haute fréquence, ε'' tend vers zéro (les charges ne pouvant suivre le champ, il n'y a ni conduction ni pertes par hystérésis dipolaire). Finalement, une plus grande conductivité du milieu accroît ε'' (à cause du terme direct σ/ω) et modifie la fréquence de relaxation interfaciale.

Nous allons maintenant nous intéresser aux propriétés diélectriques d'un milieu contenant une sphère. En réutilisant les équations de Maxwell-Wagner on obtient une permittivité équivalente de la solution :

$$\varepsilon_r^* = \varepsilon_{ra}^* \frac{\varepsilon_{rp}^* + 2\varepsilon_{ra}^* + 2\theta(\varepsilon_{ra}^* - \varepsilon_{rp}^*)}{\varepsilon_{rp}^* + 2\varepsilon_{ra}^* - \theta(\varepsilon_{ra}^* - \varepsilon_{rp}^*)} \tag{3.23}$$

Avec ε_{rp}^* la permittivité complexe du modèle de la bactérie définie grâce à l'équation (3.22), ε_{ra}^* la permittivité complexe du milieu externe et enfin ε_r^*, celle du milieu équivalent.

Pour calculer θ, on convertit la concentration bactérienne C (en CFU/mL) en densité numérique n (en m^{-3}) par $n = C \times 10^6$, puis on estime le volume cellulaire V_{cell} (par exemple, pour une sphère de rayon r : $V_{cell} = \frac{4}{3}\pi r^3$).

La fraction volumique est alors définie par $\theta = nV_{cell}$.

Concentration (CFU/mL)	$\boldsymbol{\theta}$ (fraction)	$\boldsymbol{\theta}$ (%)
1×10^7	$4,19 \times 10^{-5}$	0,0042
1×10^8	$4,19 \times 10^{-4}$	0,0419
1×10^9	$4,19 \times 10^{-3}$	0,419

TABLEAU 3.8 – *Conversion du nombre de bactérie à la fraction volumique θ pour un rayon cellulaire de $1\,\mu m$.*

La figure 3.14 compare la permittivité effective de la suspension homogénéisée pour 10^7, 10^8, $10^9\,\mathrm{CFU/mL}$ (soit $\theta \approx 4 \times 10^{-5}$ à 4×10^{-3}) comme résumé sur le tableau 3.8. Les zones coloriées correspondent à la variation de permittivité de la paroi cellulaire. La conductivité est fixée à $10^{-4}\,\mathrm{S/m}$ comme pour l'eau désionisée. Nous avons choisi d'illustrer la détérioration de la paroi cellulaire par une augmentation de la permittivité ε'_{rm} de 3,6 à 23,6.

La plateau observable en basse fréquence (inférieur à $10^4\,\mathrm{Hz}$) sur ε' reste voisin de $\varepsilon'_{ra} \simeq 78$, car le champ électrique est essentiellement établi dans le milieu aqueux et la double couche n'est pas encore sollicitée. Puis, on remarque la zone de dispersion β (10 kHz – 1 MHz). À hautes fréquences (au-delà de plusieurs MHz), plus la concentration est élevée, plus la chute de ε' est importante ; cela reflète le nombre accru d'interfaces cellule/milieu à forte concentration. Pour des θ correspondant à des concentrations cellulaires inférieures à $10^9\,\mathrm{CFU/mL}$, l'amplitude de la chute ($\Delta\varepsilon$) à haute fréquence decroît quasi linéairement avec θ. Finalement, cette chute est cohérente avec la dépolarisation complète des membranes et la prédominance des effets capacitifs. On remarque deux points. Premièrement, la valeur moyenne de ε' est plus forte si les propriétés diélectriques de la paroi le sont (augmentation de ε'_{rm}) . En effet, une paroi endommagée implique une augmentation de la permittivité réelle. Deuxièmement la fréquence centrale de la dispersion β varie en fonction de l'état de la cellule. Elle se décale vers les hautes fréquences quand la permittivité réelle de la paroi augmente.

Cependant, ces variations de permittivité réelle sont au maximum de 0,5 sur la plage de fréquences considérée, rendant ce paramètre très sensible aux incertitudes de mesure dans un cas pratique. Cette étude montre à quel point les variations de permittivité réelle en fonction de la concentration bactérienne sont faibles. Il est également à noter que les variations de la permittivité imaginaire ε'' n'ont pas été tracées sur ce graphe. Elles sont directement proportionnelles à σ/f et il n'y a donc pas d'intérêt à exploiter cette courbe pour remonter aux propriétés diélectriques du milieu puisque dans une solution donnée, la conductivité ne varie pas.

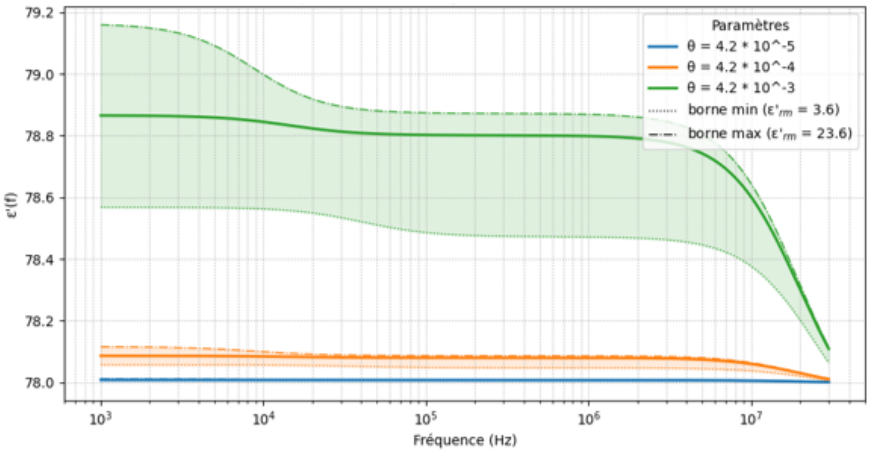


FIGURE 3.14 – *Variation de permittivité de la solution en fonction de la fréquence et des propriété des parois cellulaires pour plusieurs concentrations bactériennes*

Étant donné notre cadre d'expérimentation, une augmentation de la conductivité du milieu est à prévoir lors du traitement des bactéries. La figure 3.15 présente les résultats d'une troisième simulation où la concentration en bactéries (et donc θ) est maintenue constante à $10^8\,\mathrm{CFU/mL}$ mais où l'on fait varier la conductivité du milieu de 10^{-4}, 10^{-3} et $10^{-2}\,\mathrm{S/m}$ pour simuler la présence de bactéries vivantes, dégradées ou traitées. La partie imaginaire ε'' étant principalement liée à la conductivité, les courbes qui suivent une loi en $1/f$ se distinguent particulièrement à basse fréquence, l'écart atteignant deux ordres de grandeur à 1 kHz. En résumé, augmenter la conductivité de la solution σ_{ra} élargit la plage de pertes ohmiques et déplace légèrement la dispersion sans affecter le plateau statique, un point crucial pour l'étalonnage in-situ d'un capteur lorsque l'on change d'électrolyte.

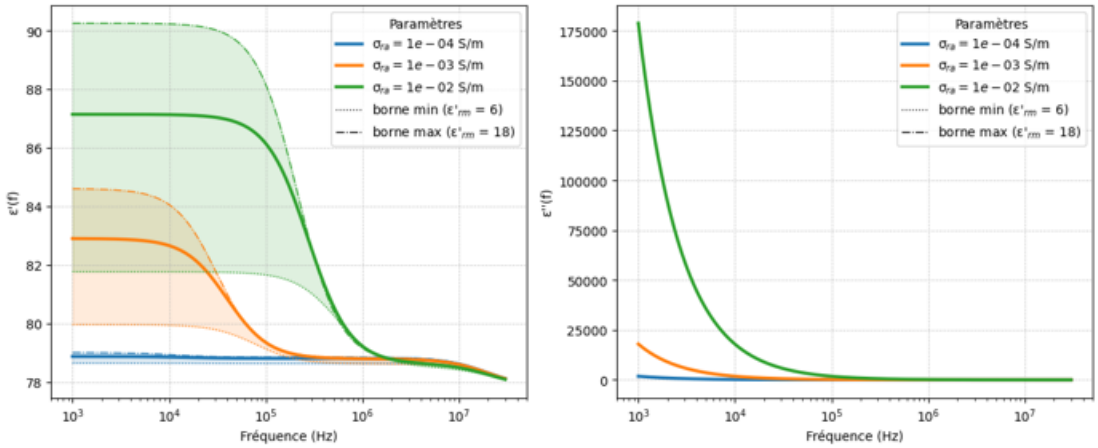


FIGURE 3.15 – *Variation de permittivité en fonction de la fréquence et des propriétés des parois cellulaires pour* 10^{-4}, 10^{-3} *et* $10^{-2} S/m$ *de conductivité du milieu environnant*

3.5.2 Traitement des données par régression linéaire et non linéaire

La méthode classique pour traiter les données d'impédance est la régression linéaire par la méthode des moindres carrés, car la relation entre les éléments du circuit et l'impédance complexe est en général limitée à un faible nombre d'éléments. Les logiciels commerciaux d'EIS (tels que NOVA, ZView, Gamry Echem Analyst...) procèdent ainsi à une régression itérative. En effet, les paramètres du circuit sont ajustés jusqu'à minimiser l'erreur quadratique entre le modèle et les mesures expérimentales. Par une approche analytique simplifiée, on peut néanmoins recourir à des méthodes de régression linéaire simplifiées sur des portions de courbe pour estimer séparément les valeurs de départ de certains paramètres. Nous avons déjà cité l'extrapolation linéaire des plateaux de Bode pour obtenir R_{sol} et C_{sol}.

L'utilisation de la régression non-linéaire des moindres carrés (CNLS en anglais) permet d'ajuster simultanément les parties réelle et imaginaire de l'impédance, évitant ainsi les biais d'estimation propres aux régressions linéaires qui traitent ces composantes de manière indépendante. L'utilisation des régressions est cependant critiquable [248]. En effet, en pratique, on impose un circuit équivalent pré-défini pour représenter des processus électrochimiques. Cependant, d'autres circuits électriques peuvent permettre de modéliser les données d'impédance. Nous avons d'une part une obligation d'imposer un circuit électrique équivalent décrivant un certain nombre de processus et d'autre part tester une multitude de circuits électriques équivalents permettant d'analyser les résultats. Cette dualité ne garantit pas la solidité des analyses. Certains processus physico-chimiques influençant l'impédance peuvent être négligés dans la modélisation du circuit, faussant l'estimation des éléments électriques et de la transduction. De plus, certaines contributions électrochimiques peuvent être minimes et sur une faible plage de fréquence et peuvent donc se retrouver

négligées dans le modèle. De ce fait, il peut être intéressant d'analyser les données d'une autre façon en se concentrant sur une approche temporelle plutôt que fréquentielle.

3.5.3 Distribution des temps de relaxation

Cette section est dédiée au principe théorique de la distribution des temps de relaxation associés aux données d'impédance.

L'analyse temporelle de l'impédance de milieux liquides est connue depuis les années 80 [249]. Dans ces systèmes, plusieurs éléments viennent contribuer à la réponse fréquentielle, que ce soit les ions du milieu, les interactions aux électrodes ou encore les éléments biologiques en suspension. Tous ces éléments peuvent être associés à une relaxation propre. De nos jours, on remarque un regain d'intérêt pour l'analyse par la distribution des temps de relaxation. La figure 3.16 trace l'évolution annuelle entre 1970 et 2015 du nombre de publications traitant de la spectroscopie d'impédance et ceux traitant également de la distribution des temps de relaxation.

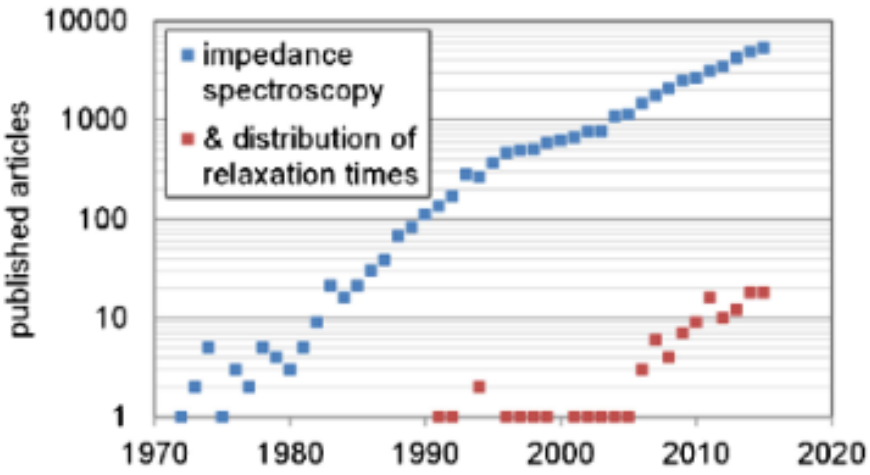


FIGURE 3.16 – *Évolution du nombre d'articles sur la distribution des temps de relaxation dans le cadre de la spectroscopie d'impédance de 1990 à 2015. Tiré de [250].*

L'utilisation d'algorithmes permettant de relier des données d'impédance fréquentielle à une distribution temporelle est donc d'actualité [251] [248]. On note diverses applications où les groupes de recherche centrés sur le domaine des batteries sont les principaux investigateurs [252] [253]. Ils étudient des propriétés liées à des matériaux, des comportements diffusifs ou encore des études de charge.

La DRT s'impose alors comme une alternative aux analyses non-linéaires classiques par ajustement d'une combinaison de temps de relaxation (méthode CNLS), notamment lorsque le spectre est trop complexe pour être décrit par un circuit équivalent simple. En effet, les fréquences d'étude du domaine des batteries sont s'étendent du mHz au MHz et plusieurs phénomènes physiques participent en même temps à l'impédance totale.
En principe la DRT relie des données d'impédance à un circuit appelé Voigt tel que représenté sur le schéma 3.17. Il s'agit d'une résistance R_S en série avec un réseau de n circuits RC. Cette représentation est la plus classique. Il convient également de voir cette chaîne comme n fonctions de transferts enchaînées, chaque bloc représentant une relaxation.

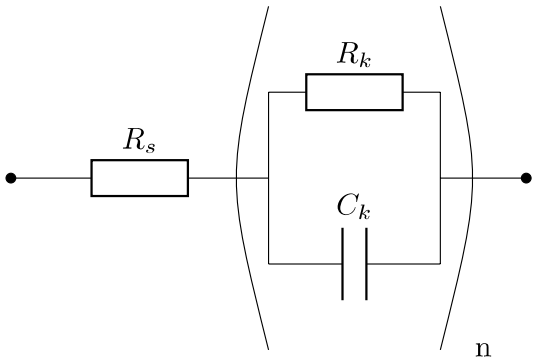


FIGURE 3.17 – *Circuit Voigt équivalent*

L'impédance de ce circuit de Voigt 3.17 se formalise ainsi :

$$Z(\omega) = R_s + \int_0^{\infty} \frac{R}{1+\tau w j} \tag{3.24}$$

L'algorithme de Distribution des Temps de Relaxation (DRT) fournit directement le spectre des constantes de temps τ_k, révélant la dynamique électrochimique du système plutôt qu'un empilement de composantes électroniques. Interpréter ces résultats comme une suite infinie de circuits RC occulte la signification physique des processus de relaxation. Il est donc essentiel de centrer l'analyse sur les temps de relaxation eux-mêmes, qui portent les informations électrochimiques.

$$Z(\omega) = Z_\infty + (Z_0 - Z_\infty) \int_0^{\infty} \frac{g(\tau)\Delta\tau}{1+\tau w j} \tag{3.25}$$

Nous pouvons passer de l'équation (3.24) à l'équation (3.25) car nous pouvons approximer R_s par Z_∞. Cette transformation implique que chaque résistance de l'équation (3.24) est représentée au sein de la distribution continue de l'équation (3.25).

À partir de l'équation continue de la DRT on établit l'équation (3.26) :

$$Z(\omega) = Z_\infty + (Z_0 - Z_\infty) \sum_{k=1}^{N} \frac{g(\tau_k)\Delta\tau}{1+j\omega\tau_k} \tag{3.26}$$

L'inversion de l'équation (3.26) pour extraire la distribution $g(\tau)$ constitue un problème inverse de Fredholm du premier type, intrinsèquement mal posé : de faibles bruits expérimentaux ou des lacunes dans la couverture fréquentielle peuvent engendrer une infinité de distributions compatibles avec une même mesure d'impédance [251]. Cette non-unicité de la solution se traduit par une sensibilité excessive au bruit, produisant des solutions instables et dépourvues de signification physique. Pour pallier ce caractère mal posé, il faut contraindre l'espace des solutions à des distributions lisses et stables. Pour cela, on discrétise l'axe des constantes de temps $\{\tau_k\}_{k=1}^{N}$, en notant $y_j = (Z(\omega_j) - Z_\infty)/(Z_0 - Z_\infty)$ et $X_{j,k} = \Delta\tau/(1+j\omega_j\tau_k)$ afin d'obtenir :

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\gamma} + \boldsymbol{\varepsilon} \tag{3.27}$$

avec $\boldsymbol{\gamma} = [g(\tau_1), \ldots, g(\tau_N)]^T$. Ainsi le problème sous la forme (3.27) où ε représente le bruit de mesure. La régularisation de Tikhonov consiste alors à résoudre :

$$\min_{\boldsymbol{\gamma}} \left\{ \|\mathbf{X}\boldsymbol{\gamma} - \mathbf{y}\|_2^2 + \lambda \|\boldsymbol{\gamma}\|_2^2 \right\} \tag{3.28}$$

où $\lambda > 0$ est le paramètre de régularisation assurant lissage et stabilité de la solution. Le choix de λ se fait fréquemment via la méthode de la courbe-L, qui permet de repérer le coude optimal dans le diagramme log-log de la norme du résidu versus la norme de la solution, assurant ainsi un compromis équilibré entre fidélité aux données et régularité de la DRT [251]. Il est également possible d'estimer λ par une recherche expérimentale. On impose une valeur de λ ou une plage de valeurs permettant de détecter des processus électrochimiques sur des données simulées et qui sont par la suite appliqués à des mesures expérimentales. Nous utiliserons cette dernière démarche dans nos analyses. La section suivante est dédié à deux méthodes utilisées pour calculer la DRT.

3.5.4 Les méthodes de résolution de la DRT

La première méthode que nous présentons est la méthode RBF, pour Radial Basis Functions en anglais. Elle repose sur la représentation de la DRT comme une combinaison linéaire d'une base continue de fonctions gaussiennes définies sur l'axe logarithmique des constantes de temps $\ln \tau$. On approxime :

$$g(\tau) \approx \sum_{k=1}^{M} c_k \, \phi_k(\tau) \tag{3.29}$$

où chaque fonction de base s'écrit :

$$\phi_k(\tau) = \exp\left(-\frac{(\ln \tau - \mu_k)^2}{2\sigma^2}\right) \tag{3.30}$$

où μ_k sont des centres uniformément répartis et σ la largeur de chaque gaussienne. La base gaussienne intervient dès la représentation de $g(\tau)$ et assure une interpolation lisse.

En projetant cette approximation dans l'équation continue de la DRT, on définit la matrice :

$$X'_{j,k} = \int_0^\infty \frac{\phi_k(\tau)}{1 + j\omega_j \tau} d\tau \quad \mathbf{c} = [c_1, \ldots, c_M]^T \tag{3.31}$$

La résolution se ramène alors à un problème de moindres carrés régularisé sous la contrainte de non-négativité des coefficients :

$$\min_{\mathbf{c} \geq \mathbf{0}} \left\{ \|\mathbf{X}'\mathbf{c} - \mathbf{y}\|_2^2 + \lambda \, \|\mathbf{c}\|_2^2 \right\} \tag{3.32}$$

dont l'équation normale s'écrit :

$$(\mathbf{X}'^T\mathbf{X}' + \lambda I)\,\mathbf{c} = \mathbf{X}'^T\mathbf{y}, \quad c_k \geq 0 \tag{3.33}$$

Le paramètre σ joue un rôle crucial. En effet, une faible valeur de. σ accroît la capacité à distinguer des processus de relaxation proches en τ, mais rend la matrice $\mathbf{X}'$ mal conditionnée ; un paramètre σ trop grand lisse excessivement la distribution et peut masquer des contributions fines. De même, le choix de λ ajuste le compromis entre fidélité au signal et stabilité du calcul. L'introduction de la contrainte $c_k \geq 0$ assure en outre le caractère physique de la DRT reconstruite, évitant les artefacts de signes indésirables. Ensemble, ces réglages permettent de maîtriser la stabilité et la résolution de l'inversion tout en tirant parti de la souplesse offerte par la base gaussienne. Les spécificités de la mise en place de ces algorithmes ne seront pas présentées ici, mais on pourra se reporter à d'autres travaux [254].

Il existe plusieurs autres méthodes pour effectuer la résolution de la DRT, comme l'utilisation des transformés de Hilbert [255] ou de la correspondance par circuit m(RQ) [256] [257]. Une méthode extrêmement rapide est la méthode TR-NNLS (Tikhonov Regularization with Non-Negative Least Squares). Elle combine la régularisation de Tikhonov et la contrainte de positivité sur la DRT. Cette méthode est détaillée dans l'article de Andrei Kulikovsky paru en 2020 [258].

La méthode RBF part d'une représentation fonctionnelle continue de la DRT via des gaussiennes paramétrées (shape parameter) avant de la projeter sur l'impédance. La méthode TR-NNLS adopte quant à elle un point de vue purement discrétisé : on considère directement la distribution inconnue $\boldsymbol{g} = [g_1, \ldots, g_N]^T$ aux N constantes de temps, sans présupposer de la forme de chaque mode. Cette approche naît de l'inversion linéaire de la seule partie réelle ou imaginaire de l'impédance mesurée, puis de l'application conjointe d'une régularisation de Tikhonov et d'une contrainte de non-négativité sur les coefficients g_n. Le rôle de λ dans la méthode TR-NNLS est double. Il stabilise l'ensemble des g_n face au bruit et garantit une distribution lissée. Cependant il agit de manière uniforme sur toutes les constantes de temps, là où le paramètre de largeur σ (ou μ) dans la méthode RBF module localement la finesse de résolution des pics de relaxation. Cette différence conditionne la flexibilité de la RBF et la robustesse opérationnelle de la TR-NNLS.

La méthode RBF offre une interpolation lisse grâce à la base gaussienne et notamment en contrôlant la résolution locale via σ, mais requiert le choix d'un maillage de centres de la gaussienne et peut souffrir de l'apparition d'artefacts si les gaussiennes sont trop étroites. En pratique, c'est le paramètre λ qui est utilisé pour conditionner le système. En revanche, la méthode TR-NNLS impose directement la positivité de $g(\tau)$ et utilise un seul paramètre λ pour assurer la stabilité globale de l'inversion et réduire les artefacts négatifs. Toutefois, limiter l'analyse à la seule partie réelle ou imaginaire de l'impédance introduit des biais. En effet, certaines caractéristiques de la DRT (pics asymétriques ou contributions croisées) peuvent être mal représentées, d'où l'intérêt d'exploiter les deux composantes simultanément pour une reconstruction plus robuste.

3.5.5 Simulation de données impédancemétriques analysées par DRT

Nous avons donc présenté les différentes méthodes permettant d'aboutir à la résolution des problèmes liés aux calculs de la DRT. En pratique nous avons utilisé un logiciel libre d'accès obtenu depuis le 'Journal of Open Source Software', il s'agit du logiciel 'DearEIS' [259]. L'ensemble de tous les résultats de DRT ont été calculés à l'aide de ce logiciel qui se base sur les articles précédemment cités pour les méthodes de calcul ([255-258, 260]). Spécifiquement nous utiliserons le méthode TR-NNLS en faisant varier le paramètre λ.

Nous allons dans cette section utiliser des données liées à des simulations et les analyser via la méthode de la DRT. Il s'agit ici de contrôler l'environnement de production des données pour se concentrer sur les résultats. Ainsi, nous allons pouvoir observer la réponse d'un milieu homogène et les réponses liées au modèle de la bactérie. Dans un premier cas nous étudierons des données produites par simulation COMSOL lors de la section 3.4. Puis nous établirons une critique pratique de l'étude de la DRT.

Afin d'anticiper les résultats de la DRT sur les solutions impédancemétriques, plusieurs configurations physiques ont été simulées grâce au logiciel COMSOL comme présenté dans la section 3.4 et leurs analyse par DRT sont représentées sur la figure 3.18. Les composantes de chaque simulation sont présentées dans le tableau 3.5 .

Les valeurs utilisées pour caractériser le comportement diélectrique de la paroi bactérienne sont issues des travaux de Dominique Rauly [244]. Les données du cytoplasme et du milieu correspondent à des valeurs connues de la littérature.

Pour cette simulation nous avons choisi deux cas de figure. Ils sont présentés dans le tableau 3.9. Ces simulations ont pour but d'isoler le pic lié au milieu et le pic lié à la présence bactérienne. Ainsi, l'absence d'un pic pour la simulation "milieu aqueux" met en avant le pic lié à la bactérie par rapport à celui du milieu. La présence du cytoplasme dans la simulation des bactéries vivantes permet d'imposer des propriétés électriques différentes à l'intérieur de la bactérie par rapport à l'extérieur de la paroi cellulaire.

Configuration	Solution	Paroi cellulaire	Cytoplasme
Simulation milieu vivant sans bactérie	✓		
Simulation bactéries vivantes	✓	✓	✓

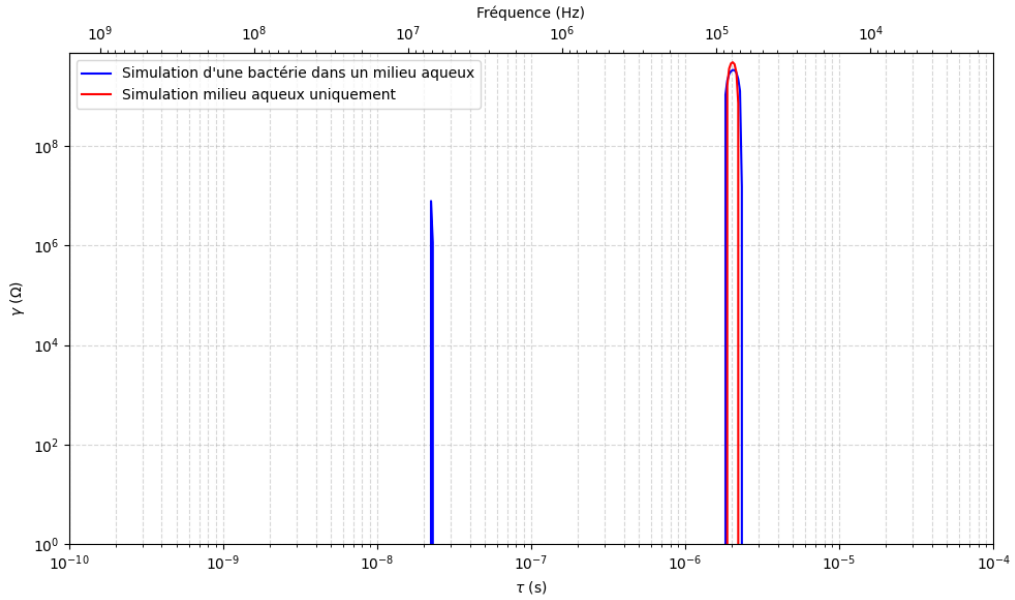
TABLEAU 3.9 – *Présence des éléments physiques dans chaque configuration simulée*

Sur la figure 3.18a, nous pouvons donc voir le pic lié à la présence d'une bactérie au sein d'un milieu aqueux. Pour cette étude, nous avons utilisé un bloc unitaire de $4,6\,\mu$m de côté en accord avec les travaux présentés précédemment [245]. Les données ont été traitées par DRT sur le logiciel DearEIS à l'aide de la méthode TR-NNLS pour $\lambda = 10^{-4}$. On remarque la présence d'un pic pour le milieu et d'un autre pour les bactéries. A contrario, la simulation sans bactérie, montre un seul pic directement lié aux propriétés du milieu. Nous avons choisi une représentation en échelle logarithmique de la fonction $\gamma(\tau)$ compte tenu des écarts d'amplitude. En effet, cette simulation n'a pas pour objectif de s'appuyer sur les valeurs d'amplitude des pics pour analyser la solution mais de souligner la présence de deux temps de relaxation typiques à $10^{-5}s$ pour le milieu et et à $10^{-7}s$ pour la bactérie. La présence de ce deuxième pic disparaît lors d'une simulation d'une bactérie dans un volume plus grand de $10\,\mu$m de côté tel que celui de la figure 3.11. En effet, la conductivité du milieu masque complètement la réponse liée à la bactérie à cette échelle de simulation. Par extension, lors des mesures pratiques, une trop faible concentration bactérienne ne permettra donc pas de distinguer le comportement diélectrique de la bactérie mais uniquement son impact sur la conductivité du milieu aqueux.

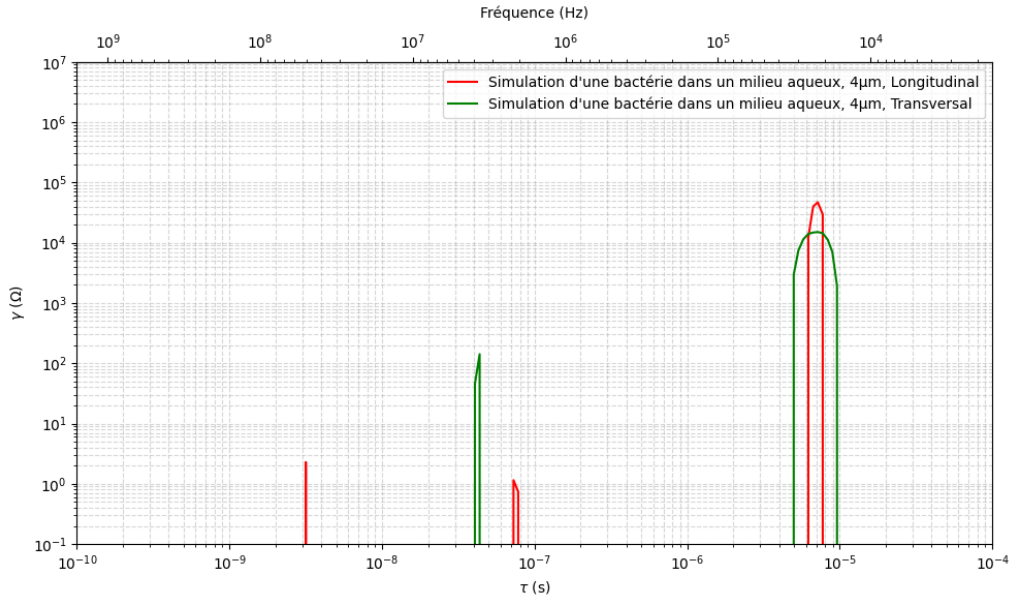
Sur la figure 3.18b est représentée la DRT de deux simulations préalablement développées dans la section 3.4. Il s'agit ici d'étudier les variations de la DRT en fonction de l'orientation (longitudinale ou transversale) de la bactérie vis à vis des électrodes. La représentation logarithmique des données permet de mettre en évidence le poids de chaque couple RC issu de la DRT. En effet, pour une représentation longitudinale, l'amplitude du pic est inférieure à $10\,\Omega$. Cela signifie que la détection de la bactérie dans ces conditions est particulièrement sensible aux bruits et aux défauts de mesure. On remarque cela par la présence d'un artefact autour de $\tau = 3 \times 10^{-9}\,s$. De plus, on remarque que le temps de relaxation caractéristique de la réponse bactérienne n'est pas fixe mais se situe dans plage allant de $10^{-7}\,s$ à $10^{-8}\,s$.

Finalement, ces simulations en conditions contrôlées et leur analyse par DRT confirment l'existence de deux relaxations distinctes attribuables, d'une part, au milieu aqueux (pic autour de $10^{-5}\,s$) et, d'autre part, à la présence cellulaire (pic typiquement situé entre 10^{-7} et $10^{-8}\,s$), en accord avec l'analyse via les équations Maxwell–Wagner. L'orientation de la bactérie par rapport au champ appliqué modifie le poids apparent des relaxations dans $\gamma(\tau)$. En effet, une configuration longitudinale présente un pic nettement plus faible (inférieur à $10\,\Omega$ dans nos simulations), ce qui rend la détection plus sensible au bruit. À l'inverse, en augmentant la taille du domaine de simulation (et donc en diminuant la fraction volumique effective), la réponse du milieu tend à masquer la signature bactérienne, jusqu'à faire disparaître le pic cellulaire dans la réponse $\gamma(\tau)$, comme observé pour un volume de $10\,\mu$m de côté.

Ces constats appellent deux réserves méthodologiques et une contrainte pratique. Premièrement les résultats obtenus sur un bloc unitaire de $4,0$–$4,6\,\mu$m de côté correspondent à une concentration équivalente élevée (de l'ordre de $10^{10}\,\mathrm{CFU/mL}$), non réalisable expérimentalement. Ainsi, ils doivent donc être lus comme des cas illustratifs permettant d'identifier et de séparer les mécanismes, plutôt que comme des prédictions quantitatives directes. Deuxièmement, les faibles amplitudes en configuration longitudinale imposent une vigilance accrue sur le choix de la régularisation (TR–NNLS, $\lambda = 10^{-4}$). Finalement, sur le plan expérimental, la mise en évidence du pic cellulaire exigera un compromis entre fraction volumique θ (ie. la concentration), conductivité du milieu σ_{ext} et fenêtre fréquentielle . En pratique, travailler dans un milieu à plus faible conduc-



(a) Distribution des temps de relaxation (TR-NNLS, $\lambda = 10^{-4}$) : bactérie dans un milieu (bleu) vs milieu aqueux (rouge) pour un volume de $4,6\,\mu m$.



(b) Distribution des temps de relaxation (TR-NNLS, $\lambda = 10^{-4}$) : bactéries dans milieu pour une tension appliquée longitudinale (bleu) et pour une analyse transversale (rouge) pour un volume de $4,0\mu m$.

FIGURE 3.18 – *Comparaison des distributions de temps de relaxation issues de deux configurations de simulation COMSOL.*

tion σ_{ext} et dans la bande 10^5–10^7 Hz maximise la différenciation des deux relaxations, tandis qu'une concentration et donc θ trop faible réduit le contraste jusqu'aux limites de détection.

3.5.6 Cas spécifique des parois bactériennes

La représentation de la paroi bactérienne comme une couche uniforme est une représentation équivalente dont la validité est limitée dans une certaine gamme de fréquences. Un modèle en accord avec les membranes extérieures, cytoplasmiques et du périplasme et le plus utilisé dans la communauté scientifique a été proposé par Bai *et al.* [227]. Le tableau 3.10 représente les valeurs choisies pour appliquer ce modèle à une bactérie.

Configuration	R (Ω)	C (F)	$\tau = RC$	référence
Membrane extérieure	7000	153×10^{-12}	$1,07\mu s$	[244]
Périplasme	0,312	531×10^{-12}	$0,16ns$	[244]
Membrane intérieur	7×10^6	$69,5 \times 10^{-12}$	$0,49ms$	[244]

TABLEAU 3.10 – *Représentation des éléments R,C choisis pour la simulation des bactéries dans un milieu selon [244]*

On remarque sur ce tableau que les valeurs des temps de relaxation τ sont étalées sur plusieurs décades, demandant une analyse du KHz au GHz. Cependant, la faible amplitude de la réponse électrique de ces différents éléments de simulation est dûe au volume qu'occupe la bactérie dans l'espace de mesure (que ce soit pour la simulation ou l'expérimentation), rendant leur détection impossible. Bien que la membrane intérieure ait des propriétés électriques distinctes, l'impact de sa réponse sur le spectre sera trop faible pour être détecté car la fraction volumique de la paroi est trop faible par rapport au volume total pour véritablement influencer le résultat.

Les modèles électriques de transducteurs peuvent difficilement être validés à partir de données expérimentales. En effet, bien que des modèles RC équivalents permettent d'illustrer théoriquement les changements de propriétés des bactéries, leur application directe en simulation reste limitée par la trop faible amplitude de réponse des composants biologiques. En pratique, le spectre impédancemétrique reflète une combinaison globale de ces éléments. Cette superposition, couplée à la dilution du signal, engendre une infinité de décompositions possibles, rendant toute dissociation des processus physiques par la DRT ou par circuit équivalent incertaine.

3.5.7 Utilisation de la DRT dans les mesures biologiques

On note cependant l'utilisation récente de la DRT sur des données biologiques [80][226]. Dans ces deux études, des suspensions cellulaires ont fait l'objet d'analyses par DRT afin de découpler les différents processus électrochimiques présents. Dans l'article de Lee *et al.* (2025) [226], des bactéries Gram-négatif (*E. coli* ATCC 25922) et Gram-positifs (*S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853) sont cultivées pendant 24 h à $37\,^\circ C$ dans un milieu Mueller–Hinton Broth, puis sont déposées ($200\,\mu$L) sur des électrodes interdigitées Cr/Au. L'impédance est mesurée de 10 Hz à 10 MHz (10 mV crête-à-crête) à l'aide d'un LCR-mètre Agilent 4284A. Les concentrations bactériennes sont inférieures à 10^4 CFU/mL La DRT révèle deux pics bien distincts. Premièrement, $\tau_1 \approx 6,85\,\mu$s, est attribué à la polarisation de la double couche électrode–électrolyte et à la réponse diélectrique du solvant (identique à l'eau DI). Deuxièmement, τ_2 (de l'ordre de $10^{-4}\,s$), est lié à la permittivité et à la conductivité du milieu de culture (molécules et ions). Ici, le temps de relaxation τ_1 isole la composante purement capacitive de l'interface bactéries/électrodes, tandis que le temps τ_2 reflète les phénomènes volumétriques du milieu, indépendants de la concentration

cellulaire.Chez Ramírez-Chavarría *et al.* (2020) [80], des particules de SiO_2 (diamètre$= 0,8\,\mu$m) ou des cellules HeLa (cellule cancéreuse) en suspension dans du PBS 1X (sans centrifugation) sont sondées de 1 kHz à 1 MHz avec un volume $50\,\mu$L sur électrodes platines en nid d'abeille. Les concentrations de cellules sont inférieures à 10^5 CFU/mL. La DRT met en évidence trois pics. Premièrement, un temps de relaxation $\tau_1 \sim 10^{-6}\,s$, sensible à la concentration de particules ou de cellules. Il se décale vers des temps plus longs quand la concentration augmente. Deuxièmement, le temps $\tau_2 \sim 0,8 \times 10^{-4}\,s$, est dû à la mobilité des charges de surface, lié à la relaxation du milieu de mesure. Finalement, le temps $\tau_3 \sim 10^{-2}\,s$, est dû à la polarisation de la double couche électrode–électrolyte. Seul τ_1 varie significativement avec la concentration, illustrant la capacité de la DRT à quantifier la densité cellulaire et à distinguer les contributions volumétriques (τ_1) des phénomènes de surface (τ_2) et d'interface (τ_3).

Dans ces deux études, les pics sont reliés à différents phénomènes. On remarque que trois temps de relaxation distincts à $10^{-6}\,s$, $10^{-4}\,s$ et $10^{-2}\,s$. Le pic présent à $10^{-2}\,s$ semble correspondre à des processus de réactions proches des électrodes (réaction, adsorption, diffusion). Le pic observé à $10^{-4}\,s$ peut, quant à lui, être lié aux propriétés diélectriques du milieu de mesure d'après Ramirez et aux ions et molécules d'après Lee. Pour Ramirez, le pic à $10^{-6}\,s$ est lié aux cellules et pour Lee aux propriétés du milieu aqueux. Après l'étude précédente sur les simulations bactériennes il semble que la relaxation à $10^{-6}\,s$ soit liée au milieu et qu'une relaxation à $10^{-4}\,s$ soit due aux molécules et aux ions de la solution car ils ne sont pas présents dans notre simulation.

Conclusion

Lors de ce chapitre nous avons présenté les fondements de l'impédancemétrie appliquée aux milieux aqueux, en décrivant les dispositifs de mesure et les phénomènes électrochimiques. Nous avons ensuite abordé la simulation de données d'impédance de solutions contenant du matériau biologique et son traitement par la distribution des temps de relaxation.

Nous avons détaillé les configurations d'électrodes plans, interdigitées et sur verre, ainsi que les mécanismes de polarisation, adsorption et diffusion qui en découlent lors de mesure électrochimique. Cette base expérimentale a permis de comprendre comment chaque composant du système contribue à la réponse en fréquence. Une première comparaison de mesures expérimentales et théoriques, à été mise en place pour des solutions aqueuses salines.

Des simulations par éléments finis ont permis de simuler le comportement d'une bactérie et la réponse d'une solution bactérienne en fonction de paramètres d'étude expérimentale. Une forte concentration bactérienne permet de mettre en évidence la modification du signal de phase dû à cette dernière. Les données d'impédance peuvent se traiter directement via l'analyse du module et de la phase ou en utilisant des algorithmes de régressions. Ces traitements peuvent aboutir à l'analyse diélectrique du milieu étudié. Nous avons vu au travers des équations de Maxwell-Wagner les modifications diélectriques du signal en fonction de la concentration, de la conductivité et de l'état de la paroi cellulaire. La conductivité et l'état cellulaire, difficilement séparables expérimentalement agissent sur la permittivité du signal. Une réduction de la permittivité des parois cellulaires entraînera une chute de la permittivité de la solution et une augmentation de la conductivité du milieu, ce qui induit une élévation des valeurs de permittivité de la solution. Finalement, l'application de la méthode DRT aux données des simulations a permis de mettre en évidence la présence d'un temps de relaxation caractéristique lié à la bactérie entre 10^{-7} s et 10^{-8} s pour une bactérie plongée dans un milieu très faiblement conducteur. Cette réponse unique n'est observable que pour des concentrations bactériennes supérieures à 10^8 CFU/mL. Les propriétés du milieu semblent pouvoir être observées à des temps de relaxations de 10^{-6} s et $10^{-4}\,s$. Le lien entre la conductivité et les mesures impédancemétriques biologiques sera abordé dans le chapitre suivant. Le chapitre suivant a pour objectif d'analyser des populations bactériennes expérimentalement puis d'observer l'effet des polluants sur celles-ci.

4
Analyse expérimentale

Dans ce chapitre nous réalisons une preuve de concept d'un capteur de toxicité aquatique à l'aide de bactéries. Pour ce faire, ce biocapteur sera étudié étape par étape. Dans un premier temps nous établirons le protocole de mesure. Puis, nous réaliserons une série de mesures sur des états bactériens contrôlés. Ces mesures seront traitées pour observer les différents paramètres électriques obtenus par impédancemétrie. Dans un second temps, nous réaliserons des mesures et traitements sur des populations bactériennes polluées. Finalement, nous testerons d'autres protocoles sur des dispositifs interdigités sur verre.

4.1 Protocole de préparation bactérien

Le choix du protocole scientifique de traitement des bactéries est crucial pour l'analyse. Nous avons établi qu'une centrifugation ayant lieu après le traitement par chaleur (90°C pendant 20 minutes) n'est pas idéale pour établir une comparaison avec une solution sans traitement. En effet dans ce cas, les ions diffusés par les bactéries sont retirés de la solution lors de la mise en suspension du reliquat. In fine, nous obtenons une solution de bactéries traitées contenant moins d'ions que celle contenant des bactéries saines.

De plus, nous avons remarqué qu'une seule centrifugation ne permet pas de s'affranchir de tout le matériel présent dans le milieu de culture (hors bactéries), ce qui ne permet pas de calculer le nombre de charges ramenées dans la solution par les bactéries.

Finalement, nous avons fait le choix de suspendre les bactéries dans de l'eau désionisée pour maximiser les différences entre les solutions bactériennes étudiées. Étant donné que nous cherchons à étudier une variation du nombre de charges électriques, la solution idéale reste celle qui en possède le moins au départ. Dit autrement, un trop grand nombre de charges risque de masquer l'apport des bactéries traitées au milieu et donc de nuire à l'étude sur la conductivité.

Pour les résultats qui suivront, nous avons mis en place le protocole suivant :

— On prélève une CFU d'une plaque d'Agar-Agar (LB 5 g/L NaCl) préalablement préparée qu'on plonge dans un milieu liquide de croissance (LB 5 g/L NaCl).

— Une fois que cette culture est en phase stationnaire nous la diluons dans un nouveau milieu de croissance (LB 5 g/L NaCl, 37°C, 100rpm) afin d'avoir une absorbance OD_{600nm} comprise entre 0,05 et 0,2 traduisant la concentration bactérienne de la solution (voir figure 2.12 dans le chapitre 2).

— Ce milieu est laissé en croissance jusqu'à atteindre une absorbance OD_{600nm} comprise entre 0,75 et 1,2.

— Puis, nous réalisons une suite de trois centrifugations avec resuspension en eau désionisée.

— Après la troisième centrifugation-resuspension, le volume total est divisé en autant de solutions que d'états à tester (vivantes, traitées par chaleur ou autres traitements). Ce volume doit être suffisant pour toutes les mesures prévues (entre 20 et 30 mesures par état à tester).

— Les solutions sont alors traitées ou laissées intactes selon les besoins de l'expérimentation.

— Pour chaque solution testée, 5 mesures sont faites (via 5 prélèvements différents). A chaque mesure, un volume est prélevée de la solution, mis entre les électrodes, la mesure et faite puis les électrodes sont nettoyées .

— Les solutions aqueuses sont conservées dans un environnement à 21°C, en attente de prélèvement.

L'ensemble de ces étapes à été réalisé a minima trois fois afin d'avoir a minima trois réplicas bactériens qu'on appellera populations dans la suite du chapitre. Nous ne présenterons dans la suite de cette section que les résultats d'une des populations, représentative des résultats obtenus avec toutes les autres. Ainsi dans cette étude, une population désigne l'ensemble des bactéries issues d'une même culture biologique (réplica), à partir de laquelle sont préparées différentes concentrations bactériennes (notées S1, S2 et S3) par dilution en cascade. Chaque concentration constitue une solution spécifique soumise à un état physiologique (vivant ou traité par chaleur), sur laquelle sont réalisés plusieurs tests indépendants consistant en une série de mesures d'impédance répétées. Cette distinction permet de séparer la variabilité biologique (entre populations) de la répétabilité technique (entre mesures et tests).

4.2 Détection de bactéries E.coli dans des solutions de contrôle

Dans cette section, nous allons comparer deux états de contrôle (bactéries vivantes et traitées par chaleur) pour différentes concentrations bactériennes.

Avec ces données, nous analyserons d'abord le module $|Z|$ et la phase de l'impédance Z, puis nous ajusterons un modèle RC pour dégager les tendances globales identifiées dans le chapitre précédent (R reflétant le contenu ionique, C restant faiblement discriminant). Ensuite nous montrerons une analyse faite via la méthode DRT avec des valeurs $\lambda = 10^{-4}$ et 10^{-5} pour le paramètre algorithmique de régularisation afin de mettre en évidence des temps de relaxation caractéristiques τ_k et des amplitudes γ_k associés à la dispersion β. Finalement nous montrerons les limites du protocole choisi via une étude diélectrique.
Cet ensemble constitue la ligne de base utilisée dans les sections suivantes pour évaluer l'effet des polluants sur les réponses ohmiques et diélectriques des suspensions bactériennes.

4.2.1 Analyse du module et de la phase de l'impédance

Les courbes de la figure 4.1 correspondent au module et à la phase de l'impédance pour une population bactérienne mesurée diluée en cascade, ce qui permet des mesures à 10^9, 10^8 et 10^7 CFU/mL. Comme précisé en introduction, deux état bactériens sont étudiés, les bactéries vivantes puis traitées par chaleur. Les populations vivantes sont nommées A et les populations traitées par chaleur le sont avec un D. Nous utiliserons la nomenclature S1, S2 et S3 pour des solutions contenant respectivement 10^7, 10^8 et 10^9 CFU/mL.

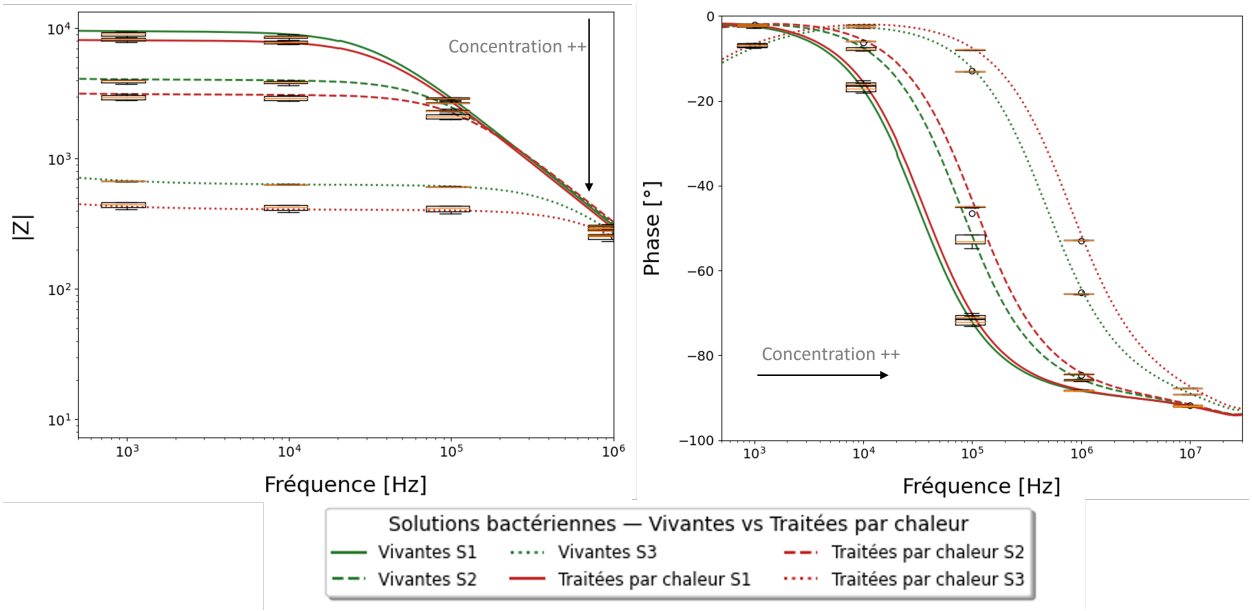


FIGURE 4.1 – *Évolutions du module de l'impédance et de la phase pour trois dilutions de bactéries (S3, S2 et S1* 10^9, 10^8, 10^7 CFU/mL *pour des solutions de bactéries vivantes et traitées par chaleur*

L'analyse de l'impédance présentée sur la figure 4.1 met d'abord en évidence une hiérarchisation claire entre les concentrations de populations à l'état vivant. Les analyses qui suivent se basent sur les données extraites à 10 kHz. Cette fréquence permet une bonne différenciation à la fois sur le module et la phase de l'impédance. La solution la moins concentrée S1-A présente le module de l'impédance le plus élevé avec $|Z| = 8758 \pm 196\,\Omega$, suivie par S2-A avec $3688 \pm 230\,\Omega$, et enfin S3-A qui affiche la valeur la plus faible à $633 \pm 2\,\Omega$. La comparaison avec l'état traité par chaleur (D) révèle une baisse systématique du module pour toutes les concentrations. Pour S1-D,

le module de l'impédance chute à $7710 \pm 114\,\Omega$ lorsqu'elle est traitée. De même, la population S2-D voit ce module diminuer à $2928 \pm 69\,\Omega$, tandis que S3-D atteint $410 \pm 11\,\Omega$. Cette réduction globale de $|Z|$ qui traduit une augmentation de la conductivité est en accord avec nos précédentes hypothèses sur l'apport, par les bactéries traitées, de charges ioniques à la solution. Concernant la phase ϕ, on observe une tendance similaire. La solution S1-A la moins concentrée montre le déphasage le plus marqué avec $\phi = -16,2 \pm 0,5°$, contre $-7,2 \pm 0,4°$ pour S2-A et $-2.7 \pm 0,1°$ pour S3-A. En observant les solutions traitées par chaleur, on remarque une diminution de la valeur absolue de la phase, traduisant un comportement moins capacitif. Ainsi, la phase de S1-D remonte à $-15,1 \pm 0,3°$, celle de S2-D passe à $-5,6 \pm 0,1°$, et celle de S3-D vaut $-2,1 \pm 0,1°$. Ces variations de phase corroborent les observations effectuées sur le module de l'impédance. On remarque donc sur ces graphiques qu'il est possible de différencier ces populations bactériennes par les valeurs du module de l'impédance ou de la phase, que ce soit entre dilutions différentes ou entre bactéries traitées ou non à même concentration, validant ainsi le protocole expérimental. Les résidus de phase (modèle Z − données) ont été examinés afin d'isoler la signature subtile de la cellule dans la bande fréquentielle d'intérêt. De plus, nous avons cherché à détecter les variations locales des dérivées du signal de phase. L'objectif était d'apercevoir les influences de processus électrochimiques de faible importance sur le signal d'EIS. Ce traitement n'a pas abouti à des résultats significatifs. Cependant, cette étude des variations implique un changement de signe de la dérivée du signal et non une variation locale de la pente de la dérivée. De plus, nous avons également étudié les variations locales de la pente avec la pente théorique obtenue par un circuit RC (obtenu lors de la régression et dont les paramètres ont été présenté plus haut). Cette méthode n'a pas montré de plage caractéristique pouvant être liée à la polarisation des bactéries.
A la suite de cela, nous avons réalisé une régression non linéaire via un circuit RC sur les courbes afin d'étudier les paramètres R et C obtenus. La figure 4.2 présente l'ensemble des paramètres R et C obtenus sur ces différentes populations. En annexe E est disponible le tableau E.1 qui reprend en détail ces paramètres.

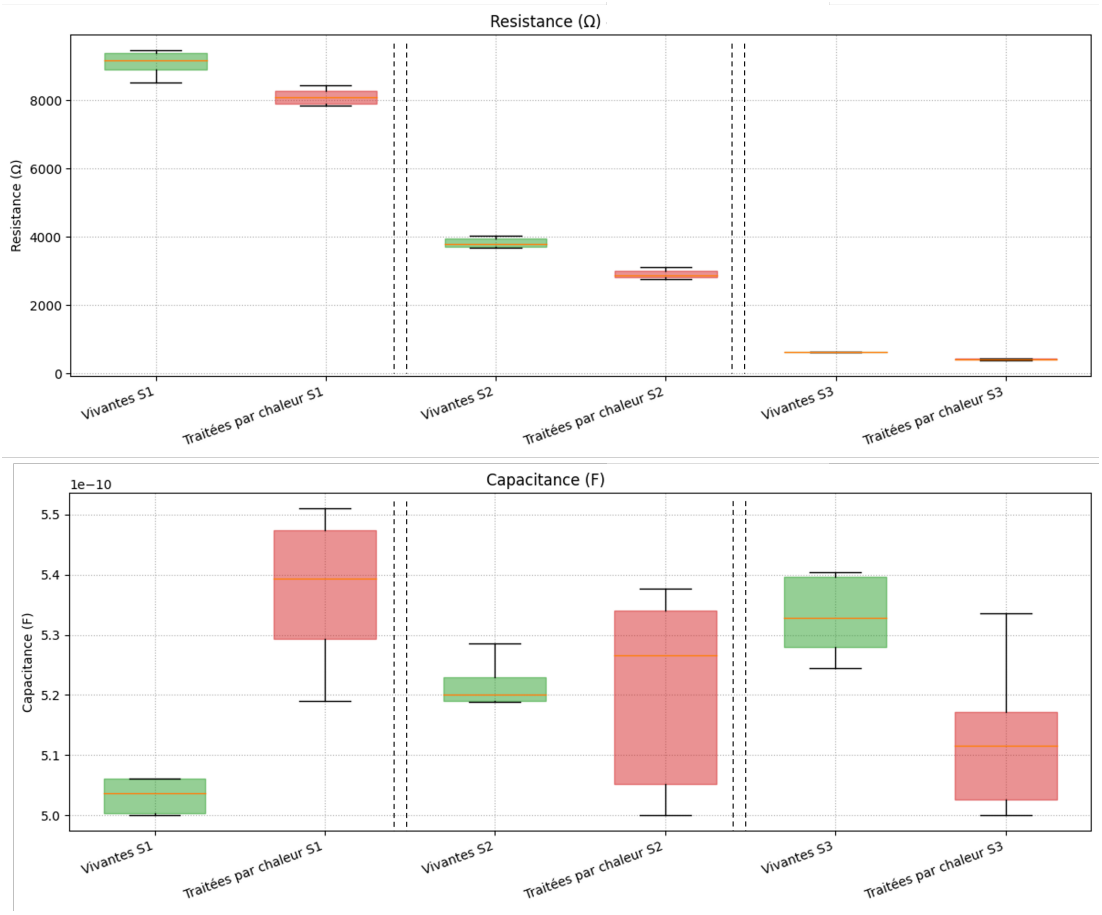


FIGURE 4.2 – *Dynamique d'évolution des résistance et capacité R et C pour les trois concentrations bactériennes et deux états de contrôle (A) et (D)*

La résistance R discrimine nettement les solutions vivantes (A) des solutions traitées par chaleur (D) à chaque concentration. À la plus faible concentration S1, on obtient $R_A = (9,1 \pm 0,4)\,k\Omega$ contre $R_D = (8,1 \pm 0,3)\,k\Omega$, soit une variation relative de $+12,2\,\%$. À la concentration S2, $R_A = (3,7 \pm 0,4)\,k\Omega$ contre $R_D = (2,9 \pm 0,1)\,k\Omega$, correspondant à une variation relative de $+27,5\,\%$. Enfin, à la concentration S3, $R_A = (626 \pm 4)\,\Omega$ tandis que $R_D = (413 \pm 24)\,\Omega$, soit une variation relative de $+51,6\,\%$. Dans tous les cas, les écarts observés entre A et D excèdent les incertitudes de mesure.

À l'inverse, la capacité C reste globalement stable, avec des valeurs comprises entre $(5,1$ et $5,4) \times 10^{-10}\,F$, sans tendance monotone entre les états vivant et traité. À la concentration S1, on observe $C_A = (5,06 \pm 0,10) \times 10^{-10}\,F$ contre $C_D = (5,37 \pm 0,14) \times 10^{-10}\,F$, soit un écart de $+3,1 \times 10^{-11}\,F$ (environ $2,5\sigma$). À la concentration S2, la différence $(+2 \times 10^{-12}\,F)$ reste négligeable devant les incertitudes (environ $0,1\sigma$). À la plus forte concentration S3, on remarque $C_A = (5,37 \pm 0,17) \times 10^{-10}\,F$ sur $C_D = (5,13 \pm 0,14) \times 10^{-10}\,F$, soit un écart de $-2,4 \times 10^{-11}\,F$ (environ $1,5\sigma$).

À la concentration S1, la capacité de la solution bactérienne traitée C_D dépasse celle des bactéries vivantes C_A de $3,1 \times 10^{-11}F$ ($\approx 2,5\,\sigma$), mais à la concentration S2 l'écart $(2 \times 10^{-12}\,F)$ est négligeable ($\approx 0,1\sigma$). Inversement, à la plus forte concentration S3, la supériorité de C_A sur C_D $(2,4 \times 10^{-11}F)$ reste modérée ($\approx 1,5\sigma$). Finalement, on remarque bel et bien que la capacité C apparaît peu discriminant, tandis que la valeur de la résistance R porte clairement une disctinction entre les deux solutions de contrôle.

Bien que ces résultats ne prennent pas en compte des tests sur plusieurs populations bactériennes, comme ce sera le cas dans les prochaines sections, nous pouvons déjà conclure que

l'analyse du module et de la phase permettent de discriminer deux états bactériens à concentration égale. De plus, utiliser une régression sur le module RC permet de relier les propriétés diélectriques du milieu (conductivité et permittivité) aux données d'EIS.

4.2.2 Propriétés diélectriques

Dans la partie théorique du chapitre 3, nous avons vu qu'un des objectifs visés est de relier les propriétés diélectriques de la solution testée aux caractéristiques des cellules bactériennes. Plus spécifiquement l'étude de la conductivité de façon générale et la permittivité des parois membranaires des cellules.

Premièrement, nous cherchons à exploiter l'influence de l'intégrité des parois bactériennes sur la permittivité complexe du milieu. En théorie, une modification de l'état membranaire affecte simultanément la partie réelle (ε') et la partie imaginaire de la permittivité (ε''). La partie réelle est modifiée suite aux changements des propriétés isolantes de la paroi lors de la polarisation interfaciale. La partie imaginaire, et donc la conductivité, est également affectée à cause du largage d'ions de l'appareil cytoplasmique (caractéristique en 1/f).

Deuxièmement, les expériences menées sur les solutions de contrôle ont montré que plus la concentration bactérienne est forte et plus les valeurs de résistance du milieu seront différenciées.

Afin de quantifier l'impact de l'état physiologique des bactéries sur les propriétés électriques du milieu, nous utilisons la relation (3.17) pour traduire les valeurs des résistances R en densités d'ions n. Le nombre de charges par bactérie est ensuite extrait en rapportant n à la concentration bactérienne. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 4.1.

Dilution (CFU/mL)	**Etat**	**Conductivité** σ $(\mu S/cm)$	**Densité** n $(ions/m^3)$	**Charges / bactérie** $(N_{i/bact})$
S1 (10^7)	Vivantes (A)	1,41	6.7×10^{18}	$6,7 \times 10^7$
	Traitées (D)	1,58	$7,5 \times 10^{18}$	$7,5 \times 10^7$
S2 (10^8)	Vivantes (A)	3,46	$16,5 \times 10^{18}$	$1,6 \times 10^7$
	Traitées (D)	4,41	$21,0 \times 10^{18}$	$2,1 \times 10^7$
S3 (10^9)	Vivantes (A)	20,45	$97,4 \times 10^{18}$	$0,9 \times 10^7$
	Traitées (D)	30,99	$147,7 \times 10^{18}$	$1,4 \times 10^7$

TABLEAU 4.1 – *Analyse des propriétés électriques et ioniques de suspensions bactériennes extraites du paramètre ohmique R ($K_{cell} = 0,0128\,/cm$).*

L'analyse comparative de nos résultats et de la théorie présentée au chapitre 2 valide le modèle d'homogénéisation du milieu lors du traitement par chaleur. En ajoutant la contribution théorique en conductivité et en volume du cytoplasme aux valeurs mesurées pour les bactéries vivantes, nous retrouvons bien l'état des solutions traitées par chaleur. En effet, pour la dilution S3, la somme des charges de l'état vivant ($0,9 \times 10^7$) et de la contribution cytoplasmique ($0,42 \times 10^7$) aboutit à une valeur théorique de $1,39 \times 10^7$ charges. Le résultat de $1,4 \times 10^7$ est donc en cohérence avec cette hypothèse. De manière analogue pour la dilution S2, où l'écart entre la somme théorique et la mesure réelle n'est que de $1,5\%$. Pour la solution S1 nous obtenons un écart de $0,4 \times 10^7$ charges par bactérie entre la théorie et l'expérimentation soit 6 %. Cet écart peut venir des erreurs de dilution ou d'homogénéisation de la solution. Ces résultats démontrent que l'augmentation de conductivité lors du passage de l'état vivant (A) vers l'état traité par chaleur (D) est principalement régie par le largage des ions internes suite à la rupture des fonctions ou de la barrière membranaires.

L'analyse des résultats expérimentaux, confrontée aux modèles de Gouy-Chapman-Stern et de Goldman-Hodgkin-Katz, permet de dresser un bilan ionique précis de la suspension bactérienne. Si le calcul théorique de la double couche électrique prévoit environ 10^6 charges à l'équilibre, nos mesures d'impédancemétrie révèlent une contribution globale de l'ordre de 10^7 charges par cellule. Cet écart peut s'expliquer car la valeur théorique n'inclut pas les ions résiduels du milieu de suspension ni les erreurs de manipulation. L'augmentation systématique de la conductivité après traitement par chaleur se se traduit par un gain net de $0,5 \times 10^7$ charges pour la dilution S3. Ceci corrobore le modèle de Nernst, pour lequel la rupture de l'intégrité membranaire libère les ions intracellulaires, transformant le potentiel de membrane statique en une conductivité ionique mesurable.

La figure 4.3 affiche la permittivité réelle ε' en fonction de la fréquence sur les résultats d'expérience à deux concentrations bactériennes (10^8 CFU/mL et 10^9 CFU/mL) ; avec pour chaque concentration une solution contenant des bactéries vivantes et une autre contenant des bactéries traitées par chaleur. Ces résultats sont issus du même protocole défini à la section 4.1. Il s'agit d'une suspension de bactéries en eau désionisée, ce qui correspond à une conductivité de l'ordre de $10^{-4}\,\mathrm{S/m}$.

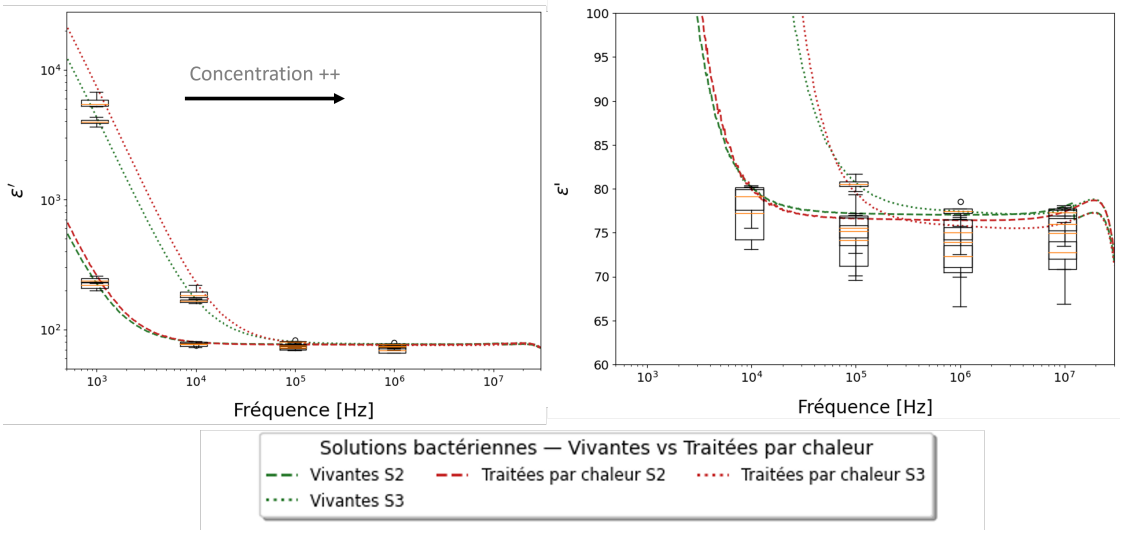


FIGURE 4.3 – *Variation de permittivité réelle ε' pour 2 lots de solutions bactériennes Vivantes (A) et Traitées par chaleurs (D) à $10^8\,CFU/mL$ et $10^9\,CFU/mL$*

On remarque sur cette figure qu'à très basse fréquence ($< 10^4\,\mathrm{Hz}$), ε' est élevée et décroît avec l'augmentation de la fréquence ; l'amplitude est d'autant plus forte que la concentration augmente, et elle est maximale après traitement thermique, signe d'une conduction accrue qui nourrit la polarisation interfaciale.

Dans la large bande de dispersion β ($10\,\mathrm{kHz} - 1\,\mathrm{MHz}$), toutes les courbes ε' arrivent sur une phase stationnaire ; la phase stationnaire est atteinte plus haut en fréquence pour des concentrations plus élevées ($100\,\mathrm{kHz}$ à $10^9\,\mathrm{CFU/mL}$ contre $10\,\mathrm{kHz}$ à $10^8\,\mathrm{CFU/mL}$), reflet du nombre accru d'interfaces entre les cellules et le milieu.

Sur le plateau intermédiaire ($1 - 5\,\mathrm{MHz}$), les courbes se rapprochent d'une valeur voisine de la permittivité du milieu externe ε'_{ra} et une discrimination de concentration devient impossible.

Au-delà de quelques MHz, une décroissance supplémentaire apparaît, comme attendu lorsque les chemins capacitifs courts dominent.

Les variations des données ne permettent pas de discriminer les solutions dans la bande de dispersion β comme nous pouvons l'observer sur le deuxième graphique de la figure 4.3. Ces observations ne ne corroborent pas les prédictions d'un modèle simple coquille, selon lequel la permittivité effective devrait être plus faible pour les bactéries traitées par chaleur, en raison de l'altération de

l'intégrité membranaire. L'absence de cette signature suggère que la réponse mesurée est effectivement dominée par des variations de conductivité plutôt que par des effets capacitifs liés à la membrane. Toutefois, l'amplitude théorique attendue de la variation de la partie réelle de la permittivité vis à vis de la concentration bactérienne demeure inférieure à l'unité. Étant donné que les incertitudes expérimentales associées aux mesures sont supérieures à cette variation attendue, il n'est pas possible, dans le cadre de cette étude particulière, de mettre en évidence de manière fiable l'altération des parois cellulaires via la lecture directe de la permittivité réelle de la solution.

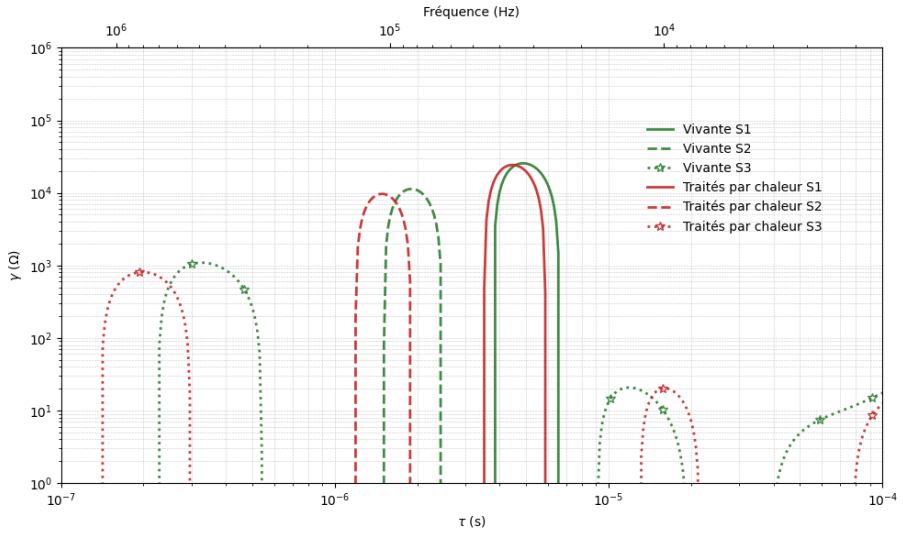
4.2.3 Analyse par la méthode DRT

L'étude directe de l'impédance puis par régression linéaire ne nous ayant pas permis d'observer d'effets autres que ceux liés aux charges larguées dans le milieu, nous proposons une analyse des signaux par DRT afin de tenter de mieux détecter d'infimes signaux liés aux effets membranaires. Dans la méthode DRT, le choix du paramètre algorithmique de régularisation λ conditionne la sensibilité au bruit et les détails restitués. Un paramètre λ faible permet de mieux révéler des contributions locales dans le spectre mais implique une plus grande sensibilité aux artefacts de mesure. Les résultats obtenus sur l'ensemble des solutions préparées avec le protocole de la section 4.1 sont présentés sur la figure 4.4. Le premier graphique montre la globalité du spectre obtenu par la méthode DRT pour un $\lambda = 10^{-4}$. Il met en avant l'importance du pic lié au milieu aqueux qui change de position selon l'état (traitée ou vivante) et la concentration de la solution. Seule la plus forte concentration S_3 fait apparaître des pics secondaires au-delà de $10^{-5}\,s$. Les pics apparaissent peu marqués car larges. Ceci est dû au choix d'une valeur élevée pour le paramètre lambda. En effet, plus la valeur de λ tends vers 0 plus le résultat de la DRT sera peu sensible. Le deuxième graphique quant à lui, correspond à une valeur de paramètre $\lambda = 10^{-5}$; il est tracé lui aussi sur un fenêtrage entre $10^{-7}\,s$ et $10^{-4}\,s$. La représentation logarithmique de la distribution des temps de relaxation permet de voir les signaux ayant de larges différences d'amplitude tout en isolant les contributions principales (valeur haute) des contributions secondaires (valeur basse). Les données obtenues sont résumées dans le tableau 4.2 pour $\lambda = 10^{-4}$ et dans le tableau 4.3 pour $\lambda = 10^{-5}$. Finalement, il convient de préciser que les courbes présentées correspondent à un exemple de mesure représentative, tandis que les tableaux regroupent les valeurs moyennes obtenues sur l'ensemble des répétitions de mesure. L'ajout des écarts types permet d'évaluer la variabilité des temps caractéristiques extraits et de vérifier la cohérence des résultats en fonction du paramètre de régularisation λ.

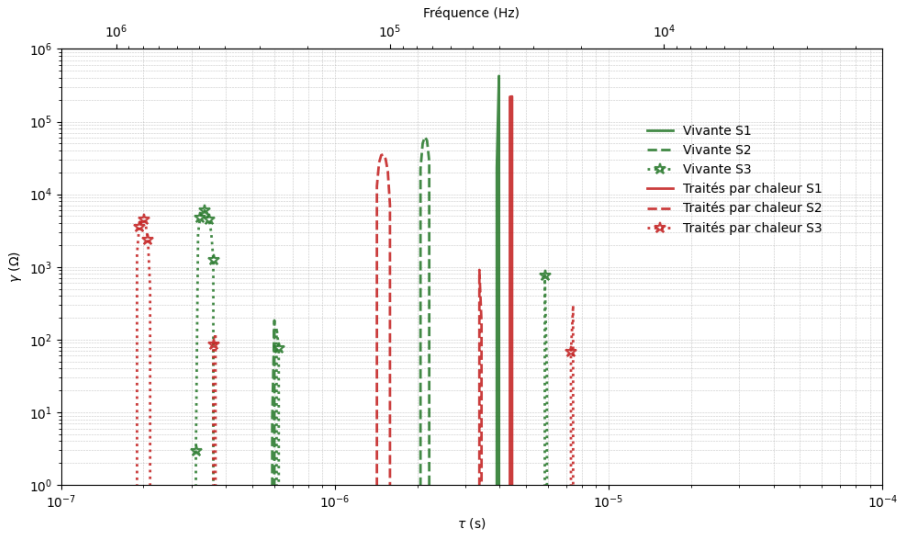
On remarque sur le premier graphique 4.4a, correspondant au paramètre $\lambda = 10^{-4}$, la différence de hauteur des pics. En effet, la hauteur de pic (fonction de distribution γ) correspond au poids de ce temps de relaxation dans les données d'impédance. Ici, le pic le plus haut pour chaque solution correspond à la contribution du milieu liquide à l'impédance.

Deuxièmement, on remarque que plus la concentration en bactéries est forte (S3>S2>S1) plus la hauteur du pic diminue. Ceci est cohérent avec le fait qu'un plus grand nombre de charges est amené dans la solution. Cela augmente la conductivité de la solution et donc diminue la résistance équivalente et la hauteur du pic γ. Finalement, on remarque deux phénomènes de décalages distincts des pics représentatifs du milieu. Un premier décalage est visible entre les pics de chaque concentration et un deuxième apparaît entre les états bactériens d'une même concentration. Pour ces deux décalages, nous avons étudié principalement les propriétés diélectriques du milieu et on peut en conclure que c'est donc la variation du nombre de charges que nous observons. Ainsi, lorsque le nombre de charges dans la solution augmente le temps de relaxation diminue.

Les deux tableaux montrent, pour chaque concentration (S1–S3), 1 à 3 pics dans le spectre DRT caractérisés par des temps caractéristiques τ_k et des amplitudes γ_k . À $\lambda = 10^{-5}$, les amplitudes γ_k sont globalement plus élevées et le nombre de pics détectés augmente (S3 par exemple passe de 2 à 3 pics), signe d'une régularisation moins lissée et d'une meilleure résolution des mé-



(a) $\lambda = 10^{-4}$



(b) $\lambda = 10^{-5}$

FIGURE 4.4 – *Résultat d'analyse de la DRT sur trois concentrations bactériennes pour des échantillons sains et traités par la chaleur*

Group	τ_1	γ_1	τ_2	γ_2
Vivantes S1	$4,56 \times 10^{-6}$	$1,24 \times 10^{5}$		
Vivantes S2	$1,93 \times 10^{-6}$	$1,97 \times 10^{4}$	$9,41 \times 10^{-6}$*	1.41×10^{2}*
Vivantes S3	$2,90 \times 10^{-7}$	$1,85 \times 10^{3}$	$7,41 \times 10^{-6}$	$3,04 \times 10^{2}$
Traités par chaleur S1	$4,36 \times 10^{-6}$	$1,16 \times 10^{5}$		
Traités par chaleur S2	$1,49 \times 10^{-6}$	$1,43 \times 10^{4}$	$7,28 \times 10^{-6}$*	$7,86 \times 10^{1}$*
Traités par chaleur S3	$1,98 \times 10^{-7}$	$1,93 \times 10^{3}$	$6,72 \times 10^{-6}$	$1,88 \times 10^{2}$

TABLEAU 4.2 – *Résultat moyen de la DRT pour* $\lambda = 10^{-4}$. *Les valeurs accompagnées d'un astérisque correspondent à une détection unique de ce pic sur l'ensemble des jeux de données.*

Group	τ_1	γ_1	τ_2	γ_2	τ_3	γ_3
Vivantes S1	$4,58 \times 10^{-6}$	$3,52 \times 10^{5}$				
Vivantes S2	$1,27 \times 10^{-6}$	$9,23 \times 10^{3}$	$2,54 \times 10^{-6}$	$2,99 \times 10^{2}$		
Vivantes S3	$2,71 \times 10^{-7}$	$2,91 \times 10^{3}$	$1,67 \times 10^{-6}$	$2,40 \times 10^{2}$	$6,63 \times 10^{-6}$	$5,15 \times 10^{2}$
Traitées par chaleurs S1	$4,36 \times 10^{-6}$	$3,03 \times 10^{5}$				
Traitées par chaleurs S2	$1,48 \times 10^{-6}$	$2,94 \times 10^{4}$	$2,97 \times 10^{-6}$	$8,69 \times 10^{2}$		
Traitées par chaleurs S3	$1,98 \times 10^{-7}$	$4,58 \times 10^{3}$	$3,54 \times 10^{-7}$	$1,82 \times 10^{2}$	$6,90 \times 10^{-6}$	$2,73 \times 10^{2}$

TABLEAU 4.3 – *Résultat moyen de la DRT pour* $\lambda = 10^{-5}$

canismes rapides. Ainsi, les variations d'amplitude des pics sur la fonction γ sont dépendantes de la valeur choisie pour le paramètre λ.

Il est possible néanmoins de discriminer les solutions 'Vivantes' (A) des solutions 'Traitées par chaleur' (D) via la l'amplitude des pics γ. En effet, on remarque que pour la concentration S1 l'amplitude γ_1 de la solution de bactéries vivantes est largement supérieure à l'amplitude γ_1 de la solution traitées par chaleur ($+16\%$ à $\lambda = 10^{-5}$, $+7\%$ à $\lambda = 10^{-4}$). On observe cette dynamique pour l'ensemble des solutions sur le tableau 4.2. Cette discrimination est également possible via le temps de relaxation τ. Celui-ci est plus pertinent parce qu'il dépend moins du choix de lambda. Pour la solution dont les positions des pics varient le moins avec λ (S1), son unique pic est positionné à $\tau_1 \sim 4,36 - 4,56\,\mu s$. Cette stabilité de la position du pic principal vis à vis du paramètre λ est valable quelque soit la concentration étudiée.

Ainsi le temps de relaxation τ du pic principal (γ maximal) permet de discriminer les solutions, que ce soit en concentration ou état. Ce temps de relaxation correspond au processus Résistif/Capacitif car il s'agit du processus électrochimique principale (section 3.3).

D'après les études préliminaires du chapitre 2 et 3, le résultat d'une DRT fine permet d'étudier l'ensemble des processus électrochimique présent dans la solution. Nous avons d'un côté les processus électrochimique classique et ceux lié à la présence de bactéries. Ici, on remarque la présence de plusieurs pics sur les résultats. On remarque pour la solution S3 à $\lambda = 10^{-5}$ l'apparition de 3 pics : le principal, centré sur $2,7 \times 10^{-7}$ s ($5,9 \times 10^{5}$ kHz), lié au milieu et dont l'amplitude est la plus grande ; on a ensuite deux pics centrés sur $1,7 \times 10^{-6}$ s ($9,3 \times 10^{4}$ kHz) et $6,6 \times 10^{-6}$ s ($2,4 \times 10^{4}$ kHz). Nous pensons que le pic au temps $6,6 \times 10^{-6}$ s est dû à des artefacts de l'appareil de mesure. Le dernier pic semble quant à lui être dû à la présence de bactéries dans la solution. L'ensemble de cette analyse montre que dans ces conditions de mesure, l'analyse DRT permet de différentier l'ensemble des états et concentrations mesurés.

4.3 Mesure de solutions polluées

Cette section présente les réponses électriques de solutions bactériennes mises au contact de polluants (Ampicilline et Ivermectine). Pour ce faire nous avons appliqué le protocole défini dans la section 4.1.
Pour rappel, après la troisième centrifugation, nous divisons la solution en autant de fois que d'états à tester (vivantes, traitées par chaleur ou polluants).

Pour chaque test, il y a donc deux solutions témoins. La solution 'Vivante' (A) permettra d'avoir une réponse maximale en terme de module de l'impédance et la solution 'Traitée par chaleur' (D) (20 minutes à 90°C) une réponse minimale. Pour chaque solution testée, 3 mesures sont faites. A chaque mesure, la solution est enlevée des électrodes puis remise, suite à un nouveau prélèvement dans le tube contenant la solution. Les solutions sont conservées dans un environnement à 21°C, en attente de prélèvement. Finalement, les mesures sont répétées dans le temps, l'ensemble des solutions étant testées toutes les heures pendant 3h ($T = 0$ minutes, $T = 60$ minutes, $T = 120$ minutes, $T = 180$ minutes).

4.3.1 Pollution par l'Ampicilline

Dans cette partie, nous détaillons le protocole appliqué pour la détection de la toxicité de l'Ampicilline, résumée dans le tableau 4.4. Pour cette expérimentation, sept populations (réplicas) ont été produites en suivant le protocole présenté en début de chapitre. Chaque population (EA1 à EA7) a donc été préparée à partir d'une CFU différente. En effet, comme nous travaillons à volume fixe, il est impossible de diminuer le volume pour augmenter la concentration bactérienne. Ceci explique les variations de concentration entre les populations, dues aux aléas de la production biologique. Trois concentrations différentes d'Ampicilline ont été retenues, notées C1, C2 et C3. Chacune a permis de traiter quatre populations (sauf trois pour la concentration C2).

Populations bactériennes	Concentration bactérienne	Concentrations d'Ampicilline
EA1, EA2	$\approx 3 \times 10^7$ CFU/mL	C1 = 10 μg/mL , C3 = 100 $\mu g/mL$
EA3, EA4	$\approx 1,1 \times 10^8$ CFU/mL	C1 = 10 μg/mL , C3 = 100 μg/mL
EA5, EA6, EA7	$\approx 4 \times 10^8$ CFU/mL	C2 = 20 μg/mL

TABLEAU 4.4 – *Concentrations d'Ampicilline étudiées et populations bactériennes associées*

L'objectif est d'analyser s'il est possible de discriminer par EIS ces différentes solutions polluées des solutions témoins contenant des bactéries saines.

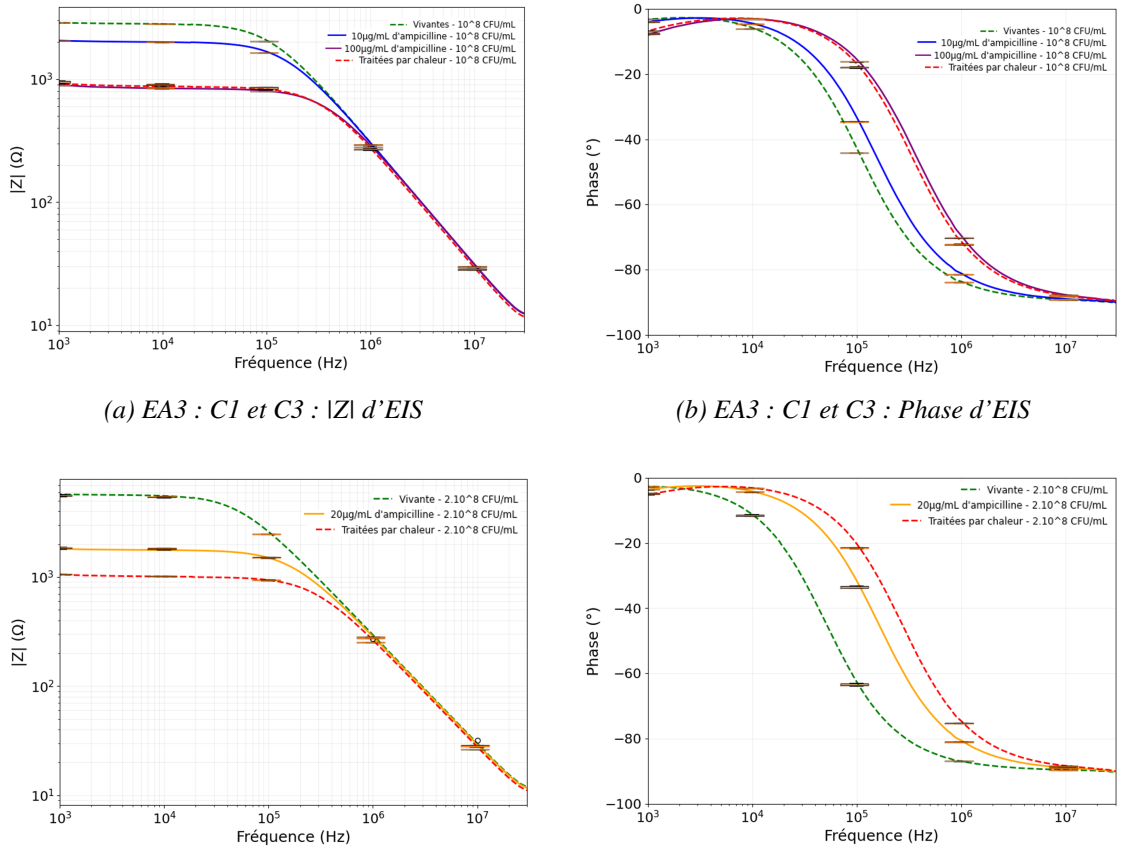
Nous avons commencé par étudier les spectres de module et de phase de l'impédance. Puis nous avons appliqué une régression non-linéaire des moindres carrés et nous avons analysé les composantes électriques. La distribution des temps de relaxation a été finalement appliquée sur ces données avec deux valeurs du paramètre λ (10^{-4} et 10^{-5}). A partir de cette analyse, les objectifs sont de déterminer la capacité de cette méthode à discriminer les populations contrôle des populations polluées puis d'étudier la réponse propre aux parois bactériennes.

4.3.1.1 Analyse par impédance et régression

Comme cela a été vu dans la section 4.2 précédente, les solutions bactériennes témoins 'vivantes' (A) et 'traitées par chaleur' (D) peuvent être différenciées en se focalisant sur le module de l'impédance entre 1kHz et 100kHz.

Nous nous attendons à ce que l'amplitude des réponses en module d'impédance des solutions bactériennes mises au contact de l'Ampicilline soit inférieure à la solution contrôle 'vivante'. L'Ampicilline a un effet avéré sur les parois cellulaires, ce qui peut engendrer une diffusion ionique plus forte que la solution de contrôle traitée par chaleur. En effet, lors du traitement par chaleur, l'intégrité des parois bactériennes est conservée avec seulement un arrêt du fonctionnement des canaux ioniques.

En dégradant les parois cellulaires, l'Ampicilline a pour effet d'induire un plus grand nombre d'éléments conducteurs dans la solution. La figure 4.5 illustre la réponse en amplitude et phase des solutions aux concentrations C1, C2, C3 par rapport aux populations EA3 et EA5 à T=0. Ces dernières ont été choisies pour leur représentativité des comportements. Les barres d'erreur illustrent la variation de trois mesures de chaque essai.



(a) EA3 : C1 et C3 : |Z| d'EIS

(b) EA3 : C1 et C3 : Phase d'EIS

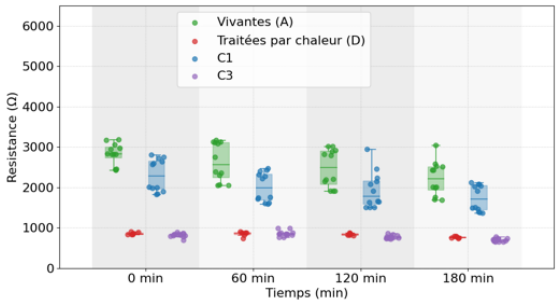
(c) EA5 : C2 : |Z| d'EIS

(d) EA5 : C2 : Phase d'EIS

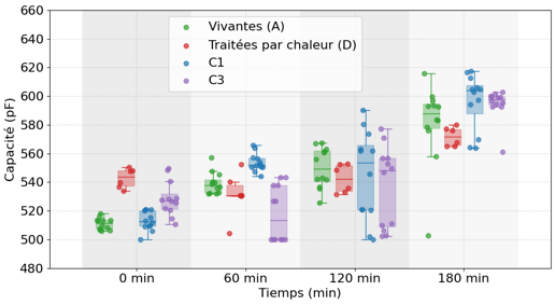
FIGURE 4.5 – *EIS des solutions bactériennes de contrôle (vivantes en vert et traitées par chaleur en rouge) pour les conditions de traitement à l'Ampicilline C1 (*$10\,\mu g/mL$*) en bleu, C2 (*$20\,\mu g/mL$*) en jaune et C3 (*$100\,\mu g/mL$*) en violet.*

On distingue clairement un comportement électrique RC prépondérant et classique du fait de l'allure typique du module et de la phase. A l'image d'un filtre passe bas du premier ordre, le module est stable jusqu'à une fréquence de coupure puis chute de manière continue ; la phase quand à elle passe de 0 à -90°. La discrimination des comportements est évidente sur le plateau du module de l'impédance. On remarque que plus la concentration en polluant est forte, plus l'impédance se rapproche de celle de la solution contrôle traitée par chaleur. Ce comportement est cohérent avec une diffusion ionique, due à l'arrêt partiel des canaux ioniques des bactéries. Ces observations correspondent à un changement lié aux propriétés aqueuses du milieu. Ainsi, l'augmentation de la conductivité et la diminution de l'impédance, observable sur la plage $1\,kHz - 10\,kHz$, permet une discrimination des solutions, notamment à $10\,kHz$, fréquence choisie en cohérence avec la section

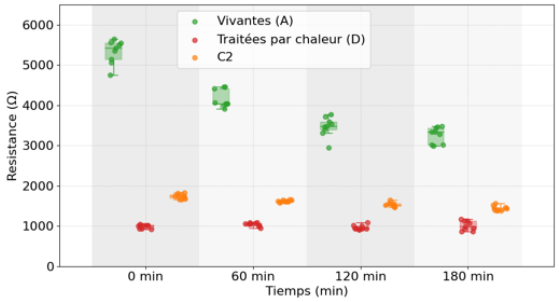
précédente. L'ensemble des données pour toutes les populations est disponible en annexe C dans le tableau C.1. Sur le graphique 4.5, les données de la population EA3 montrent une distinction nette entre la population témoin 'vivante' (A), dont le module s'élève à $|Z| = 3060 \pm 10\,\Omega$ avec une phase de $\phi = -5,92 \pm 0,2°$, tandis que la population 'traitée par chaleur' (D) présente des valeurs nettement inférieures avec $|Z| = 1448 \pm 4\,\Omega$ et $\phi = -3,44 \pm 0,01°$. Les solutions liées à aux concentrations d'Ampicilline C1 et C3 de cette même série affichent respectivement $|Z| = 2589 \pm 4\,\Omega$, $\phi = -5,16 \pm 0,04°$ et $|Z| = 838 \pm 5\,\Omega$, $\phi = -2,53 \pm 0,01°$. Concernant la population EA5, le cas (A) se distingue par une impédance plus haute de $|Z| = 5380 \pm 8\,\Omega$, $\phi = -10,86 \pm 0,14°$. Le cas (D) de EA5 se situe à $|Z| = 1024 \pm 3\,\Omega$, $\phi = -3,05 \pm 0,02°$. Enfin, le cas de la concentration en Ampicilline C2 présente un module de $|Z| = 1825 \pm 2\,\Omega$, $\phi = -4,23 \pm 0,02°$, se plaçant ainsi dans une plage de valeurs intermédiaire entre les états (A) et (D) des deux échantillons étudiés.



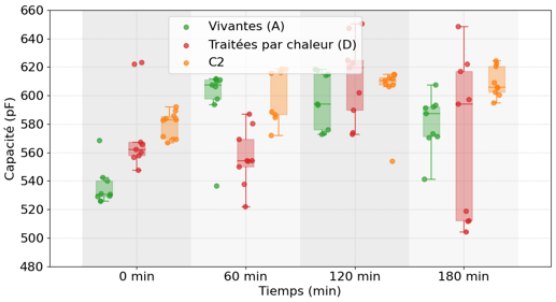
(a) Résultat de la régression du paramètre R pour C1 et C3 sur EA1 à EA4



(b) Résultat de la régression du paramètre C pour C1 et C3 sur EA1 à EA4



(c) Résultat de la régression du paramètre R pour C2 sur EA5 à EA7



(d) Résultat de la régression du paramètre C pour C2 sur EA5 à EA7

FIGURE 4.6 – *Résultat des régressions R et C pour tous les essais des solutions bactériennes de contrôle (vivantes et traitées par chaleur) et les concentrations d'Ampicilline C1 (*$10\,\mu g/mL$*), C2 (*$20\,\mu g/mL$*) et C3 (*$100\,\mu g/mL$*).*

La figure 4.6 regroupe les résistances et capacités R et C issus d'une régression non-linéaire sur l'impédance entre 10 kHz et 30 MHz pour toutes les mesures. Les graphiques sont triés par populations soumises aux mêmes concentrations (C1 et C3 sur EA1 à EA4 et C2 sur EA5 à EA7). Les variations statistiques sont également affichées, illustrant la variabilité entre plusieurs CFU d'une même souche bactérienne.

La boîte centrale encadre le premier et le troisième quartile, matérialisant ainsi la zone où se concentrent 50% des échantillons autour de la médiane. Les moustaches s'étendent ici jusqu'à 1,5 fois l'espace interquartile, permettant de visualiser la dispersion des données tout en isolant statistiquement les éventuelles valeurs atypiques. Les variabilités entre les populations EA1 à EA4 sont bien plus grandes sur la valeur de la résistance R qu'entre EA5 à EA7. Ceci pourrait être attribué au fait que les concentrations bactériennes du groupe de population EA1 à EA4 sont bien plus différentes que celles du groupe EA5 à EA7. En effet, une plus faible concentration bactérienne

induit une plus grande valeur de résistance et, avec des incertitudes relatives égales, on obtient ainsi une plus grande variabilité. Les tableaux C.2, C.3, C.4 et C.5 ainsi que les figures C.1 et C.2 placés en annexe C regroupent les valeurs de R et C issues de cette même régression. Les valeurs de ces tableaux correspondent à la moyenne des mesures par population.

Nous pouvons remarquer que quelque soit la population considérée, le suivi de la résistance R par population, ou globalement sur l'ensemble des populations permet de discriminer les solutions bactériennes de contrôle 'vivantes' de celles 'traitées par la chaleur' ou par un polluant. Ainsi à $T = 0$ on remarque pour les populations EA1 à EA4 que la résistance de la solution 'vivante' vaut $R_A = 2,8 \pm 0,1$ kΩ contre $R_D = 874 \pm 30$ Ω pour la solution 'traitées par chaleur'. Pour les échantillons de contrôle vivants, les valeurs de résistance tendent à diminuer progressivement avec le temps. Par exemple, la moyenne obtenue pour les populations EA1 à EA4 passe de $2,8 \pm 0,1$ kΩ à $T = 0$ à $2,15 \pm 0,3$ kΩ à T=180 min. Ceci est cohérent avec une diffusion ionique régie par les lois de Fick entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule causée par un milieu faiblement conducteur sans entraîner d'effet délétère sur les parois [261]. Ces mesures nous permettent ainsi de comprendre les effets sur le long terme de la mise en suspension de bactéries dans un milieu faiblement conducteur.

En ce qui concerne les témoins traités par chaleur, les valeurs de résistance restent stables dans le temps et sont significativement inférieures ($R_D = 810 \pm 30\,\Omega$ à $T = 180$), traduisant l'absence de métabolisme et une membrane dégradée.

On observe également une diminution significative de la résistance R dans le temps pour les solutions bactériennes soumises aux concentrations d'Ampicilline C1 et C2 : $R_{C1/T0} = 2,300 \pm 0,1$ kΩ contre $R_{C1/T180} = 1,740 \pm 0,1$ kΩ et $R_{C2/T0} = 1,730 \pm 0,1$ kΩ contre $R_{C2/T180} = 1,440 \pm 0,1$ kΩ.
Ceci s'explique par le fait que les populations de bactéries vivantes ou en cours de traitement, sont contraintes de diffuser des ions au sein du milieu faiblement ionisé (EDI) au fil du temps . Pour les solutions en contact avec le polluant, ce dernier continue d'agir au cours du temps et amplifie la diffusion ionique. Par ailleurs, on remarque un effet immédiat de l'Ampicilline sur les bactéries. Les mesures nous fournissent donc plusieurs informations croisées. Premièrement, l'Ampicilline agit rapidement sur des concentrations supérieures à la $\mathrm{MIC}_{24\mathrm{h}}$ ($4\,\mu\mathrm{g/mL}$). Cet effet peut s'observer comme une diffusion partielle (conditions C1 et C2) ou une libération totale des ions contenus dans les bactéries (condition C3, concentration en polluant la plus forte). De plus, la résistance R peut passer en dessous de la valeur de R pour les contrôles 'traitées par chaleur', comme c'est le cas pour la concentration C3 après 2h de contact ($R_{C3/T180} = 773 \pm 0,1\,\Omega$) indiquant que l'ensemble des bactéries de la solution est affecté par le polluant. Ces mesures nous permettent ainsi de comprendre les effets dans le temps de la mise en suspension de bactéries dans un milieu faiblement conducteur avec ce polluant.

Nous allons maintenant centrer notre analyse sur la capacité C issue de la régression. Elle s'appuiera sur les données en annexe C ainsi que sur les données présentées sur la figure 4.6. À $T = 0$ minutes, les quatre solutions (EA1-EA4) affichent toutes des capacités C moyennes comprises entre $5,0$ et $5,6 \times 10^{-10}$ F. Pour la population EA1, les plus grandes capacités obtenues sont pour les solutions traitées par chaleur, suivies par les solutions C3 fortement concentrées en Ampicilline. Enfin les solutions vivantes et faiblement concentrées C1 sont approximativement similaires et présentent des capacités inférieures à C3. La solution traitée par chaleur atteint une capacité de $5,57 \times 10^{-10}$ F alors que celle traitée avec une faible concentration C1 reste à une valeur de $5,05 \times 10^{-10}$ F, soit un écart d'à peine 10%. Cette différence est également observée pour les autres populations EA2, EA3 et EA4. Dans le cas présenté en figure 4.6, la régression calculée avec un unique couple RC traite le problème comme étant uniquement lié à l'effet résistif-capacitif de la solution globale. Cependant, comme nous l'avons vu, l'EIS agrège plusieurs phénomènes comme l'effet résistif-capacitif, la diffusion ionique et la polarisation interfaciale. Bien que les

composantes de chacun de ces processus puissent être de faible intensité compte tenu de leur dépendance en fréquence, ces influences peuvent être suffisamment importantes pour perdre le caractère discriminant de la valeur de C extraite par ce biais.

Dans le cas des populations EA5-EA7, les valeurs de capacités extraites par régression sont plus élevées, allant de 520 à 640 pF. Ceci peut s'expliquer par la différence de concentration bactérienne entre les expérimentations (EA1-EA4) et (EA5-EA7).

Pour la population EA6, on retrouve la même tendance sur les valeurs de capacités que celle décrite précédemment. Pour les populations EA5 et EA7, on observe la même dynamique entre vivantes et traitées par chaleur, sauf que les solutions contaminées par une concentration d'Ampicilline C2 présentent une capacité confondue ou plus haute (en valeur absolue) que les solutions traitées par chaleur. La possibilité d'une discrimination par la valeur de la capacité ne semble donc pas concluante.

En dynamique temporelle, sur EA1 à EA4 l'ensemble des capacités suit une hausse générale allant de 10% pour les solutions traitées par chaleur à 20% pour les populations vivantes. Le deuxième jeu de populations (EA5 à EA7) montre un scénario temporel différent. Les solutions vivantes vont atteindre une variation de 20% dès 1 heure puis stagner dans le temps. Cette dynamique est également observée pour les solutions polluées par une concentration d'Ampicilline C2.

Ainsi, on retrouve une variation plus forte sur la période d'observation (T0 à T180) pour des populations vivantes et faiblement contaminées que pour les populations plus stables comme le témoin traité par chaleur. En somme, la capacité initiale reflète l'influence de plusieurs processus avec une valeur plancher dépendante du milieu, tandis que la cinétique révèle la libération intracellulaire des ions, expliquant potentiellement l'écart systématique entre les populations de bactéries traitées par chaleur et les vivantes.

La résistance et la capacité d'une solution peuvent également être interprétées sous l'angle d' un temps caractéristique $\tau = \text{RC}$. Les temps de relaxation (τ) extraits de la figure 4.6 vont de $0,4\,\mu$s à $27\,\mu$s. Les variations sont faibles ($\pm 0,5\,\mu$s), traduisant une influence modérée de l'état cellulaire sur la dynamique capacitive dans un milieu très faiblement conducteur. L'ensemble des valeurs reste dans une bande étroite, ce qui semble confirmer l'hypothèse que la valeur de RC est principalement liée aux propriétés du milieu en fixant le seuil plancher de la capacité autour de la centaine de pF. Ceci indiquerait donc que la signature temporelle dépend davantage du milieu aqueux que de l'intégrité bactérienne.

Les variations de capacité C à $T = 0$ minutes indiquent une capacité plus faible des solutions vivantes que des solutions traitées par polluant, à leur tour plus faibles que celle des solutions traitées par chaleur. Ceci ne semble pas cohérent vis à vis de la capacité des bactéries vivantes qui sont censées conserver leurs charges. Cependant, si la capacité qu'on extrait est avant tout une image globale du milieu, il semble judicieux de penser que les charges stockées par les bactéries n'influent pas la valeur de RC.

En synthèse, la pollution induit avant tout une transition résistive suivie d'une adaptation capacitive. La libération des charges par les bactéries vient augmenter la conductivité de la solution ce qui se voit à travers l'effet résistif-capacitf des solutions. L'analyse dans le temps semble montrer une évolution du nombre de charges dans la solution via la capacité C.

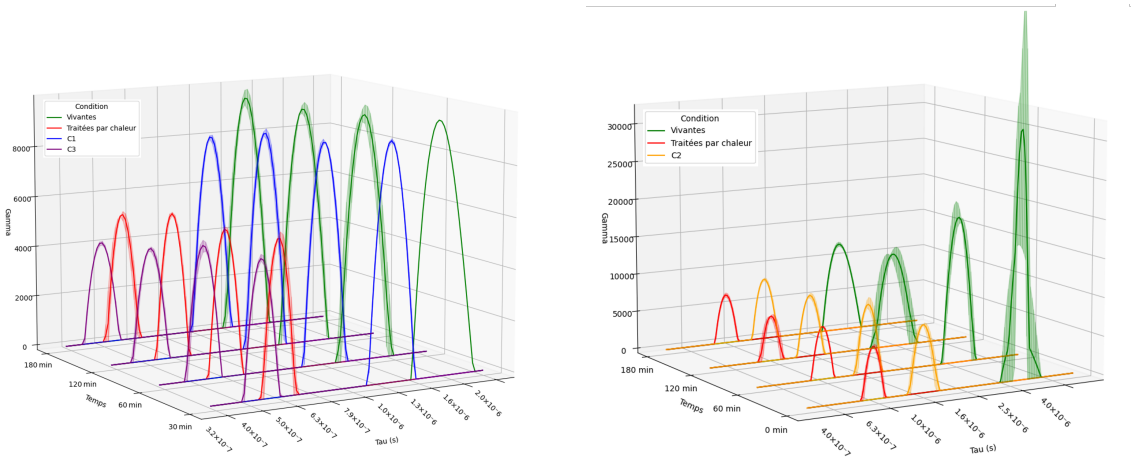
Une dernière analyse a été effectuée sur les données d'impédance. Nous avons cherché à détecter les variations locales de dérivée du signal de phase. L'objectif était de détecter l'influence des parois bactérienne sur le signal qui crée théoriquement un épaulement sur la courbe de phase, comme nous avons pu l'illustrer dans le chapitre 3 sur la figure 3.12. Ce traitement de données n'a pas abouti à des résultats significatifs. Nous avons donc cherché à mettre en évidence la contribution des parois bactériennes au signal de phase par une autre méthode. Pour cela, nous avons comparé la la dérivée du signal de phase expérimental avec celle du circuit RC pur (dont les valeurs R et C sont issues de la régression du signal d'impédance). Cette méthode n'a malheureusement

pas permis de mettre en évidence l'influence de la polarisation des bactéries au sein du signal de phase.

Ces résultats confortent cependant d'ores et déjà la capacité du protocole à discriminer l'effet de l'Ampicilline et, dans une certaine mesure, à apprécier son impact relativement aux témoins (solutions vivantes et traitées par chaleur). Cette discrimination s'appuie principalement sur les variations de conductivité du milieu captées par les mesures d'impédance, directement liées à la viabilité bactérienne.

4.3.1.2 Analyse par la méthode DRT

Cette section est dédiée à l'étude des données d'impédance traitées par l'algorithme de la DRT. Comme cela a été précisé dans le chapitre précédent, ces analyses devraient a minima permettre une discrimination entre les solutions contrôle et les solutions polluées. Bien que la concentration bactérienne soit faible par rapport aux concentrations simulées au chapitre 3 (10^{10} CFU/mL), la DRT devrait pouvoir permettre d'observer la réponse directe des bactéries. Il s'agira d'une réponse non plus reliée aux ions relargués par les bactéries mais reliée aux structures bactériennes. Cette réponse devrait être conditionnée par la sensibilité de l'algorithme via le paramètre λ. Dans un premier temps, nous avons fixé $\lambda = 10^{-4}$. Ceci nous a permis d'identifier la signature du milieu en ne faisant ressortir que son pic caractéristique. La figure 4.7 montre les variations du pic de la DRT lié au milieu aqueux de la population EA3 pour les concentrations en Ampicilline C1 et C3 via le graphique 4.7a et de la population EA7 pour la concentration C2 via le graphique 4.7b.



(a) Représentation des temps de distribution pour les solutions de concentration en Ampicilline C1 et C3

(b) Représentation des temps de distribution pour la solution de concentration en Ampicilline C2

FIGURE 4.7 – *Résultat d'analyse de la DRT sur les concentrations C1,C2 et C3 d'Ampicilline.*

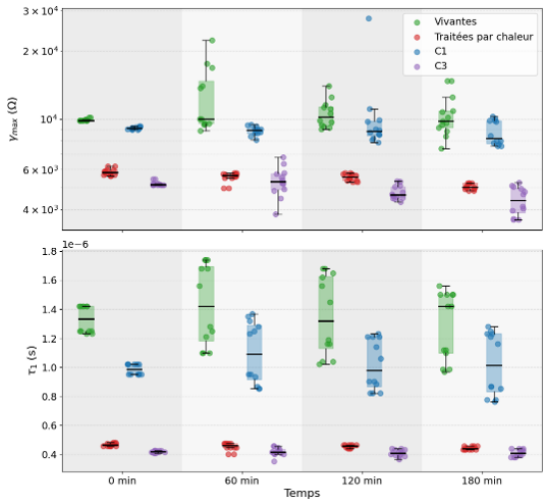
Sur ces graphiques, on peut observer l'évolution dans le temps des analyses DRT faites sur les données d'EIS précédemment utilisées. Premièrement, on remarque la possibilité de différencier des solutions dès l'injection du polluant et ce pour toutes les concentrations d'Ampicilline testées. La solution de concentration C3 montre un pic à $\tau = 5 \times 10^{-7}$ s contre $\tau = 6 \times 10^{-7}$ s pour la solution traitée par chaleur dès $T = 0$ minutes comme c'était déjà le cas lors de l'analyse des résistance et capacité R et C. On observe donc le même phénomène, probablement liée à la rupture des parois cellulaires.
La figure 4.8 représente les amplitudes γ (en haut) et les temps de distribution associés (en bas)

pour $\lambda = 10^{-4}$ obtenus sur l'ensemble des populations. Plus précisément, le graphique 4.8a montre les résultats pour les populations EA1 à EA4, et de manière analogue, 4.8b pour les populations de EA5 à EA7.

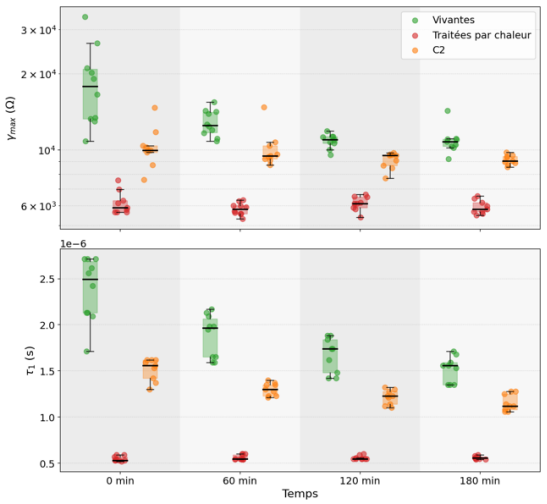
On remarque sur ces tracés une dispersion des valeurs de γ bien plus marquée pour les solutions vivantes que pour les solutions traitées ou contaminées. Ce constat est cohérent avec la variabilité des résistances R observée précédemment sur ces mêmes populations témoins. Sur l'ensemble des populations testées, la moyenne des valeurs d'amplitude γ permet de différencier clairement chaque solution comme cela est bien également illustré sur la figure 4.7.

Concernant l'évolution temporelle, les amplitudes γ et les temps de relaxation montrent une stabilité relative, particulièrement pour les populations EA1 à EA4. Ceci est probablement lié à la variation des concentration bactérienne différente entre EA1/EA2 et EA3/EA4 En revanche, pour les populations (EA5 à EA7), que ce soit les temps de relaxation ou l'amplitude de γ on remarque une évolution avec une diminution de τ de l'ordre de 30% sur la durée de l'expérience.

Sur l'ensemble des graphiques 4.8a et 4.8b, on parvient toutefois à distinguer nettement les valeurs de γ et τ selon le type de solution, quel que soit le moment d'observation. Cette analyse est cohérence avec les variations identifiées par l'étude des signaux d'impédance. Ceci montrant une signature fréquentielle propre à chaque état biologique par la réponse du milieu.



(a) concentration en Ampicilline C1 et C3 : Distribution de γ et de τ ; population EA1 à EA4



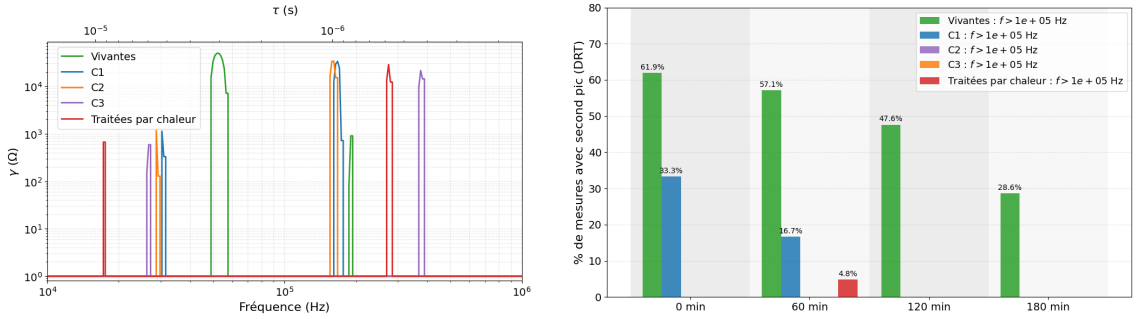
(b) concentration en Ampicilline C2 : Distribution de γ et de τ ; population EA5 à EA7

FIGURE 4.8 – *Distribution des temps de relaxation (τ) et des amplitudes (γ) pour les concentrations en Ampicilline C1, C2 et C3.*

Dans un second temps nous avons fixé $\lambda = 10^{-5}$. Rappelons que ce réglage rend la DRT plus sensible au bruit. La figure 4.9a illustre la répartition en fréquences ($f = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{1}{2\pi\tau}$) des résultats de DRT sur des données expérimentales. L'intérêt de cette lecture en fréquences est de pouvoir faire un lien avec la spectrométrie d'impédance classique. Pour cette dernière nous avons sélectionné une mesure exemple pour chaque cas à T=0.
On remarque l'apparition de plusieurs pics situés dans différentes zones du graphique. Premièrement, les pics les plus hauts sur l'échelle d'amplitude γ montrent la contribution principale aux données d'impédance, soit celle du milieu aqueux. Étant donnée que la réponse électrique est due principalement aux propriétés diélectriques du milieu aqueux, c'est en effet ce phénomène qui est apparaît avec la plus grande amplitude de γ. Deuxièmement, le calcul par DRT fait ressortir deux zones d'artefact numérique liées aux conditions aux limites appliquées au traitement de données. Ces artefacts ne sont pas représentés sur la figure 4.9a que nous avons centré sur la zone d'intérêt. Troisièmement, il ressort un lot de pics artefact aux alentours de $2-5\times10^4$ Hz commun aux dif-

férentes courbes. Ces pics sont dûs à l'appareil de mesure et à la façon dont l'acquisition est faite. Nous avons en effet constaté un offset numérique systématiquement présent à cette fréquence dans tous les spectres d'impédance enregistrés.

Finalement, il reste un pic observé pour la solution vivante dans la gamme de fréquence 10^5 à 10^6 Hz. Ce dernier semble être directement lié à la présence des bactéries vivantes car il se situe dans la dispersion β où l'on s'attend à observer leur influence. L'histogramme 4.9b montre la fréquence d'apparition de ce dernier pic sur l'ensemble des mesures réalisées sur toutes les populations bactériennes. La comparaison des différentes solutions permet de confirmer que ce deuxième pic est bien lié à la présence de bactéries vivantes. Il n'est en effet observé que sur les solutions 'vivante' ou à faible concentration en Ampicilline C1 sur la première heure. Il n'apparaît pas pour les concentrations plus élevées. Pour le cas de la solution traitée par chaleur, son apparition à faible fréquence (moins de 5%) est vraisemblablement due à une erreur de mesure ou à du bruit. Ce résultat peut s'expliquer par deux facteurs. Premièrement, l'effet de l'Ampicilline est assez rapide sur les populations bactériennes. L'absence de ce pic pour ces solutions indiquerait une détérioration des parois, changeant la structure cellulaire et donc la réponse qui lui est liée. De plus, on remarque qu'au bout de trois heures, seulement 30% des solutions de contrôle vivantes possèdent encore ce pic. En effet, il est possible qu'une concentration de bactérie trop faible implique l'absence de ce pic. Cette méthode d'analyse pourrait donc permettre une future discrimination plus fine de la cinétique d'effet du polluant.



(a) Exemple de distribution des temps de relaxation en fonction de la fréquence

(b) Apparition du deuxième temps de relaxation

FIGURE 4.9 – *Distribution des temps de relaxation en fonction de la fréquence et taux d'apparition du deuxième temps de relaxation pour l'expérimentation Ampicilline pour* $\lambda = 10^{-5}$

4.3.2 Pollution par l'Ivermectine

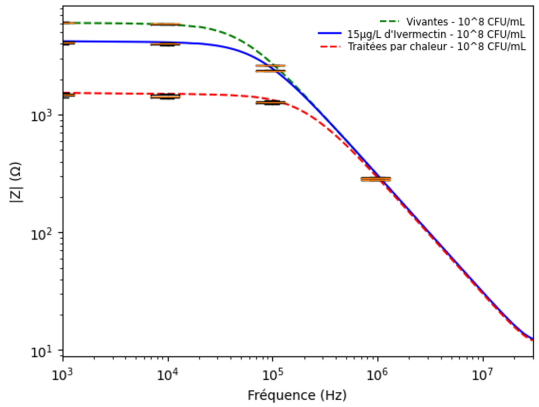
Dans cette sous-section nous détaillons les résultats des expérimentations sur des populations bactériennes au contact de l'Ivermectine. Le protocole, explicité en introduction de cette section, est le même que pour l'Ampicilline. Six populations ont été analysées pour deux concentrations d'Ivermectine différentes. Ces concentrations ont été choisies en deçà et au delà de la $MIC_{24h} = 40\,\mu g/L$. Le tableau 4.5 regroupe les noms des populations de cette étude, leur concentration bactérienne et les quantités d'Ivermectine utilisées $C1 = 15\,\mu g/L$ et $C2 = 45\,\mu g/L$.

Populations bactériennes	Concentration bactérienne	Concentrations d'Ivermectine
EV1, EV2, EV3	$\approx 7 \times 10^7$ CFU/mL	C2 = 45 µg/L
EV5, EV6, EV7	$\approx 6 \times 10^8$ CFU/mL	C1 = 15 µg/L

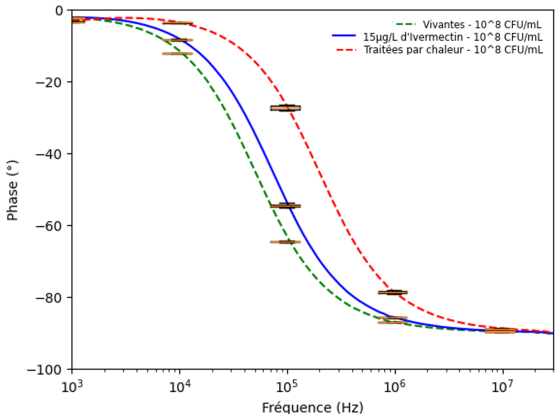
TABLEAU 4.5 – *Concentrations d'Ivermectine étudiées et populations bactériennes associées*

4.3.2.1 Analyse par impédance et régression

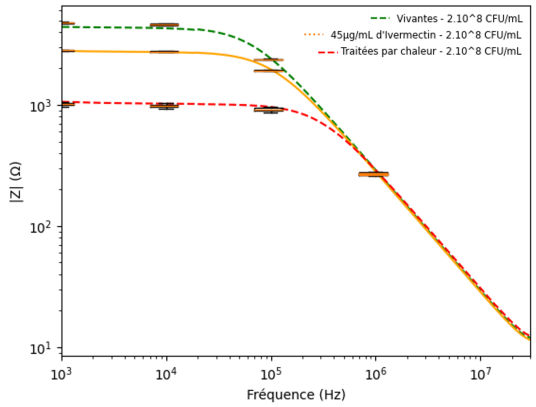
Dans un premier temps, nous proposons d'observer la réponse impédancemétrique des solutions contaminées par le polluant en comparaison avec les solutions contrôle 'Vivantes' et 'Traitées par chaleur'. Comme cela a été vu dans les sections précédentes, les solutions bactériennes témoins peuvent être différenciées en se focalisant sur le module de l'impédance entre 1 kHz et 100 kHz. L'Ivermectine n'a pas d'effet spécifique avéré sur les bactéries. Ainsi, l'étude de l'impact d'un polluant ne visant pas particulièrement les parois cellulaires rend ce type d'expérimentation générique. Les graphiques sur la figure 4.10 illustrent la réponse en module et phase des concentrations choisies d'Ivermectine C1 et C2 après mise en contact (T=0). Les populations EV1 et EV5, sont ici choisies pour la représentativité de leurs comportements. Les barres d'erreur illustrent la variabilité de trois mesures.



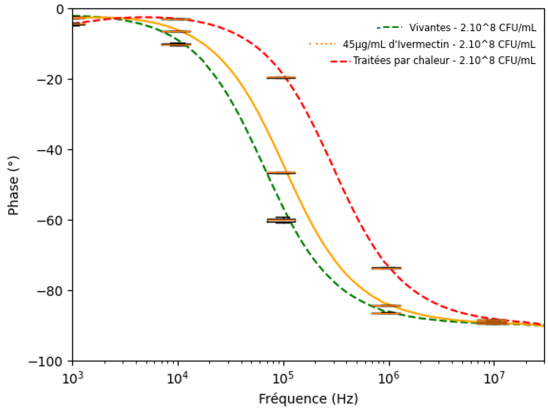
(a) concentration C1 : |Z| d'EIS



(b) concentration C1 : Phase d'EIS



(c) concentration C2 : |Z| d'EIS



(d) concentration C2 : Phase d'EIS

FIGURE 4.10 – *EIS des solutions bactériennes de contrôle (vivantes et traitées par chaleur) pour les conditions de traitement à l'Ivermectine avec les concentrations C1 (*$15\,\mu g/L$*) et C2 (*$45\,\mu g/L$*).*

Sur ces graphiques on remarque clairement qu'un plateau d'impédance est toujours présent entre 1 KHz et 100 KHz. Sur ce plateau, il est possible de discriminer les concentrations polluées des contrôles par la valeur du module de l'impédance. De plus, l'ensemble des valeurs sont comprises entre les valeurs obtenues pour le contrôle, ce qui montre la pertinence de ce protocole.

Les données présentées ci-dessous correspondent aux valeurs extraites à 10 KHz sur les graphiques de la série liée à l'Ivermectine de la figure 4.10, correspondant aux populations EV1 et EV5 à T=0. On peut observer une distinction nette entre les populations 'Vivantes' (A), dont le module s'élève respectivement à $|Z|_{A-EV1} = 4410 \pm 120\,\Omega$ et $|Z|_{A-EV5} = 5840 \pm 130\,\Omega$ avec une

phase de $\phi_{A-EV1} = -6,0 \pm 0,1°$ et $\phi_{A-EV5} = -11,2 \pm 0,3°$, et les populations 'Traitée par chaleur' (D) qui présentent des valeurs plus basses de $|Z|_{D-EV1} = 1030 \pm 10\,\Omega$ et $|Z|_{D-EV5} = 1440 \pm 70\,\Omega$ avec une phase de $\phi_{D-EV1} = -2,8 \pm 0,1°$ et $\phi_{D-EV5} = -3,4 \pm 0,1°$. Les solutions polluées aux concentrations C1 et C2 pour ces populations montrent des valeurs qui sont bien comprises entre les valeurs de contrôle avec un module de $|Z|_{C1-EV5} = 4000 \pm 110\,\Omega$ et $|Z|_{C2-EV1} = 2730 \pm 10\,\Omega$ et une phase de $\phi_{C1-EV5} = -7,9 \pm 0,2°$ et $\phi_{C2-EV1} = -6,0 \pm 0,1°$.

La figure 4.11 présente les valeurs de résistance R et capacité C issues d'une régression non-linéaire sur l'impédance sur les mêmes plages de fréquences que pour les solutions polluées à l'Ampicilline. Les variations statistiques sont également affichées, illustrant la variabilité entre les souches d'une même espèce bactériennec pour l'ensemble des populations utilisées.

Les tableaux D.2, D.3, D.4 et D.5 ainsi que la figure D.1 en annexe D regroupent le détail des valeurs de résistance et capacité R et C issues de cette même régression par population. Les paramètres suivant correspondent à la moyenne de mesures sur l'ensemble des populations. Ainsi, nous pouvons étudier l'ensemble des populations dans le temps avec ces quatre jeux de mesures pris à une heure d'intervalle.

Nous pouvons remarquer que l'étude de la résistance R, que ce soit par population ou globalement sur l'ensemble des populations, permet de discriminer les solutions bactériennes vivantes de celles traitées, que ce soit par chaleur ou que ce soit par polluant.

En effet sur l'ensemble des populations étudiées à T=0, on remarque que $R_{A/T0} = 5 \pm 0,4\,\text{k}\Omega$, $R_{C1/T0} = 3,9 \pm 0,3\,\text{k}\Omega$, $R_{C2/T0} = 2,7 \pm 0,2\,\text{k}\Omega$ et $R_{D/T0} = 1,28 \pm 0,1\,\text{k}\Omega$.

On remarque également une diminution de la résistance R dans le temps pour la population de contrôle vivante ainsi que pour les conditions C1 et C2. On a donc pour T=180 : $R_{A/T180} = 3 \pm 0,1\,\text{k}\Omega$, $R_{C1/T180} = 2,7 \pm 0,1\,\text{k}\Omega$, $R_{C2/T180} = 1,9 \pm 0,1\,\text{k}\Omega$ et $R_{D/T180} = 1,16 \pm 0,01\,\text{k}\Omega$. Ces résultats suivent la même tendance que les observations sur l'Ampicilline dans la sous-section précédente. Les mesures dans le temps nous permettent d'entrevoir deux effets. Premièrement, l'impact de la mise en suspension de bactéries dans un milieu faiblement conducteur, où par diffusion de Fick, il va y avoir un relarguage d'ions dans le milieu et donc une baisse de la résistivité. Deuxièmement une image de la vitesse d'action du polluant avec la détérioration des parois bactériennes qui amplifie la baisse de la résistivité.

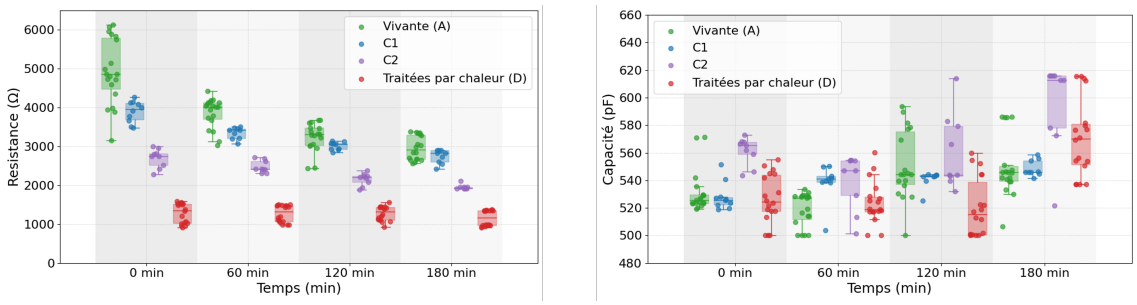


FIGURE 4.11 – *Résultat des régressions effectuées pour R et C sur les spectres d'impédance des solutions bactériennes de contrôle (Vivantes et traitées par chaleur) et traitées à l'Ivermectine (aux concentrations C1 (*15µg/L*) et C2 (*45µg/L*)).*

L'étude de la capacité C présente sur la figure 4.11, extraite par régression à partir des données de l'annexe C, révèle une faible dynamique initiale. À T=0, l'ensemble des populations étudiées (EV1 à EV7) affiche des capacités équivalentes comprises dans un intervalle étroit entre 500 et 610 pF. Contrairement à la résistance, la capacité ne permet pas de discriminer systématiquement les états physiologiques. A l'échelle d'un groupement de populations (EV1 à EV3), les valeurs pour des témoins vivants et traités par chaleur sont souvent confondues ou présentent des inversions de tendance inexplicables théoriquement par un raisonnement basé sur une approche uniquement biologique.

En dynamique temporelle, bien qu'une tendance générale à l'augmentation de la capacité soit visible sur l'ensemble des solutions de manière similaire aux observations effectuées sous pollution d'Ampicilline, ces variations ne sont pas très significatives. L'évolution observée pour le cas traité par chaleur (D), censé être stable, ainsi que les fortes incertitudes (σ) issues de la régression, suggèrent que ces fluctuations traduisent davantage une augmentation globale de la charge ionique du milieu qu'une modification propre aux structures membranaires. En somme, cette étude vient confirmer les conclusions de celle menée avec l'Ampicilline. La valeur de la capacité C extraite par ce modèle à un seul couple RC ne constitue pas un indicateur robuste pour la discrimination des solutions bactériennes dans ces conditions expérimentales.

Les temps de relaxation (τ) calculés à partir du couple RC vont de $0,5\,\mu$s à $32\,\mu$s. Les variations sont faibles ($\pm\mu$s) à l'échelle de la plage observée, traduisant une influence modérée de l'état cellulaire sur la dynamique capacitive dans un milieu très faiblement conducteur. L'ensemble reste dans une bande étroite, ce qui confirme que la signature temporelle dépend davantage du milieu aqueux que de l'intégrité bactérienne. Du point de vue statistique et de manière analogue aux observations faites sur l'Ampicilline, la dispersion inter-lot reste inférieure à 5% pour toutes les mesures, garantissant que les tendances décrites excèdent largement l'erreur de mesure.
La présence systématique de coefficients de détermination $r^2_{\text{phase}} > 0,99$ et $r^2_{\text{amplitude}} > 0,99$ démontre que les variations de phase accompagnent fidèlement les changements de module, validant l'hypothèse que le circuit équivalent RC parallèle demeure pertinent.

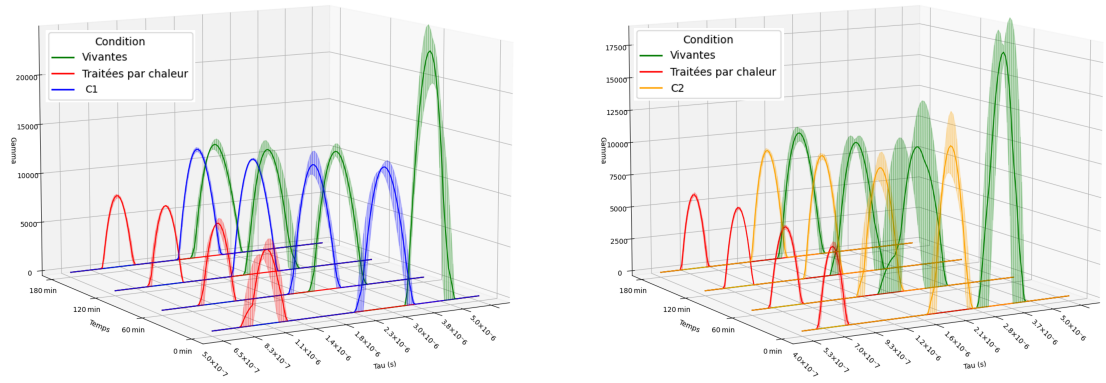
Finalement, on peut conclure de ces résultats que la pollution induit avant tout une variation résistive notable suivie d'une adaptation capacitive qui reste trop faible pour être interprétables sur les mesures présentées.
Ces conclusions montrent néanmoins que ce protocole est un bon indicateur de la viabilité cellulaire car c'est la composante ionique qui dicte, in fine, la réponse du système.

4.3.2.2 Analyse par la méthode DRT

Cette section est dédiée aux données d'impédance traitées par l'algorithme de la DRT sur les solutions liées à l'expérimentation de l'Ivermectine. Comme cela a été montré dans la section dédiée aux mesures de l'Ampicilline, ces analyses devraient a minima permettre une discrimination entre les solutions contrôle et les solutions polluées.

En théorie, la DRT devrait pouvoir permettre d'observer non seulement la réponse liée aux ions mais aussi celle liée aux structures bactériennes. Cette réponse doit être conditionnée à la sensibilité de l'algorithme via le paramètre λ. Comme pour l'expérimentation sur l'Ampicilline, dans un premier temps nous avons fixé $\lambda = 10^{-4}$. La figure 4.12 montre les variations des pics de la DRT liés au milieu aqueux de la population EV1 pour les contrôles et la concentration C2 via le graphique 4.12a et de la population EV5 pour les contrôles et la concentration C1 sur le graphique 4.12b.

Sur ces deux graphiques, on peut observer l'évolution au fil du temps des analyses par DRT pour les données d'EIS des solutions traitées à l'Ivermectine. Premièrement, évaluer l'évolution dans le temps est un indicateur de la qualité des mesures. On remarque ainsi une baisse continue des amplitudes et des temps de relaxation associés aux pics principaux. Deuxièmement, on observe qu'on a toujours la possibilité de discriminer les solutions, quelque soit leur nature et quelque soit le temps d'observation.
La figure 4.13 représente les temps de relaxation et les amplitudes γ associées à $\lambda = 10^{-4}$ pour l'ensemble des populations testées. Sur les deux graphiques 4.13a et 4.13b analysant les populations EV5 à EV7 et EV1 à EV3, on remarque une plus grande dispersion des valeurs de γ pour les solutions vivantes que pour les autres solutions. Ce résultat est cohérent avec les observations sur la résistance R menées sur la figure 4.11. On peut également observer sur la figure 4.13 que la



(a) Représentation des temps de relaxation pour la solution C1

(b) Représentation des temps de relaxation pour la solution C2

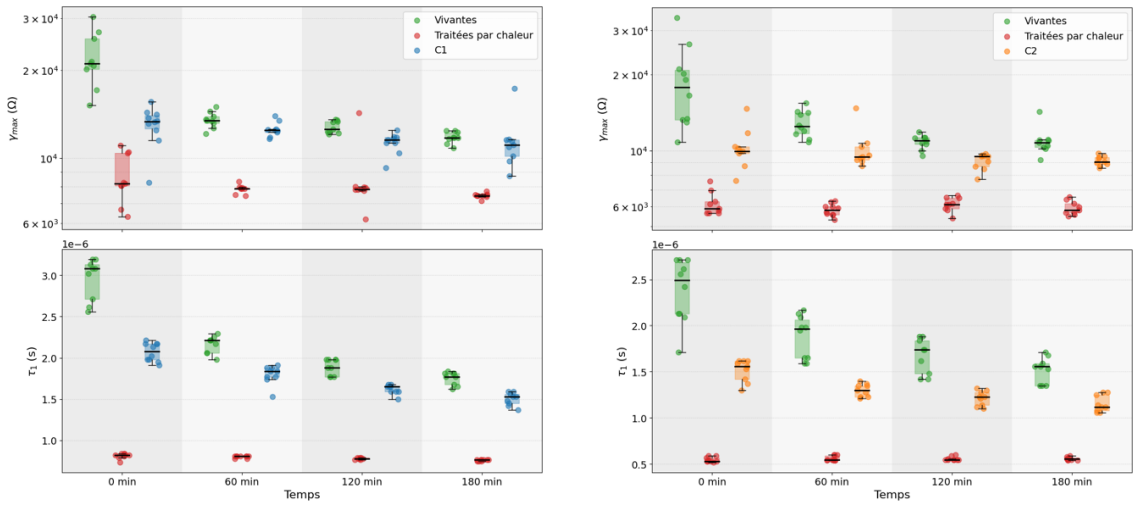
FIGURE 4.12 – *Résultat d'analyse de la DRT sur les concentrations C1 et C2 d'Ivermectine.*

moyenne des valeurs de γ permet toujours de différencier chaque solution. On remarque une dynamique de réduction de la valeur de γ dans le temps pour toutes les solutions sauf celles traitées par chaleur. Ces résultats sont cohérents avec la dynamique précédemment observée. En effet, on observe pour les bactéries saines une diffusion des ions présents dans les cellules par loi de Flick. Le traitement subi par les bactéries augmente la dynamique de ce phénomène.

Concernant les solutions contrôle traitées par chaleur, que ce soit pour l'amplitude γ ou le temps de relaxation τ on remarque également que les valeurs restent stables et n'évoluent pas en fonction du temps. Sur les deux graphiques 4.13a et 4.13b on note les mêmes tendances. Ainsi, une discrimination efficace des solutions à l'aide des paramètres γ et τ est possible quel que soit le moment d'observation choisi car le témoins 'traitées par chaleur' évolue peu dans le temps. Pour les autres état, on observe bien une variation dans le temps des paramètres montrant les mêmes performances que l'analyse directe ou indirecte des signaux d'impédance.

D'un point de vue général, sur les deux manipulations (Ampicilline et Ivermectine) pour $\lambda = 10^{-4}$ on remarque une signature spécifique des populations traitées par chaleur avec un temps de relaxation τ inférieur à 10^{-6} s. Ainsi la DRT pourrait être à l'origine d'une homogénéisation des populations étudiées par cette méthode. Etant donnée que cette méthode permet de différencier les processus électrochimiques, il semble possible de l'utiliser de manière générique et ainsi de s'affranchir des dimensions physiques du capteur.

Dans un second temps nous avons fixé $\lambda = 10^{-5}$. Ce choix rend la DRT plus sensible aux petites variations du signal d'impédance mais aussi au bruit. La figure 4.14a illustre la répartition en fréquence des temps de relaxation issus de la DRT de façon analogue à ce qui a été présenté pour l'Ampicilline. On remarque l'apparition de plusieurs pics dans des zones spécifiques du graphe. Ces zones, commentées par la suite du paragraphe, sont les mêmes que lors des expérimentations réalisées sur l'Ampicilline. Les pics liés à des artefacts numériques (même phénomène que sur les analyses menées sur l'Ampicilline) ne sont pas représenté sur le graphique qui se concentre sur la zone d'intérêt. Les pics les plus hauts sur l'échelle d'amplitude γ montrent la contribution principale pour chaque solution aux données d'impédance, soit celle correspondant au milieu aqueux. Puis, un dernier lot de pics artefact est situé aux alentours de la bande $2-5\times10^4$ Hz. Comme dans le cas de l'Ampicilline, ces pics sont dûs à l'appareil de mesure et à la façon dont l'acquisition est faite. Troisièmement, un pic subsiste dans le cas des solutions 'vivantes' dans la gamme de fréquences comprise entre 10^5 et 10^6 Hz ($\sim 10^{-6}$ et $\sim 10^{-7}$ s), qu'on peut également observer pour les concentrations d'Ivermectine C1 et C2. Ce pic est une manifestation caractéristique de la dispersion β, discutée précédemment (voir chapitre 2), qui traduit les propriétés diélectriques de la paroi bactérienne agissant comme des condensateurs imparfaits. L'existence de ce signal témoigne



(a) C1 : Distribution de γ et de τ

(b) C2 : Distribution de γ et de τ

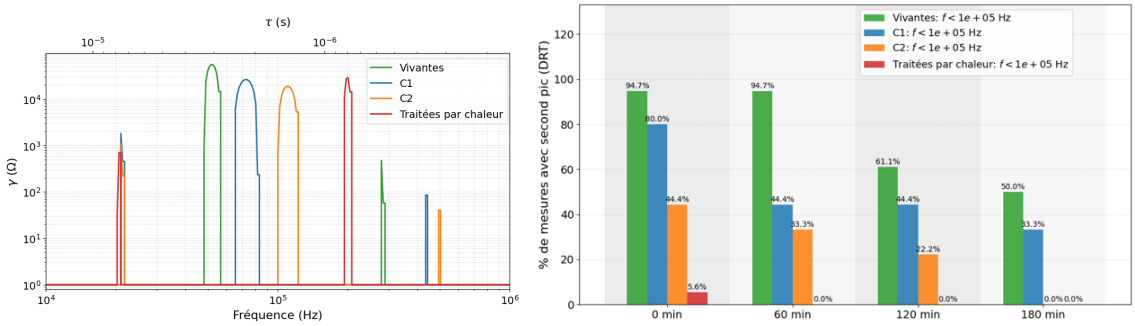
FIGURE 4.13 – *Distributions des temps de relaxation (τ) et des amplitudes (γ) pour les concentrations C1 et C2 en Ivermectine*

ainsi de la présence de structures cellulaires dont l'intégrité membranaire semble mesurable à ces fréquences.

Le graphique 4.14b montre la fréquence d'apparition de ce deuxième pic sur l'ensemble des populations bactériennes. Contrairement aux expérimentations sur l'Ampicilline, on remarque ici des fréquences d'apparition beaucoup plus importantes pour toutes les solutions sauf celles traitées par chaleur. Pour les populations de contrôle vivantes, entre 50% et 95% des solutions possèdent ce pic quelque soit le moment d'observation. Ces populations sont donc les plus propices à l'observation de ce deuxième pic, comme le faisait déjà ressortir les résultats sur l'Ampicilline. Cela est probablement dû à la variation du nombre de cellules vivantes dans les populations au cours du temps. En pratique, les expérimentations sur l'Ivermectine ont été réalisées sur des concentrations bactériennes allant de 7×10^7 à 6×10^8 CFU/mL contre 3×10^7, 1 et 4×10^8 CFU/mL dans le cas des expérimentations avec l'Ampicilline. D'après ces résultats, il semble que, si une mesure est faite sur une population bactérienne de concentration inférieure à 5×10^7 CFU/mL l'apparition de ce pic n'est pas garantie. Cette hypothèse s'appuie sur une constatation établie en isolant les analyses par DRT des populations les plus concentrées. Un lien direct avec l'apparition de ce pic a alors pu être établi avec une probabilité d'apparition de 96 %. Ce pourcentage ayant été établi sur la moyenne de 20 mesures, l'hypothèse avancée nous semble probable.

De plus, on remarque que sur les solutions polluées avec une concentration C2 d'Invermectine, il a également été détecté la présence de ce deuxième pic avec des fréquences d'apparition à la baisse, allant de 44 à 0% selon le moment d'observation. Pour des solutions faiblement polluées (concentration C1), le deuxième pic est présent durant les 3h d'exposition, avec une fréquence d'apparition baissant de 80 à 33% au fil du temps.

Ainsi, l'analyse du suivi de ce deuxième pic semble nous donner un complément d'information sur la viabilité cellulaire. En effet, dans le cas de l'Ampicilline, qui a un effet direct sur les parois, on remarque que ce second pic disparaît rapidement. L'Ivermectine quant à lui n'est pas connu pour agir agir directement sur les parois cellulaires [262]. Ceci est cohérent avec le fait qu'on remarque une plus grande fréquence d'apparition du deuxième pic pour les solutions faiblement voire fortement contaminées à l'Ivermectine. Cependant, la fréquence d'apparition de ce deuxième pic diminue dans le temps, voire disparaît complètement après 3h d'observation pour la solution fortement contaminée. De futures études pourraient donc avoir un intérêt à essayer de lier les cinétiques spécifiques des polluants à la présence de ce pic.



(a) Distribution de γ en fonction de la fréquence *(b) Apparition du deuxième temps de relaxation*

FIGURE 4.14 – *Distributions des temps de relaxation en fonction de la fréquence et taux d'apparition du deuxième temps de relaxation pour l'expérimentation à base d'Ivermectine*

4.4 Cas du prototype intégrant des électrodes interdigitées

Dans l'optique du développement d'un capteur intégré, nous détaillons dans cette partie les avantages de l'utilisation des électrodes interdigitées présentées dans la section 3.2.3.1 puis nous expliquons les protocoles biologiques utilisés sur ces supports. Nous établissons ensuite le plan de mesure. Enfin nous présentons les résultats de ces expérimentations.

Les électrodes interdigitées (IDE) génèrent un gradient de champ élevé dans un volume réduit. Cette taille réduite permet des mesures sur des volumes d'échantillons plus faibles. Elle permet en outre des mesures d'impédance à des fréquences plus élevées que les configurations à plaques parallèles du fait des effets de propagation. Ce phénomène accroît donc la bande de fréquences sondées et donne ainsi plus d'informations pour extraire les phénomènes physiques et biologiques à l'oeuvre. À conductivité du milieu équivalente, leur géométrie réduite accroît également la résistance apparente de la cellule de mesure. L'analyse s'étend ainsi à des milieux plus conducteurs, condition pour compléter notre étude de la dispersion β. Pour maximiser l'effet Maxwell–Wagner, deux paramètres clés doivent être ajustés. Premièrement, il faut que la fraction volumique P (nombre de cellules par unité de volume) soit aussi élevée que possible pour augmenter l'intensité de la réponse collective. Deuxièmement, il faut une conductivité externe (milieu aqueux) σ_{ext} suffisamment faible pour maintenir un contraste marqué entre le cytoplasme bactérien et le milieu.

Les travaux d'Asami [263] montrent que l'augmentation de la concentration ionique décale la dispersion β vers les hautes fréquences. Passer de 10 mM (0,5 mS/cm) à 20 mM (1 mS/cm) de KCl déplace la fréquence de relaxation caractéristique d'environ 1.4 MHz à 2 MHz. Le compromis optimal sur la conductivité du milieu aqueux pour observer des effets sur la viabilité de *E. coli* se situe donc entre 0,5 et 1mS/cm.

Le modèle multicouche d'Asami impose par ailleurs deux conditions sur les rapports de conductivité : $\sigma_{\text{cyto}}/\sigma_{\text{ext}} > 10$ pour identifier séparément les dispersions β_2 et β_1, et $\sigma_{\text{paroi}}/\sigma_{\text{ext}} < 0{,}3$ pour conserver le caractère résistif de la paroi. Avec une conductivité du cytoplasme $\sigma_{\text{cyto}} = 2{,}2\,\text{mS/cm}$ et $\sigma_{\text{paroi}} = 3{,}7 \times 10^{-3}\,\text{mS/cm}$, un milieu de dilution à 0.2 mS/cm devrait satisfaire ces contraintes.

Pour des mesures expérimentales, la densité bactérienne maximale accessible est d'environ $10^{10}\,\text{CFU/mL}$, soit une fraction volumique $P \simeq 0{,}015$ si l'on conserve l'échelle proposée par Asami ($P = 0{,}03$ pour $2{,}5 \times 10^{10}\,\text{CFU/mL}$). Les dilutions usuelles de 1×10^9 et $1 \times 10^8\,\text{CFU/mL}$ correspondent respectivement à $P \simeq 1{,}5 \times 10^{-3}$ et $P \simeq 1{,}5 \times 10^{-4}$. En pratique, dans cette section, on va travailler avec trois populations, nommées EC1 à EC3 et qui ont respectivement des concentrations bactériennes de 10^{10}, 3×10^9 et $10^9\,\text{CFU/mL}$ respectivement.

Quatre milieux, ne différant que par la concentration en NaCl, vont être testés et sont présentés sur le tableau 4.6. Ils ont été comparés sur la plage 1 kHz – 110 MHz, avec une température

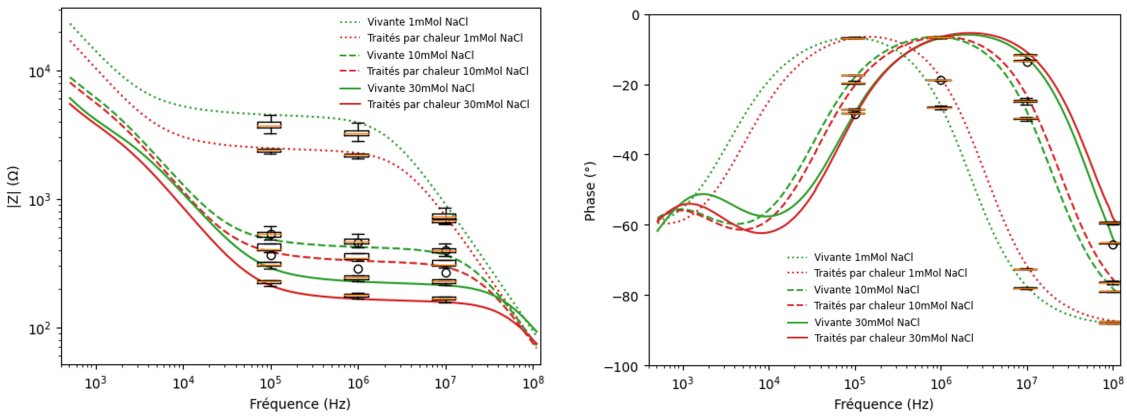
maintenue à 25°C. Chaque solution est mesurée cinq fois pour garantir un écart-type inférieur à 5 %. Il est essentiel de noter que pour les conditions C1,C2,C3 notre hypothèse de travail sur les milieux faiblement conducteurs n'est plus vérifié. Ainsi, les calculs et hypothèses des positions des temps de relaxation ne sont applicables que pour la solution avec de l'eau desionisée. Néanmoins, le but principal de ces expérimentations est de vérifier qu'on peut faire la discrimination entre des populations bactériennes saines et des populations qui ont subi un traitement.

Condition	[NaCl] $(mMol/L)$	σ_{ext} (mS/cm)	$\sigma_{cyto}/\sigma_{ext}$	$\sigma_{paroi}/\sigma_{ext}$
Eau désionisée (ED)	0	0,0001	>200	37
C1	1	0,118	18,6	<0,01
C2	10	1,18	1,9	0,02
C3	30	3,53	0,62	0,037

TABLEAU 4.6 – *Concentrations de NaCl étudiées et conductivité*

4.4.1 Analyse par impédance et régression

Nous étudions tout d'abord les comportements des solutions bactériennes salines via les résultats obtenus par spectroscopie d'impédance. Le graphique 4.15a représente le module de l'impédance et le graphique 4.15b la phase associée des solutions de contrôle 'Vivante' (A) et 'Traitées par chaleur' (D) pour les concentrations C1 à C3 de la population EC2. Les mesures liées à de l'eau désionisée n'ont pas été affichées pour mieux observer la cohérence des courbes liées à diverses concentrations salines. On remarque que chaque paire de signaux ('Vivante' et 'Traitées par chaleur') ne se recouvrent pas pour aucune des concentrations testées. Ces valeurs représentent donc des concentrations ioniques utilisables pour une détection des bactéries soumises à divers traitements.



(a) module |Z| d'EIS - Population EC2

(b) Phase d'EIS - Population EC2

FIGURE 4.15 – *EIS des solutions bactériennes de contrôle (Vivantes et traitées par chaleur) pour trois milieux aqueux de suspension bactérienne différents sur IDE. C1 en pointillé, C2 en tiret, C3 en plein.*

À basses fréquences, le spectre du module d'impédance $|Z|$ présente une pente décroissante caractéristique de l'influence des phénomènes électrochimiques proches des électrodes (diffusion, réaction aux électrodes, capacités double couche). Le plateau caractéristique de l'effet résistif-capacitif de la solution saline commence à environ 10^4 Hz pour la concentration C1 et 10^5 Hz pour

les concentrations C2 et C3. Ce plateau, dont le niveau décroît quand la conductivité du milieu augmente, traduit l'augmentation du nombre d'ions dans la solution et une moindre polarisation interfaciale des bactéries. Aux alentours de 10^5 Hz pour la concentration C1 et 10^6 Hz pour C2 et C3, toutes les courbes convergent vers une phase proche de 0°, avec toujours un plateau sur le module, comportement attendu d'un régime essentiellement ohmique dominé par l'électrolyte. La capacité de discrimination est donc maximale dans ces fréquences intermédiaires entre 10^5 Hz et 10^6 Hz. On remarque aux alentours de 10^7 Hz une rupture de plateau sur le module de l'impédance, caractéristique du comportement capacitif-résistif des solutions aqueuses.
Pour une même concentration en NaCl, les populations 'vivantes' (A) et 'traitées par chaleur' (D) restent différenciées à la fois en module et en phase, indiquant que la perte d'intégrité membranaire modifie le nombre d'ions dans la solution comme cela a été présenté lors de la première section de ce chapitre. Cette première observation ne laisse pas entrevoir d'autres processus électrochimiques à l'oeuvre.
On note deux informations dans cette première étude en configuration d'électrodes interdigitées. Premièrement, il est possible de discriminer des populations bactériennes avec un milieu externe plus conducteur que l'eau désionisée. Deuxièmement, on remarque que pour la concentration C3, fortement concentrée en NaCl, les phénomènes électrochimiques liés aux électrodes influencent l'analyse jusqu'au Mhz. En effet, l'influence des processus proche électrodes s'étend à des fréquences plus hautes lorsque la conductivité est plus forte. Ceci réduit dans ces cas la capacité d'analyse par régression sur un circuit RC. Ce changement de paradigme ne permet plus de comparer ces analyses avec les autres protocoles ni avec les équations de Maxwell-Wagner du chapitre 3. Une visualisation moyennée des données pour les trois populations à 1 MHz est proposée dans le tableau 4.7.

État	**Pop.**	**Eau DI**		**NaCl 1 mM**		**NaCl 10 mM**		**NaCl 30 mM**	
		$\|Z\|$ ($k\Omega$)	φ (°)	$\|Z\|$ ($k\Omega$)	φ (°)	$\|Z\|$ ($k\Omega$)	φ (°)	$\|Z\|$ ($k\Omega$)	φ (°)
(A)	EC1	$6,4 \pm 0,3$	$-63,56\pm,7$	$3,06\pm,04$	$-25,50\pm,06$	$0,46\pm,02$	$-6,58\pm,04$	$0,20\pm,03$	$-6,92\pm,04$
(A)	EC2	$6,1 \pm 0,3$	$-60,51\pm,4$	$3,31\pm,23$	$-25,64\pm,24$	$0,47\pm,03$	$-6,65\pm,05$	$0,26\pm,01$	$-6,77\pm,03$
(A)	EC3	$7,3 \pm 0,4$	$-70,47\pm,3$	$3,25\pm,21$	$-25,21\pm,26$	$0,43\pm,03$	$-6,54\pm,05$	$0,23\pm,02$	$-6,71\pm,05$
(D)	EC1	$2,58 \pm 0,16$	$-19,97\pm,2$	$2,59\pm,20$	$-19,44\pm,23$	$0,42\pm,02$	$-6,47\pm,03$	$0,20\pm,02$	$-6,88\pm,03$
(D)	EC2	$2,24 \pm 0,21$	$-19,54\pm,3$	$2,19\pm,05$	$-18,16\pm,05$	$0,39\pm,04$	$-6,51\pm,09$	$0,18\pm,01$	$-6,68\pm,07$
(D)	EC3	$3,05 \pm 0,09$	$-25,77\pm,1$	$2,33\pm,15$	$-17,81\pm,18$	$0,38\pm,03$	$-6,65\pm,07$	$0,22\pm,01$	$-6,16\pm,22$

TABLEAU 4.7 – *Données d'impédance $|Z|$ (Ω) et de phase φ (°) à* 1 MHz *pour les quatre milieux Eau DI, C1, C2, C3.*

On remarque sur le tableau 4.7 la différence de magnitude du module de l'impédance pour les mesures effectuées dans un milieu d'eau désionisée. En effet, les valeurs du module sont 10 fois plus grandes que celles obtenues avec des électrodes planaires pour des concentrations bactériennes similaires. On peut également noter que les valeurs du module ainsi que l'écart entre populations 'vivantes' (A) et 'traitées par chaleur' (D) se réduit avec l'augmentation de la concentration de NaCl. En valeurs relatives, cette diminution du module est en moyenne de 60 %, 25 %, 12 % et 11 % respectivement pour les tests dans l'eau desionisée, 1 mM, 10 mM et 30 mM. On voit donc que pour des milieux fortement concentrés, on arrive au point où l'effet cumulé d'une diminution de la magnitude du module et de l'écart relatif entre entre populations 'vivantes' (A) et 'traitées par chaleur' (D) ne permet plus de discriminer les deux populations.

Afin de représenter les écarts liés aux réplicas biologiques, nous avons affiché les valeurs de résistance R et capacité C au sein de la figure 4.16. Les populations saines sont en vert et celles traitées en rouge. Compte tenu de l'influence des processus en basse fréquence liés aux différences de conductivité des solutions, nous avons appliqué une régression non linéaire RC sur diverses plages de fréquences. Pour les mesures réalisées dans de l'eau désionisée (NaCl = 0 mMol/L), nous avons appliqué le calcul de régression à partir de la fréquence 5×10^4 Hz. Pour les concentrations C1 à C3, nous avons choisi d'appliquer la régression partir de 1×10^5 Hz, 5×10^5 Hz et 1×10^6 Hz respectivement. Les graphiques de la colonne de gauche montrent les valeurs de résistance R et les graphiques de la colonne de droite montrent les valeurs de la capacité C. Ces données sont complétées par le tableau en annexe F.1.

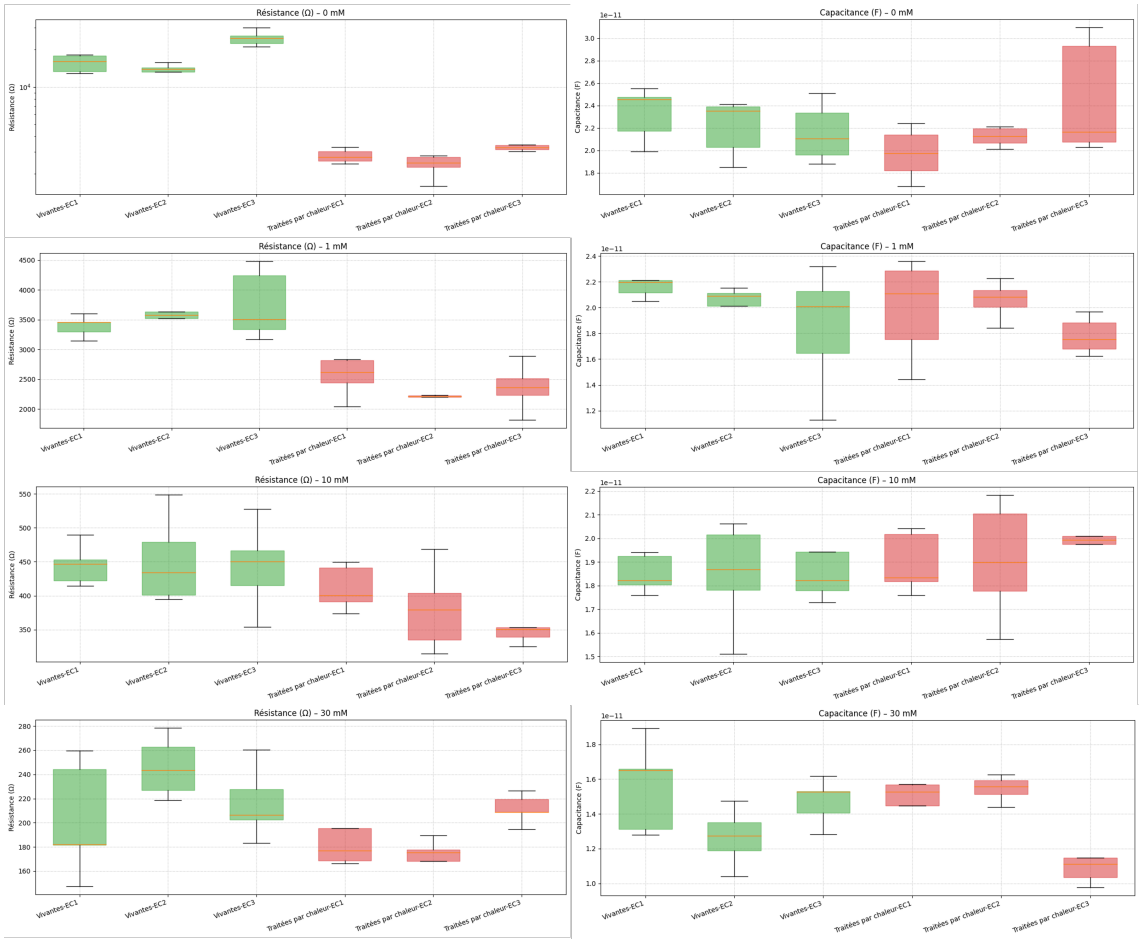


FIGURE 4.16 – *Valeurs de résistance et capacité obtenues par régression non linéaire pour chaque population bactérienne et chaque concentration de NaCl testées ainsi que pour le milieu sans NaCl*

On remarque que plus la conductivité du milieu est faible, plus la résistance R est efficace pour discriminer les populations bactériennes, ce qui est cohérent avec l'analyse faite sur le module de l'impédance. Pour l'eau DI, la valeur moyenne de la résistance R équivalente des trois populations vivantes (A) vaut $R_A = 18,24 \pm 5,54\,\text{k}\Omega$, tandis que celle des solutions traitées par chaleur (D) chute à $R_D = 2,78 \pm 0,05\,\text{k}\Omega\text{s}$. Alors que pour 30 mM on observe $R_A = 0,22 \pm 0,04\,\text{k}\Omega$ contre $R_D = 0,19 \pm 0,03\,\text{k}\Omega$. Une fois de plus, on constate qu'à ces fortes concentrations, la dispersion des mesures est trop grande pour permettre une discrimination directe entre vivantes et traitées. Dans ces conditions, les bactéries ne participent plus à l'augmentation de la conductivité via un largage d'ions. En effet, pour cette concentration de *NaCl*, le rapport $\sigma_{\text{cyto}}/\sigma_{\text{ext}}$ est inférieur à 1 (hyperosmotique).

Concernant la capacité C, pour toutes les concentrations de NaCl et pour différentes conditions de traitement, il est impossible de discriminer les solutions entre elles. A noter que les valeurs de capacité sont dix fois inférieures à celles observées pour les électrodes planaires, en cohérence avec la différence de géométrie. Compte tenu des différentes valeurs de R et C observées, on s'attend à ce que la DRT montre un pic aux alentours de 10^{-7} à 10^{-8} s pour le milieu.

4.4.2 Analyse par DRT

Dans cette sous-section, nous abordons l'analyse par DRT des quatre expérimentations contenant des bactéries et diverses concentrations de NaCl. La figure 4.17 présente l'analyse du spectre des temps de relaxation pour $\lambda = 10^{-4}$ de la population EC3 pour chaque concentration de NaCl. Tous les graphiques comportent trois courbes, représentant l'analyse des populations vivantes (en vert), celle des populations traitées (en rouge) et celle du milieu de référence sans bactéries (en bleu). A noter que toutes les mesures sont affichées et par conséquent, du fait de la dispersion des mesures, les pics reliés à un même processus ne sont pas systématiquement à la même position. Des labels sur l'axe des abscisses appelés "blocs" dans le texte permettent d'identifier la plage de temps de relaxation associée à un processus. Par contre, quand les pics sont systématiquement à la même position, un seul est affiché. Dans un premier temps, nous avons fait l'analyse du nombre de pics par expérimentation.

Pour les populations mises en suspension dans de l'eau désionisée (NaCl $= 0\,\mathrm{mMol/L}$), sur le graphe en haut à gauche, on observe des phénomènes similaires à ceux qui ont été présentés dans la section précédente sur les effets de l'Ampicilline et l'Ivermectine. En effet, la position du pic principal (bloc 1) vaut $\sim 5 \times 10^{-7}$ s pour la solution vivante contre $\sim 5 \times 10^{-8}$ s pour la solution traitée par chaleur, montrant bien une variation de conductivité de la solution. Les populations vivantes sont les seules à avoir un deuxième pic (bloc 3) sur des valeurs de temps de relaxation τ plus bas (4×10^{-8} s) que le pic lié à la contribution du milieu. Comme décrit dans le chapitre précédent, ce pic peut être attribué à la présence de bactéries viables dans la solution. Finalement, pour les populations traitées par chaleur, on observe un deuxième pic aux alentours de 10^{-6} s (bloc 2). Nous interprétons ce pic comme un artefact compte tenu de sa faible amplitude et de sa proximité avec un pic déjà identifié comme artefact de mesure dans les sections précédentes.

Pour la solution C1 à faible concentration en NaCl, sur le graphe en haut à droite, on remarque qu'il n'y a que deux pics présents pour les trois états. Le premier est aux alentours de 2×10^{-6} s (qq kHz) et le deuxième vers 5×10^{-8} s (qq MHz) indiqué par les blocs 2 et 1 respectivement. Le bloc 1 semble lié aux propriétés du milieu aqueux car sa contribution est plus importante. Le pic associé au bloc 2 reste non expliqué à ce jour. Il pourrait venir d'un effet de diffusion/génération d'ions, car ce pic ne semble pas fixe en fréquence ce qui indiquerait une perturbation des mesures. D'autre part, cette plage de fréquences correspond théoriquement à la relaxation de la membrane extérieure ($\simeq 1\,\mu$s selon le Tableau 3.10). Cependant, la présence de ce pic dans la réponse du milieu composé uniquement d'eau et de NaCl indique que ce temps de relaxation n'est pas seulement lié à la réponse biologique. Mais il est aussi en partie masqué par un temps de relaxation lié aux électrodes. De plus, cette interprétation reste sujette à caution car la concentration en NaCl est élevée et sort du cadre de l'hypothèse des milieux faiblement conducteurs, qui sous-tend cette étude.

Concernant les concentrations C2 (graphe en bas à gauche) et C3 (graphe en bas à droite) de NaCl, on remarque la présence de respectivement 4 et 5 pics en fonction des états bactériens. Notons d'abord le pic correspondant au processus résistif-capacitif du milieu (bloc 1) qui est présent aux alentours de 5×10^{-9}s. Un second pic est présent entre 2 et 7×10^{-5} s, lié aux contributions électrochimiques associées aux électrodes. Il est indiqué par le bloc 4 sur le graphique pour la concentration C2, et par le bloc 5 pour la concentration C3 (3 pour la solution sans bactéries). Le troisième pic (bloc 3 sur C2 et 4 sur C3) est présent entre 1×10^{-7} s et 1×10^{-6} s avec une

intensité bien plus faible. Finalement, un quatrième pic très proche du pic principal (noté 2 sur les deux graphiques) aux alentours de 8×10^{-9} s et 1×10^{-8} s est observé.

On peut observer que l'augmentation de la salinité déplace globalement les pics vers des temps de relaxation plus courts, en accord avec la relation $\tau \approx \varepsilon/\sigma$. C'est pour cela que sur le premier graphique on ne remarque pas le pic lié aux électrodes.

Seules les populations vivantes en milieu DI présentent une signature supplémentaire et plus étalée, située entre 10^{-8} s et 10^{-6} s. La présence systématique du bloc 2 sur la population vivante sans NaCl n'est à ce jour pas expliquée.

Dans ces mesures sans NaCl, le pic correspondant au bloc 3 est supposé lié à la présence des bactéries viables. Pour les concentrations C2 et C3, nous faisons la même hypothèse, bien que nous soyons là aussi sortis du cadre d'un milieu faiblement conducteur.

Concernant la concentration C3, pour les deux derniers pics (blocs n°2 10^{-8} s et 3 10^{-6} s) nous proposons l'interprétation suivante : le pic à 10^{-8} s (bloc 2) a une amplitude plus grande que celui à 10^{-6} s (bloc 3). Cela pourrait traduire l'influence de la polarisation des parois bactériennes qui entraîne la dispersion β_1 [246].

Il se peut que le dernier pic (bloc 2 sur C3) soit lié à une polarisation qui a lieu dans une région plus fine de la paroi, à l'origine de la dispersion β_2. Cependant ces valeurs ne correspondent pas aux résultats théoriques présentés dans le tableau 3.10. Le modèle diélectrique utilisé dans notre étude pour caractériser les bactéries se base sur le modèle de Maxwell-Wagner. Ce modèle simplifie la forme de la bactérie en la supposant sphérique. L'utilisation d'un modèle plus fin prenant en compte la forme ellipsoïdale [246] de ces bactéries permettrait d'obtenir des temps de relaxation plus faibles et donc plus proches des résultats expérimentaux.

Un autre argument soutenant l'hypothèse de la détection des dispersions β est la position des pics. L'augmentation de la conductivité extracellulaire σ_{ext} accroît la part imaginaire de la permittivité associée $\varepsilon^*_{ra} = \varepsilon_{ra} - j\sigma_{ext}/(\omega\varepsilon_0)$, ce qui modifie le dénominateur de l'équation 3.23. Selon ce formalisme de Maxwell-Wagner, cette hausse de conductivité induit un décalage des relaxations vers les hautes fréquences et donc une diminution des temps de relaxation associés.

Il est donc possible que ce décalage vienne à son tour masquer en partie les pics liées aux deux dispersions. Cependant, la faible variation du pic aux alentours de 1μs est conforme à la tendance théorique.

Finalement, on attire l'attention sur le fait que les positions centrales des pics secondaires pour les solutions traitées sont plus basses en fréquence (bloc 2 sur C2) que dans le cas des solutions vivantes. Cette évolution des positions de τ dans les échantillons traités par chaleur suggère une diminution cohérente de la permittivité effective des enveloppes bactériennes.
Avec un paramètre $\lambda = 10^{-5}$ (en annexe sur la figure F.1), les spectres obtenus n'apportent pas plus d'information. La cohérence des tendances entre concentrations ioniques et entre temps de relaxation via le paramètre $\lambda = 10^{-4}$ est donc validée pour les comparaisons entre les différentes concentrations de NaCl.

En conclusion de cette section, l'utilisation des électrodes interdigitées nous a permis d'augmenter la plage de fréquence jusqu'à 110 MHz ouvrant l'analyse vers des milieux fortement conducteurs (C3). L'analyse DRT corrélée au modèle de Maxwell-Wagner démontre que l'augmentation de la salinité déplace les temps de relaxation vers des valeurs plus faibles (fréquences plus hautes), confirmant la sensibilité de la méthode à la variation de conductivité. La polarisation des électrodes et la relaxation du couple RC du milieu dominent les spectres. De plus, des signatures spécifiques aux populations vivantes sont visibles sous forme de pics secondaires.

Le pic observé vers 10^{-7} s (bloc 3) en milieu d'eau DI est compatible avec la polarisation des parois bactériennes (dispersion β), validant ainsi la capacité de la DRT à isoler des processus biologiques discrets. La présence d'un troisième pic (bloc 2 sur Eau DI) reste inexpliquée en utilisant un modèle sphérique de bactérie. On suggère qu'une prise en compte de la morphologie ellipsoïdale des bactéries est nécessaire pour affiner l'interprétation des constantes de temps. De plus,

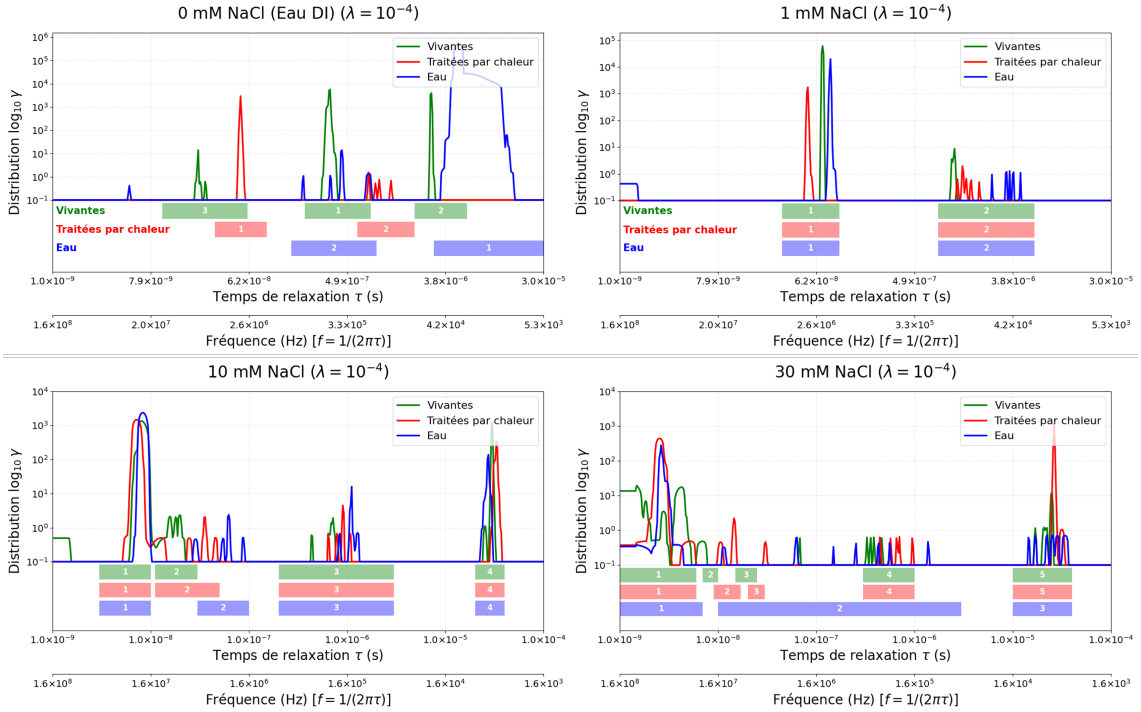


FIGURE 4.17 – *Évolution des temps de relaxation pour les expérimentations de contrôle 'Vivantes' et 'Traitées par chaleur' pour les diverses solutions ioniques ($\lambda = 10^{-4}$). De gauche à droite et de haut en bas : Eau désionisée, 1 mM, 10 mM et 30 mM de NaCl.*

cette étude souligne la proximité temporelle entre les artefacts électrochimiques et les relaxations membranaires, dont la distinction devient critique à mesure que la conductivité du milieu s'élève.

L'analyse montre qu'en milieux conducteurs (C1 à C3), l'analyse des pics associés aux bactéries devient complexe car la réduction des temps de relaxation du milieu (10^{-8} s à 10^{-9} s) tend à masquer ceux liés aux bactéries. Cependant, la persistance de pics d'intensité secondaire entre 10^{-7} s et 10^{-6} s, suggère que la polarisation des enveloppes cellulaires reste partiellement détectable. Cette persistance confirme que, même sous forte salinité, la DRT parvient à extraire des constantes de temps spécifiques aux membranes, dont le léger décalage fréquentiel suit la dynamique prédite par le formalisme de Maxwell-Wagner.

Conclusion

Dans ce dernier chapitre, nous avons abordé les différents éléments liés à l'analyse des mesures sur des solutions de bactéries saines et traitées. Ce traitement a été fait par chaleur et par exposition à un polluant. En effet, les mesures comparatives sont des outils privilégiés pour réaliser une détection de viabilité par impédancemétrie. Nous avons remarqué que pour réaliser une discrimination des solutions, en utilisant un protocole de suspension biologique en eau désionisée, la valeur du module de l'impédance est suffisante car les spectres étudiés regroupent en premier

lieu l'étude de la conductivité des milieux liquides, ce qui est directement corrélé à la viabilité cellulaire. Notre dispositif ne permet pas d'étudier directement via les données d'impédance les variations de permittivité car la dispersion β est trop faible par rapport aux autres processus. Nous avons appliqué un algorithme réalisant l'analyse DRT des signaux et avons pu observer la présence d'un pic lié aux milieux aqueux et d'un autre pic lié à la présence des bactéries. Le temps de relaxation associé à ce deuxième pic peut être étudié pour réaliser une discrimination des solutions bactériennes. Dans un dernier temps, nous avons étudié l'utilisation d'électrodes interdigitées sur verre dans le but de changer la concentration ionique et bactérienne. Nous avons pu constater grâce à ces électrodes que nous sommes capables d'étudier des concentrations plus grandes de bactéries grâce au faible volume nécessaire. Cette dernière étude s'est avérée plus sensible en nous permettant d'entrevoir les processus liés aux dispersions β. Ces résultats semblent prometteurs pour de futures interprétations de données liées aux parois cellulaires en vue d'une détection précoce de toxicité aquatique.

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous avons conçu un biocapteur impédancemétrique sans fonctionnalisation de surface, destiné à la détection de la toxicité aquatique. Nous avons réalisé un premier prototype de taille mésoscopique, avec lequel nous avons effectué des expérimentations sur des polluants en solution dans de l'eau désionisée contenant des bactéries dans des conditions contrôle de laboratoire. Nous avons finalement conçu un prototype intégré sur verre que nous avons utilisé pour étudier le traitement par chaleur des bactéries.

Un premier chapitre a permis d'établir le contexte de la thèse, notamment via une étude du sens donné à la pollution de l'eau, en diachronie. Nous avons mis en lumière les études scientifiques associées à cette thématique tout en interrogeant les normes réglementaires et les techniques de mesure actuellement préconisées au sein de l'Union Européenne. Nous avons remarqué que la famille des polluants des Avermectines a été mise sur la 'Watch list' des polluants en 2025, montrant l'enjeu sociétal actuel de ces polluants. Nous avons ensuite brièvement présenté la famille des biocapteurs qui est très vaste, compte tenu de la variété d'éléments biologiques utilisés comme biorécepteurs et de la diversité des méthodes de transduction. En effet, l'élément biologique, qui peut être constitué de phages, d'enzymes, d'anticorps ou encore de cellules et d'organismes vivants, réagit de manière sélective avec la cible recherchée. Cette interaction génère un signal biologique qui est ensuite converti par le transducteur vers un autre domaine de la physique comme l'optique ou l'électricité. Après analyse de cet état de l'art, notre objectif étant d'obtenir un capteur rapide, simple et à faible impact environnemental donc à surface non fonctionnalisée, nous avons choisi de concevoir un biocapteur réalisant des mesures d'impédance pour étudier les variations apportées à la solution aqueuse par des bactéries saines et traitées. Nous avons dressé un panorama des biocapteurs impédancemétriques dédiés à la détection de la bactérie *Escherichia coli* lorsqu'elle est considérée comme un agent pathogène dans un milieu aqueux. Dans un second temps, nous nous sommes positionnés vis-à-vis des études utilisant des biocapteurs impédancemétriques qui exploitent cette même bactérie pour détecter d'autres agents pathogènes.

Dans le deuxième chapitre, nous avons d'abord rappelé les éléments importants pour l'étude des bactéries, soit leur constitution et leur fin de vie, en passant par leurs moyens de se multiplier. Nous nous sommes ensuite intéressés aux bactéries dans un milieu aqueux, afin d'estimer le nombre de charges qu'elles apportent au milieu. C'est sur cette relation que notre hypothèse d'étude repose. En effet, nous postulons l'hypothèse que les bactéries vont ramener les ions qui sont autour de leurs parois, mais également ceux provenant de l'intérieur des bactéries lorsqu'elles sont soumises à un traitement, dans un milieu très faiblement conducteur. Suite à cela, une discussion sur la terminologie du traitement a été abordée afin de montrer le cadrage anthropomorphique de nos réflexions. Nous avons également étudié l'état de l'art sur la détection de bactéries qui ont subi un traitement, nous permettant d'appuyer notre hypothèse et de la compléter avec une altération des propriétés diélectriques des parois. Dans une deuxième partie de ce chapitre, nous avons étudié les comportements des bactéries face à l'Ampicilline et l'Ivermectine. Le premier est un antibiotique bien connu et le second est un antiparasitaire que nous utilisons comme polluant très toxique et plus générique. Finalement, nous avons étudié la capacité du cuivre et de l'étain à être considérés comme biocompatibles pour des temps de contact inférieurs à 40 minutes.

Lors du troisième chapitre, nous avons abordé les deux configurations d'électrodes utilisées pendant ces travaux. Le premier prototype est composé de deux électrodes carrées de 2.5 *cm* en

vis-à-vis espacées de 800 μm, tandis que le deuxième est un réseau d'électrodes interdigitées d'une surface de $32 mm^2$. Le premier permet d'appliquer un champ uniforme tandis que le deuxième est un choix de configuration planaire permettant de démarrer le travail de réduction d'échelle, afin d'obtenir un premier prototype intégré sur verre de biocapteur multimodale. Dans la deuxième partie de ce chapitre nous avons abordé les processus électrochimiques présents lors de l'analyse par spectroscopie d'impédance. Nous avons également fait le lien entre une concentration en ions et une conductivité. Ceci nous permet de passer du domaine du vivant et de sa chimie vers des mesures électriques. Puis nous avons établi via des simulations par éléments finis un modèle de bactérie. Finalement, nous avons abordé les différentes méthodes d'analyse des données qui ont été utilisées dans ces travaux ; il s'agit de la méthode directe, de la régression non-linéaire, de la spectroscopie diélectrique et de la distribution des temps de relaxation. Cette dernière méthode, qui n'a été que peu utilisée sur des données liées aux bactéries par le passé, semble être particulièrement efficace.

Enfin, le dernier chapitre présente les trois volets d'expérimentations réalisés dans le cadre de cette thèse. Compte tenu de notre hypothèse de travail, nous avons décidé d'orienter l'étude vers la détection de la conductivité des milieux où les bactéries sont en solution. Pour ce faire le premier volet permet de valider par l'expérience la quantification de l'apport en ions au milieu provenant des bactéries, milieu comprenant les charges à l'extérieur des bactéries et celles ramenées lors d'un traitement. Nous avons d'abord cherché à observer les changements du processus résistif-capacitif pour des solutions très faiblement ioniques contenant des bactéries saines ou traitées par chaleur. Nous en avons déduit que la variation du nombre d'ions en solution est bien un indicateur indirect de la viabilité cellulaire. De plus, nous sommes capables de lier ces informations à la concentration bactérienne. La distribution des temps de relaxation a permis d'atteindre ces mêmes objectifs tout en pouvant montrer directement la polarisation des bactéries au sein du milieu aqueux. Le deuxième volet concerne l'expérimentation qui a été effectuée sur des bactéries traitées avec de l'Ampicilline (10/20/100μg/mL) et de l'Ivermectine (15/45μg/L). Nous avons montré que les mesures avec notre premier dispositif sont capables de différencier chacune de ces solutions en comparaison avec des solutions de contrôle. L'étude par DRT a permis de mettre en lumière que le processus résistif-capacitif du milieu est, effectivement, la contribution principale. Toutefois, elle a également permis d'observer des prémices de polarisation liées aux bactéries dans un milieu aqueux. Grâce à la comparaison de la DRT avec les données d'impédance ou les données de la régression nous avons identifié les processus secondaires potentiellement liés aux bactéries. Ces processus sont plus ou moins identifiables en fonction de la concentration bactérienne des solutions. Une première approche d'analyse proposée consiste à étudier l'évolution temporelle de la position des temps de relaxation de ces processus mineurs pour étudier les parois cellulaires. Pour finir, le troisième volet concerne l'utilisation du dispositif intégré sur verre dans le cadre d'une expérimentation faisant varier la conductivité du milieu externe. Ce dispositif, utilisant de plus petites quantités de liquide, permet d'augmenter la concentration bactérienne à $10^{10} CFU/mL$. Dans ces conditions, bien que l'analyse des données d'impédance et des données issues de la régression restent pertinentes, on a remarqué qu'une analyse par DRT permet de s'affranchir des processus proches électrodes, présents sur de grandes plages de fréquence. Pour conclure, l'analyse par DRT a permis d'observer des pics liés à d'autres processus qui, au vu de la littérature, pourraient être associés à la polarisation des parois bactériennes.

A l'issue de ces travaux, plusieurs perspectives s'annoncent naturellement. Une première voie de recherche essentielle réside dans l'exploitation approfondie de la dimension temporelle des interactions entre la bactérie et le polluant. Il apparaît utile de ne plus considérer la détection comme un événement ponctuel, mais d'étudier finement les dynamiques temporelles propres à chaque espèce chimique ou biologique. L'objectif est de parvenir à isoler des évolutions temporelles spécifiques. Cette approche couplée à plusieurs types de bactéries permettrait de construire une véritable matrice de détection multimodale, offrant une discrimination bien plus robuste des polluants.

Au-delà de l'analyse temporelle, l'optimisation de l'outil de mesure passe nécessairement par un élargissement significatif de la fenêtre spectrale, notamment en étendant l'analyse de la Distribution des Temps de Relaxation (DRT) jusqu'au domaine du gigahertz. Cette montée en fréquence est une étape technologique indispensable pour capturer l'intégralité des phénomènes de polarisation, depuis les relaxations interfaciales lentes jusqu'aux relaxations de structures biologiques encore plus fines et aux relaxations dipolaires rapides des molécules d'eau. L'ambition est ici d'obtenir un spectre qui tend à être capable de révéler simultanément l'ensemble des processus physiques et électrochimiques en jeu. De plus, cette possibilité permettrait d'entrecroiser les résultats de domaines de recherche le plus souvent séparés, que ce soit par la distinction électrochimique et électromagnétique ou bien par les études BF et UHF.

L'accès à cette extension spectrale via une DRT élargie ouvre naturellement la voie à un approfondissement majeur de l'étude diélectrique et plus spécifiquement des parois bactériennes, qui constituent à ce jour l'interface critique entre le milieu intracellulaire et l'environnement extérieur. En focalisant l'analyse sur les contributions spectrales spécifiques de la paroi bactérienne, il devient possible de caractériser avec une précision nouvelle l'état physiologique des bactéries via l'intégrité de leurs membranes.

Pour dépasser les limites de la seule mesure d'impédance, ces travaux devront s'orienter vers un couplage multimodal, par exemple en couplant la mesure par EIS à celle effectuée par voie optique. Cette ouverture vers la multimodalité permettrait non seulement de détecter la présence de bactéries, mais aussi d'observer et de quantifier les phénomènes de perméabilisation membranaire induits par les dispositifs de mesure. Pour renforcer la capacité analytique du dispositif, des capteurs supplémentaires tels que ceux permettant la mesure du pH pourraient être intégrés ultérieurement, afin d'élargir encore davantage le champ d'application de ce système innovant.

Il faudra cependant prêter attention à ce que ces différentes perspectives qui tendent à rendre plus complexe l'environnement de mesure ne soient pas à contre courant du projet d'une détection simple, robuste, rapide et à faible impact environnemental.

Références bibliographiques

[1] A. GONZALVEZ et al. « A review of non-chromatographic methods for speciation analysis ». In : *Analytica chimica acta* 636.2 (2009), p. 129-157.

[2] D. H. MUNIZ et E. C. OLIVEIRA-FILHO. « Multivariate statistical analysis for water quality assessment : a review of research published between 2001 and 2020 ». In : *Hydrology* 10.10 (2023), p. 196.

[3] L. C. HUFF. « A sensitive field test for heavy metals in water ». In : *Economic Geology* 43.8 (1948), p. 675-684.

[4] A. WALSH. « The development of atomic absorption methods of elemental analysis 1952-1962 ». In : *Analytical Chemistry* 63.19 (1991), 933A-941A.

[5] W. C. SONZOGNI et al. « Chloride pollution of the Great Lakes ». In : *Journal (Water Pollution Control Federation)* (1983), p. 513-521.

[6] H. RAMIREZ-MALULE, D. QUINONES-MURILLO et D. MANOTAS-DUQUE. *Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. Emerg. Contam. 6, 179–193*. 2020.

[7] Y. LEVENTELI et F. YALCIN. « Data analysis of heavy metal content in riverwater : multivariate statistical analysis and inequality expressions ». In : *Journal of Inequalities and Applications* 2021.1 (2021), p. 14.

[8] R. REZA et G. SINGH. « Heavy metal contamination and its indexing approach for river water ». In : *International journal of environmental science & technology* 7 (2010), p. 785-792.

[9] E. P. de ARAUJO, E. D. CALDAS et E. C. OLIVEIRA-FILHO. « Pesticides in surface freshwater : a critical review ». In : *Environmental Monitoring and Assessment* 194.6 (2022), p. 452.

[10] W. W. STONE, R. J. GILLIOM et K. R. RYBERG. *Pesticides in US streams and rivers : occurrence and trends during 1992–2011*. 2014.

[11] V. MOHAUPT et al. « Pesticides in European rivers, lakes and groundwaters-Data assessment ». In : *ETC/ICM technical report* 1 (2020), p. 2020.

[12] O. OGBEIDE, I. TONGO et L. EZEMONYE. « Risk assessment of agricultural pesticides in water, sediment, and fish from Owan River, Edo State, Nigeria ». In : *Environmental monitoring and assessment* 187 (2015), p. 1-16.

[13] C.-L. ZHENG et al. « Global development of the studies focused on antibiotics in aquatic systems from 1945 to 2017 ». In : *Environmental Science and Pollution Research* 25 (2018), p. 22023-22034.

[14] C. BHAGAT et al. « Proclivities for prevalence and treatment of antibiotics in the ambient water : a review ». In : *NPJ Clean Water* 3.1 (2020), p. 42.

[15] T. LEVESQUE et al. « Impact of the Lubrizol factory fire in Rouen on coronary events : A retrospective study from the France PCI registry ». In : *Archives of cardiovascular diseases* 115.8-9 (2022), p. 467-475.

[16] Q. T. DINH et al. « Occurrence of antibiotics in rural catchments ». In : *Chemosphere* 168 (2017), p. 483-490.

[17] L. MESA et al. « Concentration and environmental fate of ivermectin in floodplain wetlands : an ecosystem approach ». In : *Science of the Total Environment* 706 (2020), p. 135692.

[18] A. CANNAVAN et al. « Concentration of 22, 23-dihydroavermectin B1a detected in the sediments at an Atlantic salmon farm using orally administered ivermectin to control sea-lice infestation ». In : *Aquaculture* 182.3-4 (2000), p. 229-240.

[19] I. DAVIES et al. « Environmental risk of ivermectin to sediment dwelling organisms ». In : *Aquaculture* 163.1-2 (1998), p. 29-46.

[20] D. LOFFLER et T. A. TERNES. « Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediment using liquid chromatography–tandem mass spectrometry ». In : *Journal of chromatography A* 1021.1-2 (2003), p. 133-144.

[21] O. M. de la SANTE. *Directives de qualite pour l'eau de boisson : 4e ed. integrant le premier additif*. 2024. URL : https://www.who.int/publications/i/item/9789240097254.

[22] UE. *Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau*. 2013. URL : https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000028022376.

[23] INERIS. *Méthodologie utilisée pour la détermination de normes de qualité environnementale (NQE)*. Accessed : 2025-03-19. 2011. URL : https://www.ineris.fr/sites/ineris.fr/files/contribution/Documents/drc-11-118981-08866a-methodo-nqe-avec-couverture-1391006362.pdf.

[24] UE. *Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2015) 1756) Text with EEA relevance*. 2015. URL : https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2015/495/oj.

[25] E. COMMISSION. *Commission Implementing Decision (EU) 2018/840 of 5 June 2018 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council and repealing Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 (notified under document C(2018) 3362)*. Accessed : 2025-03-19. 2018. URL : https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%5C%3A32018D0840&qid=1742375832966.

[26] E. COMMISSION. *Commission Implementing Decision (EU) 2022/1307 of 22 July 2022 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2022) 5098)*. Accessed : 2025-03-19. 2022. URL : https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%5C%3A32022D1307&qid=1742375799748.

[27] E. COMMISSION. *Commission Implementing Decision (EU) 2025/439 of 28 February 2025 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document C(2025) 1244)*. Accessed : 2025-03-19. 2025. URL : https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%5C%3A32025D0439&qid=1742375799748.

[28] I. 21676 :2018. *Water quality — Determination of the dissolved fraction of selected active pharmaceutical ingredients, transformation products and other organic substances in water and treated waste water — Method using high performance liquid chromatography and mass spectrometric detection (HPLC-MS/MS or -HRMS) after direct injection*. Accessed : 2025-03-19. 2018. URL : https://www.iso.org/standard/71340.html#:~:text=This%5C%20document%5C%20specifies%5C%20a%5C%20method,water%5C%20and%5C%20treated%5C%20waste%5C%20water.

[29] I. 6468 :1996. *Qualité de l'eau — Dosage de certains insecticides organochlorés, des polychlorobiphényles et des chlorobenzènes — Méthode par chromatographie en phase gazeuse après extraction liquide-liquide*. Accessed : 2025-03-19. 1996. URL : https://www.iso.org/fr/standard/12826.html.

[30] I. 17294-2 :2023. *Qualité de l'eau — Application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS)*. Accessed : 2025-03-19. 2023. URL : https://www.iso.org/fr/standard/82245.html.

[31] I.-.-D. DULAMA et al. « Determination of heavy metal contents in surface water by Inductively Coupled Plasma—Mass Spectrometry : A case study of Ialomita River, Romania ». In : *Rom. J. Phys* 62.5-6 (2017), p. 807-815.

[32] K. R. MAHALA et al. « Assessment of Pesticides Use and Heavy Metals Analysis of Surface and Ground Water Sources by Atomic Absorption Spectroscopy at Nagaur Region, Rajasthan (India) ». In : *International Journal of Mechanical Engineering* 7.1 (2022), p. 7079-7088.

[33] G. ZARAZUA et al. « Analysis of total and dissolved heavy metals in surface water of a Mexican polluted river by total reflection X-ray fluorescence spectrometry ». In : *Spectrochimica Acta Part B : Atomic Spectroscopy* 61.10-11 (2006), p. 1180-1184.

[34] M. FARRÉ et al. « Toxicity assessment of organic pollution in wastewaters using a bacterial biosensor ». In : *Analytica Chimica Acta* 426.2 (2001), p. 155-165.

[35] F. EJEIAN et al. « Biosensors for wastewater monitoring : A review ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 118 (2018), p. 66-79.

[36] M. ABBAS et al. « Vibrio fischeri bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment : a review ». In : *Science of the Total Environment* 626 (2018), p. 1295-1309.

[37] S. HASSANI et al. « Biosensors and their applications in detection of organophosphorus pesticides in the environment ». In : *Archives of toxicology* 91.1 (2017), p. 109-130.

[38] A. ODOBAŠIĆ, I. ŠESTAN et S. BEGIĆ. « Biosensors for determination of heavy metals in waters ». In : *Biosensors for environmental monitoring*. IntechOpen, 2019.

[39] H. H. NGUYEN et al. « Immobilized enzymes in biosensor applications ». In : *Materials* 12.1 (2019), p. 121.

[40] K. VELUSAMY et al. « Biosensor for heavy metals detection in wastewater : A review ». In : *Food and Chemical Toxicology* 168 (2022), p. 113307.

[41] A. BEREZHETSKYY et al. « Alkaline phosphatase conductometric biosensor for heavy-metal ions determination ». In : *Irbm* 29.2-3 (2008), p. 136-140.

[42] L. S. BACHAN UPADHYAY et N. VERMA. « Enzyme inhibition based biosensors : A review ». In : *Analytical Letters* 46.2 (2013), p. 225-241.

[43] P.-H. CHAN et al. « Rational design of a novel fluorescent biosensor for β-lactam antibiotics from a class A β-lactamase ». In : *Journal of the American Chemical Society* 126.13 (2004), p. 4074-4075.

[44] E. LESZCZYNSKA, R. KONCKI et S. GLAB. « Biosensors with immobilized penicillin aminohydrolase and penicillinase for determination of -lactam antibiotics ». In : *Chemia analityczna* 41 (1996), p. 839-844.

[45] D. GRIESHABER et al. « Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures ». In : *Sensors* 8.3 (2008), p. 1400-1458.

[46] M. XU, R. WANG et Y. LI. « Electrochemical biosensors for rapid detection of Escherichia coli O157 : H7 ». In : *Talanta* 162 (2017), p. 511-522.

[47] F. PÉREZ et al. « Rapid detection of Escherichia coli in water by a culture-based amperometric method ». In : *Analytica Chimica Acta* 427.2 (2001), p. 149-154.

[48] S. SHARMA, H. BYRNE et R. J. O'KENNEDY. « Antibodies and antibody-derived analytical biosensors ». In : *Essays in biochemistry* 60.1 (2016), p. 9-18.

[49] Y. WANG et al. « Highly sensitive and specific determination of mercury (II) ion in water, food and cosmetic samples with an ELISA based on a novel monoclonal antibody ». In : *Analytical and bioanalytical chemistry* 403 (2012), p. 2519-2528.

[50] K. GRENNAN et al. « Atrazine analysis using an amperometric immunosensor based on single-chain antibody fragments and regeneration-free multi-calibrant measurement ». In : *Analytica Chimica Acta* 500.1-2 (2003), p. 287-298.

[51] J. ZHANG et al. « Fast determination of the tetracyclines in milk samples by the aptamer biosensor ». In : *Analyst* 135.10 (2010), p. 2706-2710.

[52] K. REDER-CHRIST et G. BENDAS. « Biosensor applications in the field of antibiotic research—A review of recent developments ». In : *Sensors* 11.10 (2011), p. 9450-9466.

[53] H. TANG et al. « A new amperometric method for rapid detection of Escherichia coli density using a self-assembled monolayer-based bienzyme biosensor ». In : *Analytica Chimica Acta* 562.2 (2006), p. 190-196.

[54] A. D. CHOWDHURY et al. « Label free polyaniline based impedimetric biosensor for detection of E. coli O157 : H7 Bacteria ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 171 (2012), p. 916-923.

[55] I. BENHAR et al. « Recombinant single chain antibodies in bioelectrochemical sensors ». In : *Talanta* 55.5 (2001), p. 899-907.

[56] P. J. CONROY et al. « Antibody production, design and use for biosensor-based applications ». In : 20.1 (2009), p. 10-26.

[57] V. KAVITA. « DNA biosensors-a review ». In : *J. Bioeng. Biomed. Sci* 7.2 (2017), p. 222.

[58] F. KURALAY et A. ERDEM. « DNA Biosensors ». In : *Environmental Analysis by Electrochemical Sensors and Biosensors : Fundamentals*. Sous la dir. de L. M. MORETTO et K. KALCHER. New York, NY : Springer New York, 2014, p. 313-330. ISBN : 978-1-4939-0676-5. DOI : 10.1007/978-1-4939-0676-5_12. URL : https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0676-5_12.

[59] M. SAIDUR, A. A. AZIZ et W. BASIRUN. « Recent advances in DNA-based electrochemical biosensors for heavy metal ion detection : A review ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 90 (2017), p. 125-139.

[60] Y. ZHANG et al. « A novel graphene-DNA biosensor for selective detection of mercury ions ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 48 (2013), p. 180-187.

[61] M. STOBIECKA. « Novel DNA-Biosensors for Studies of GMO, Pesticides and Herbicides ». In : *State of the Art in Biosensors*. Sous la dir. de T. RINKEN. Rijeka : IntechOpen, 2013. Chap. 10. DOI : 10.5772/52261. URL : https://doi.org/10.5772/52261.

[62] N. DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ et al. « SPR sensing of small molecules with modified RNA aptamers : Detection of neomycin B ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 24.8 (2009), p. 2547-2553.

[63] Z. ZHU et al. « Highly sensitive and quantitative detection of rare pathogens through agarose droplet microfluidic emulsion PCR at the single-cell level ». In : *Lab on a Chip* 12.20 (2012), p. 3907-3913.

[64] U. FAROOQ et al. « Bacterial biosensing : Recent advances in phage-based bioassays and biosensors ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 118 (2018), p. 204-216.

[65] S. TOKONAMI et T. IIDA. « Novel sensing strategies for bacterial detection based on active and passive methods driven by external field ». In : *Analytica chimica acta* 988 (2017), p. 1-16.

[66] M. SOSNOWSKA et al. « Phage display technology in ecotoxicology : phage display derived unique peptide for copper identification in aquatic samples ». In : *Microbial Cell Factories* 24.1 (2025), p. 11.

[67] E. H. KOH et al. « M13 bacteriophage/silver nanowire surface-enhanced raman scattering sensor for sensitive and selective pesticide detection ». In : *ACS Applied Materials & Interfaces* 10.12 (2018), p. 10388-10397.

[68] H. PENG et al. « Chimeric phage nanoparticles for rapid characterization of bacterial pathogens : detection in complex biological samples and determination of antibiotic sensitivity ». In : *ACS sensors* 5.5 (2020), p. 1491-1499.

[69] N. ABDELHAMIED et al. « Bacteriophage-based nano-biosensors for the fast impedimetric determination of pathogens in food samples ». In : *Scientific reports* 13.1 (2023), p. 3498.

[70] M. MEJRI et al. « Impedance biosensing using phages for bacteria detection : Generation of dual signals as the clue for in-chip assay confirmation ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 26.4 (2010), p. 1261-1267.

[71] K. HEILEMAN, J. DAOUD et M. TABRIZIAN. « Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 49 (2013), p. 348-359.

[72] Y. WHULANZA et al. « Sensing scaffolds to monitor cellular activity using impedance measurements ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 26.7 (2011), p. 3303-3308.

[73] I. P. THONUS, P. FONTIJNE et M. F. MICHEL. « Ampicillin susceptibility and ampicillin-induced killing rate of Escherichia coli ». In : *Antimicrobial agents and chemotherapy* 22.3 (1982), p. 386-390.

[74] P. O. BAGNANINCHI et N. DRUMMOND. « Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.16 (2011), p. 6462-6467.

[75] K. ASAMI, E. GHEORGHIU et T. YONEZAWA. « Real-time monitoring of yeast cell division by dielectric spectroscopy ». In : *Biophysical journal* 76.6 (1999), p. 3345-3348.

[76] W. BAI, K. ZHAO et K. ASAMI. « Effects of copper on dielectric properties of E. coli cells ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 58.2 (2007), p. 105-115.

[77] P. SWAMI et al. « Rapid antimicrobial susceptibility profiling using impedance spectroscopy ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 200 (2022), p. 113876.

[78] S. HAMEED, L. XIE et Y. YING. « Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science : A review ». In : *Trends in Food Science & Technology* 81 (2018), p. 61-73.

[79] P. SWAMI et al. « Impedance Spectroscopy for Bacterial Cell Monitoring, Analysis, and Antibiotic Susceptibility Testing ». In : *Langmuir* 40.42 (2024), p. 21907-21930.

[80] R. G. RAMIREZ-CHAVARRIA et al. « Time-constant-domain spectroscopy : an impedance-based method for sensing biological cells in suspension ». In : *IEEE Sensors Journal* 21.1 (2020), p. 185-192.

[81] S. LENOIR et al. « Pridopidine rescues BDNF/TrkB trafficking dynamics and synapse homeostasis in a Huntington disease brain-on-a-chip model ». In : *Neurobiology of Disease* 173 (2022), p. 105857.

[82] J.-C. GUTIÉRREZ et al. « Environmental biosensors : a microbiological view ». In : *Handbook of cell biosensors*. Springer, 2021, p. 455-476.

[83] X. LU et al. « Current research progress of mammalian cell-based biosensors on the detection of foodborne pathogens and toxins ». In : *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61.22 (2021), p. 3819-3835.

[84] P. BANERJEE et A. K. BHUNIA. « Cell-based biosensor for rapid screening of pathogens and toxins ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 26.1 (2010), p. 99-106.

[85] C. L. DAVEY, G. MARKX et D. B. KELL. « On the dielectric method of monitoring cellular viability ». In : *Pure and applied chemistry* 65.9 (1993), p. 1921-1926.

[86] J. S. CRANE et H. A. POHL. « A study of living and dead yeast cells using dielectrophoresis ». In : *Journal of the Electrochemical Society* 115.6 (1968), p. 584.

[87] F. J. IGLESIAS et al. « Dielectrophoretic properties of yeast cells dividing by budding and by transversal fission ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 804.2 (1984), p. 221-229.

[88] H. MARTIN-YKEN. « Yeast-based biosensors : current applications and new developments ». In : *Biosensors* 10.5 (2020), p. 51.

[89] M. LEHMANN et al. « Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using a novel Saccharomyces cerevisiae sensor ». In : *Biosensors and bioelectronics* 15.3-4 (2000), p. 211-219.

[90] R. HOLLIS, K. KILLHAM et L. GLOVER. « Design and application of a biosensor for monitoring toxicity of compounds to eukaryotes ». In : *Applied and environmental microbiology* 66.4 (2000), p. 1676-1679.

[91] J. M. RODRIGUEZ-PEÑA et al. « A yeast strain biosensor to detect cell wall-perturbing agents ». In : *Journal of biotechnology* 133.3 (2008), p. 311-317.

[92] S. RAVIKUMAR et al. « Construction of a bacterial biosensor for zinc and copper and its application to the development of multifunctional heavy metal adsorption bacteria ». In : *Process Biochemistry* 47.5 (2012), p. 758-765.

[93] D. FUTRA et al. « An optical biosensor from green fluorescent Escherichia coli for the evaluation of single and combined heavy metal toxicities ». In : *Sensors* 15.6 (2015), p. 12668-12681.

[94] N. E. VIROLAINEN et al. « Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria ». In : *Journal of agricultural and food chemistry* 56.23 (2008), p. 11065-11070.

[95] T. CHEN et al. « New methodologies in screening of antibiotic residues in animal-derived foods : Biosensors ». In : *Talanta* 175 (2017), p. 435-442.

[96] X. FAN et al. « Sensitive optical biosensors for unlabeled targets : A review ». In : *analytica chimica acta* 620.1-2 (2008), p. 8-26.

[97] M. HALMI et al. « Comparison of Microtox and Xenoassay light as a near real time river monitoring assay for heavy metals ». In : *The Scientific World Journal* 2014.1 (2014), p. 834202.

[98] T. YAMASAKI et al. « Development of a surface plasmon resonance-based immunosensor for detection of 10 major O-antigens on Shiga toxin-producing Escherichia coli, with a gel displacement technique to remove bound bacteria ». In : *Analytical chemistry* 88.13 (2016), p. 6711-6717.

[99] E. MAURIZ et al. « Single and multi-analyte surface plasmon resonance assays for simultaneous detection of cholinesterase inhibiting pesticides ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 118.1-2 (2006), p. 399-407.

[100] S. SABBAN. « Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity FcεRI receptor ». Thèse de doct. University of Sheffield, 2011.

[101] G. MARRAZZA. « Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides : a review ». In : *Biosensors* 4.3 (2014), p. 301-317.

[102] J. CAI et al. « Rapid parallelized and quantitative analysis of five pathogenic bacteria by ITS hybridization using QCM biosensor ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 155.2 (2011), p. 500-504.

[103] S. SANG et al. « A portable device for rapid detection of human serum albumin using an immunoglobulin-coating-based magnetoelastic biosensor ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 141 (2019), p. 111399.

[104] C. RUAN et al. « Magnetoelastic Immunosensors : Amplified Mass Immunosorbent Assay for Detection of Escherichia c oli O157 : H7 ». In : *Analytical Chemistry* 75.23 (2003), p. 6494-6498.

[105] J. SUI et al. « Electrical impedance as an indicator of microalgal cell health ». In : *Scientific reports* 10.1 (2020), p. 1251.

[106] P. B. LUPPA, L. J. SOKOLL et D. W. CHAN. « Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry ». In : *Clinica chimica acta* 314.1-2 (2001), p. 1-26.

[107] J. WANG. « Electrochemical biosensors : towards point-of-care cancer diagnostics ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 21.10 (2006), p. 1887-1892.

[108] M. R. ROMERO et al. « Amperometric biosensor for direct blood lactate detection ». In : *Analytical chemistry* 82.13 (2010), p. 5568-5572.

[109] J. D. BESANT, E. H. SARGENT et S. O. KELLEY. « Rapid electrochemical phenotypic profiling of antibiotic-resistant bacteria ». In : *Lab on a Chip* 15.13 (2015), p. 2799-2807.

[110] S. GABERLEIN, F. SPENER et C. ZABOROSCH. « Microbial and cytoplasmic membrane-based potentiometric biosensors for direct determination of organophosphorus insecticides ». In : *Applied microbiology and biotechnology* 54 (2000), p. 652-658.

[111] J. DING et W. QIN. « Recent advances in potentiometric biosensors ». In : *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 124 (2020), p. 115803.

[112] J. DING et al. « Potentiometric aptasensing of Listeria monocytogenes using protamine as an indicator ». In : *Analytical chemistry* 86.19 (2014), p. 9412-9416.

[113] Z. MUHAMMAD-TAHIR et E. C. ALOCILJA. « A conductometric biosensor for biosecurity ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 18.5-6 (2003), p. 813-819.

[114] C. CHOUTEAU et al. « Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell Chlorella vulgaris microalgae ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 19.9 (2004), p. 1089-1096.

[115] C. CHOUTEAU et al. « A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 21.2 (2005), p. 273-281.

[116] O. LAZCKA, F. J. DEL CAMPO et F. X. MUNOZ. « Pathogen detection : A perspective of traditional methods and biosensors ». In : *Biosensors and bioelectronics* 22.7 (2007), p. 1205-1217.

[117] A. AHMED et al. « Biosensors for whole-cell bacterial detection ». In : *Clinical microbiology reviews* 27.3 (2014), p. 631-646.

[118] G. N. ABDELRASOUL et al. « DNA aptamer-based non-faradaic impedance biosensor for detecting E. coli ». In : *Analytica Chimica Acta* 1107 (2020), p. 135-144.

[119] M. DWEIK et al. « Specific and targeted detection of viable Escherichia coli O157 :H7 using a sensitive and reusable impedance biosensor with dose and time response studies ». In : *Talanta* 94 (2012), p. 84-89. ISSN : 0039-9140.

[120] L. YAO et al. « A microfluidic impedance biosensor based on immunomagnetic separation and urease catalysis for continuous-flow detection of E. coli O157 : H7 ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 259 (2018), p. 1013-1021.

[121] H. KARIMI-MALEH et al. « A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 184 (2021), p. 113252.

[122] S. PUTTASWAMY et al. « Multi-frequency Microchannel Electrical Impedance (m-EIS) Method for the Rapid Detection of Proliferating Microorganisms, and their Rapid Quantification. » In : *Journal of Pure and Applied Microbiology* 11.3 (2017).

[123] T. ZHU et al. « Detection of bacterial cells by impedance spectra via fluidic electrodes in a microfluidic device ». In : *Lab on a Chip* 10.12 (2010), p. 1557-1560.

[124] R. GOMEZ, R. BASHIR et A. K. BHUNIA. « Microscale electronic detection of bacterial metabolism ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 86.2-3 (2002), p. 198-208.

[125] K. KADAN-JAMAL et al. « Electrical Impedance Spectroscopy of plant cells in aqueous biological buffer solutions and their modelling using a unified electrical equivalent circuit over a wide frequency range : 4Hz to 20 GHz ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 168 (2020), p. 112485.

[126] E. AMAKO et al. « Estimation of metabolic characteristics of heat-injured bacteria by dielectrophoretic impedance measurement ». In : *Electronics and Communications in Japan* 94.2 (2011), p. 9-16.

[127] C. T. BOT et C. PRODAN. « Quantifying the membrane potential during E. coli growth stages ». In : *Biophysical chemistry* 146.2-3 (2010), p. 133-137.

[128] G. ROSATI et al. « Inkjet printed interdigitated biosensor for easy and rapid detection of bacteriophage contamination : A preliminary study for milk processing control applications ». In : *Chemosensors* 7.1 (2019), p. 8.

[129] A. MORTARI, A. ADAMI et L. LORENZELLI. « An unconventional approach to impedance microbiology : detection of culture media conductivity variations due to bacteriophage generated lyses of host bacteria ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 67 (2015), p. 615-620.

[130] Z. LI et al. « A novel renewable electrochemical biosensor based on mussel-inspired adhesive protein for the detection of Escherichia coli O157 : H7 in food ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 372 (2022), p. 132601.

[131] M. B. DOS SANTOS et al. « Highly sensitive detection of pathogen Escherichia coli O157 : H7 by electrochemical impedance spectroscopy ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 45 (2013), p. 174-180.

[132] S. G. DASTIDER et al. « A micromachined impedance biosensor for accurate and rapid detection of E. coli O157 : H7 ». In : *RSC advances* 3.48 (2013), p. 26297-26306.

[133] R. DE LA RICA et al. « Selective detection of live pathogens via surface-confined electric field perturbation on interdigitated silicon transducers ». In : *Analytical chemistry* 81.10 (2009), p. 3830-3835.

[134] C. SHI et al. « Capture and detection of Escherichia coli with graphene aerogels ». In : *Journal of Materials Chemistry B* 10.40 (2022), p. 8211-8217.

[135] R. WANG et al. « A label-free impedance immunosensor using screen-printed interdigitated electrodes and magnetic nanobeads for the detection of E. coli O157 : H7 ». In : *Biosensors* 5.4 (2015), p. 791-803.

[136] P. GENG et al. « Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of Escherichia coli using electrochemical impedance spectroscopy ». In : *Electrochimica Acta* 53.14 (2008), p. 4663-4668.

[137] M. DWEIK et al. « Specific and targeted detection of viable Escherichia coli O157 : H7 using a sensitive and reusable impedance biosensor with dose and time response studies ». In : *Talanta* 94 (2012), p. 84-89.

[138] L. WANG et al. « An electrochemical aptasensor using coaxial capillary with magnetic nanoparticle, urease catalysis and PCB electrode for rapid and sensitive detection of Escherichia coli O157 : H7 ». In : *Nanotheranostics* 1.4 (2017), p. 403.

[139] F.-D. MUNTEANU et al. « Detection of antibiotics and evaluation of antibacterial activity with screen-printed electrodes ». In : *Sensors* 18.3 (2018), p. 901.

[140] R. DOMINGO-ROCA et al. « Rapid assessment of antibiotic susceptibility using a fully 3D-printed impedance-based biosensor ». In : *Biosensors and Bioelectronics : X* 13 (2023), p. 100308.

[141] W. YE et al. « Rapid and sensitive detection of bacteria response to antibiotics using nanoporous membrane and graphene quantum dot (GQDs)-based electrochemical biosensors ». In : *Materials* 10.6 (2017), p. 603.

[142] M. SAFAVIEH et al. « Rapid real-time antimicrobial susceptibility testing with electrical sensing on plastic microchips with printed electrodes ». In : *ACS applied materials and interfaces* 9.14 (2017), p. 12832-12840.

[143] S. BROSEL-OLIU et al. « 3D impedimetric sensors as a tool for monitoring bacterial response to antibiotics ». In : *Lab on a Chip* 19.8 (2019), p. 1436-1447.

[144] C. D. ABEYRATHNE et al. « Lab on a chip sensor for rapid detection and antibiotic resistance determination of Staphylococcus aureus ». In : *Analyst* 141.6 (2016), p. 1922-1929.

[145] D. SPENCER et al. « Electrical Broth Micro-Dilution for Rapid Antibiotic Resistance Testing ». In : *ACS sensors* 8.3 (2023), p. 1101-1108.

[146] G. H. MARKX et D. B. KELL. « Dielectric spectroscopy as a tool for the measurement of the formation of biofilms and of their removal by electrolytic cleaning pulses and biocides ». In : *Biofouling* 2.3 (1990), p. 211-227.

[147] R. KARGUPTA et al. « Detection by death : A rapid way to detect viable slow-growing microorganisms achieved using microchannel Electrical Impedance Spectroscopy (m-EIS) ». In : *Technology* 6.01 (2018), p. 24-35.

[148] J. PARK et al. « Interdigitated and wave-shaped electrode-based capacitance sensor for monitoring antibiotic effects ». In : *Sensors* 20.18 (2020), p. 5237.

[149] D. KIM et S. YOO. « Electrochemical sensors for antibiotic susceptibility testing : Strategies and applications ». In : *Chemosensors* 10.2 (2022), p. 53.

[150] G. FLORES-COSIO et al. « Application of dielectric spectroscopy to unravel the physiological state of microorganisms : Current state, prospects and limits ». In : *Applied Microbiology and Biotechnology* 104.14 (2020), p. 6101-6113.

[151] K. SYAL et al. « Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests ». In : *Theranostics* 7.7 (2017), p. 1795.

[152] K. SYAL et al. « Rapid antibiotic susceptibility testing of uropathogenic E. coli by tracking submicron scale motion of single bacterial cells ». In : *ACS sensors* 2.8 (2017), p. 1231-1239.

[153] S. HANNAH et al. « Development of a rapid, antimicrobial susceptibility test for E. coli based on low-cost, screen-printed electrodes ». In : *Biosensors* 10.11 (2020), p. 153.

[154] M. GARDIES. « Capteur photonique intégré sur verre pour la détection de viabilité bactérienne en milieu aqueux pollué ». s366124. Thèse de doct. 2024.

[155] M. VINDRET. « Etude de l'effet des champs électriques alternatifs de faible amplitude et de l'effet bioélectrique sur la croissance des bactéries : développement d'un dispositif combiné de traitement et d'analyse électrique de suspensions bactériennes ». Thèse de doct. Université Grenoble Alpes [2020-....], 2021.

[156] E. S. BARGHOORN et J. W. SCHOPF. « Microorganisms three billion years old from the Precambrian of South Africa ». In : *Science* 152.3723 (1966), p. 758-763.

[157] A. L. HUGHES. « La reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes, Pierre Darlu and Pascal Tassy. Masson, Paris. xv+ 245 pp. Paperback, 190 Francs (in French). » In : *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3.3 (1994), p. 280-280.

[158] C. R. WOESE, O. KANDLER et M. L. WHEELIS. « Towards a natural system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. » In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87.12 (1990), p. 4576-4579.

[159] A. ZHIVICH. « Fighting bacterial resistance : approaches, challenges, and opportunities in the search for new antibiotics. Part 1. Antibiotics used in clinical practice : mechanisms of action and the development of bacterial resistance ». In : *Microbiology Independent Research Journal* 4.1 (2017), p. 31-51.

[160] N. BOUGON. « L'influence des circulations hydrologiques sur la structure des communautés bactériennes à l'interface sol-nappe ». Thèse de doct. Université Rennes 1, 2007.

[161] A. PUGSLEY. « The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria ». In : *Microbiological reviews* 57.1 (1993), p. 50-108.

[162] S. J. SINGER et G. L. NICOLSON. « The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes : Cell membranes are viewed as two-dimensional solutions of oriented globular proteins and lipids. » In : *Science* 175.4023 (1972), p. 720-731.

[163] N. PSYCHOGIOS et J.-B. REGNOUF-DE-VAINS. « A new water-soluble ligand based on a calix arene substituted by 2, 2-bipyridine chelating units ». In : *Tetrahedron Letters* 42.15 (2001), p. 2799-2800.

[164] H. FELLE et al. « Quantitative measurements of membrane potential in Escherichia coli ». In : *Biochemistry* 19.15 (1980), p. 3585-3590.

[165] L.-M. DITU et al. « Antimicrobial and Antibiofilm Properties of Nanocomposite Surfaces with Biomedical Applications ». In : (2024).

[166] H. C. van der MEI et H. J. BUSSCHER. « Electrostatic interactions in bacterial adhesion ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 21.1-3 (2001), p. 161-170. DOI : 10.1016/S0927-7765(01)00257-5.

[167] B. LI et B. E. LOGAN. « Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 36.2 (2004), p. 81-90. DOI : 10.1016/j.colsurfb.2004.05.006.

[168] W. W. WILSON et al. « Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements ». In : *Journal of Microbiological Methods* 43.3 (2001), p. 153-164. DOI : 10.1016/S0167-7012(00)00224-4.

[169] S. FOWLER, R. ROUSH et J. WISE. *Concepts of Biology (Section 6.4 : Prokaryotic Cell Division)*. CC BY : Attribution. Figure 6.9 : "The binary fission of a bacterium is outlined in five steps. (credit : modification of work by "Mcstrother"/Wikimedia Commons)". 2013. URL : https://openstax.org/books/concepts-biology/pages/6-4-prokaryotic-cell-division.

[170] G. BERTANI. « Studies on lysogenesis I : the mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli ». In : *Journal of bacteriology* 62.3 (1951), p. 293-300.

[171] A. T GARRISON et R. W HUIGENS III. « Eradicating bacterial biofilms with natural products and their inspired analogues that operate through unique mechanisms ». In : *Current topics in medicinal chemistry* 17.17 (2017), p. 1954-1964.

[172] G. SEZONOV, D. JOSELEAU-PETIT et R. D'ARI. « Escherichia coli physiology in luria-bertani broth ». In : *Journal of Bacteriology* 189.23 (2007), p. 8746-8749. DOI : 10.1128/JB.01368-07.

[173] P. L. MCNEIL et M. TERASAKI. « Coping with the inevitable : how cells repair a torn surface membrane ». In : *Nature cell biology* 3.5 (2001), E124-E129.

[174] A. S. KAPRELYANTS, J. C. GOTTSCHAL et D. B. KELL. « Dormancy in non-sporulating bacteria ». In : *FEMS microbiology letters* 104.3-4 (1993), p. 271-285.

[175] D. B. KELL et al. « Viability and activity in readily culturable bacteria : a review and discussion of the practical issues ». In : *Antonie Van Leeuwenhoek* 73 (1998), p. 169-187.

[176] L. CABON, A.-C. MARTINEZ-TORRES et S. A. SUSIN. « La mort cellulaire programmee ne manque pas de vocabulaire ». In : *médecine/sciences* 29.12 (2013), p. 1117-1124.

[177] P. SEEMAN. « The membrane actions of anesthetics and tranquilizers ». In : *Pharmacol rev* 24.4 (1972), p. 583-655.

[178] X.-F. ZHOU, G. H. MARKX et R. PETHIG. « Effect of biocide concentration on electrorotation spectra of yeast cells ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1281.1 (1996), p. 60-64.

[179] X. ZHOU, J. BURT et R. PETHIG. « Automatic cell electrorotation measurements : studies of the biological effects of low-frequency magnetic fields and of heat shock ». In : *Physics in Medicine Biology* 43.5 (1998), p. 1075.

[180] Y. HUANG et al. « Differences in the AC electrodynamics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies ». In : *Physics in Medicine and Biology* 37.7 (1992), p. 1499.

[181] H. LI et al. « Differentiation of live and heat-killed E. coli by microwave impedance spectroscopy ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 255 (2018), p. 1614-1622.

[182] K. ASAMI. « Low-frequency dielectric dispersion of bacterial cell suspensions ». In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 119 (2014), p. 1-5.

[183] R. HOLZEL. « Non-invasive determination of bacterial single cell properties by electrorotation ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1450.1 (1999), p. 53-60.

[184] R. MATANGUIHAN, K. KONSTANTINOV et T. YOSHIDA. « Dielectric measurement to monitor the growth and the physiological states of biological cells ». In : *Bioprocess Engineering* 11 (1994), p. 213-222.

[185] S. DESPA. « The influence of membrane permeability for ions on cell behaviour in an electric alternating field ». In : *Physics in Medicine and Biology* 40.9 (1995), p. 1399.

[186] C. L. DAVEY et al. « Introduction to the dielectric estimation of cellular biomass in real time, with special emphasis on measurements at high volume fractions ». In : *Analytica Chimica Acta* 279.1 (1993), p. 155-161.

[187] D. B. KELL et al. « Real-time monitoring of cellular biomass : methods and applications ». In : *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 9.6 (1990), p. 190-194.

[188] D. B. KELL et C. M. HARRIS. « Dielectric spectroscopy and membrane organisation ». In : *Journal of Bioelectricity* 4.2 (1985), p. 317-348.

[189] G. J. SALTER et D. B. KELT. « Solvent selection for whole cell biotransformations in organic media ». In : *Critical Reviews in Biotechnology* 15.2 (1995), p. 139-177.

[190] S. PUTTASWAMY et al. « Novel electrical method for the rapid determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and assay of bactericidal/bacteriostatic activity ». In : *J Biosens Bioelectron S* 2.003 (2012).

[191] S. NIYOMDECHA et al. « Capacitive antibacterial susceptibility screening test with a simple renewable sensing surface ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 96 (2017), p. 84-88.

[192] K. F. HOETTGES, J. W. DALE et M. P. HUGHES. « Rapid determination of antibiotic resistance in E. coli using dielectrophoresis ». In : *Physics in Medicine & Biology* 52.19 (2007), p. 6001.

[193] K. ASAMI. « Effects of membrane disruption on dielectric properties of biological cells ». In : *Journal of Physics D : Applied Physics* 39.21 (2006), p. 4656.

[194] A. CASS, A. FINKELSTEIN et V. KRESPI. « The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B ». In : *The journal of general physiology* 56.1 (1970), p. 100-124.

[195] P. LAMBERT. « Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria ». In : *Journal of applied microbiology* 92.s1 (2002), 46S-54S.

[196] H. LIU et al. « Chitosan kills bacteria through cell membrane damage ». In : *International journal of food microbiology* 95.2 (2004), p. 147-155.

[197] S. P. DENYER et J.-Y. MAILLARD. « Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria ». In : *Journal of applied microbiology* 92.s1 (2002), 35S-45S.

[198] J. KIEPS, W. JUZWA et R. DEMBCZYNSKI. « Imaging flow cytometry demonstrates physiological and morphological diversity within treated probiotic bacteria groups ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 24.7 (2023), p. 6841.

[199] J. S. SIMMONS. « A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi ». In : *The Journal of Infectious Diseases* (1926), p. 209-214.

[200] M. SAMANDARI et al. « Measurement of ampicillin and penicillin G antibiotics in wastewater treatment plants during the COVID-19 pandemic : A case study in Isfahan ». In : *Environmental Health Engineering and Management Journal* 9.3 (2022), p. 201-211.

[201] S. CHOPRA, D. DALE et A. BLACKWOOD. « Effect of ampicillin on E. Coli of swine origin ». In : *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 27.9 (1963), p. 223.

[202] S. I. POLIANCIUC et al. « Antibiotics in the environment : causes and consequences ». In : *Medicine and pharmacy reports* 93.3 (2020), p. 231.

[203] R. B. de SOUZA et J. R. GUIMARÃES. « Effects of avermectins on the environment based on its toxicity to plants and soil invertebrates—a review ». In : *Water, Air, & Soil Pollution* 233.7 (2022), p. 259.

[204] COLLÈGE NATIONAL DE PHARMACOLOGIE MÉDICALE (CNPM). *Bêta-lactamines (pénicillines – céphalosporines)*. https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/beta-lactamines-penicillines-cephalosporines. Consulté le 5 juin 2025. 2025.

[205] I. HOTSON. « The avermectins : A new family of antiparasitic agents ». In : *Journal of the South African Veterinary Association* 53.2 (1982), p. 87-90.

[206] I. HOTSON. « The avermectins : a new family of antiparasitic agents ». In : *Journal of the South African Veterinary Association* 53.2 (1982), p. 87-90. DOI : 10.10520/AJA00382809_2579. eprint : https://journals.co.za/doi/pdf/10.10520/AJA00382809_2579. URL : https://journals.co.za/doi/abs/10.10520/AJA00382809_2579.

[207] F. BRUYÈRE et al. « Les médicaments anti-infectieux non antibiotiques en urologie ». In : *Progrès en urologie* 23.15 (2013), p. 1342-1356.

[208] G. LEYRAL et al. *Activités technologiques en microbiologie*. français. Bordeaux, France : Canopé - CRDP de Bordeaux, 2000, p. 158. ISBN : 9782866172947.

[209] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Mueller Hinton Agar (Remel) – Instructions for Use*. Accessed : 2025-08-22. Thermo Fisher Scientific. 2018. URL : https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/IFU454081.pdf.

[210] S. ASHRAF et al. « In vitro activity of ivermectin against Staphylococcus aureus clinical isolates ». In : *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 7.1 (2018), p. 1-6.

[211] S. MUHAMMED AMEEN et M. DRANCOURT. « Ivermectin lacks antituberculous activity ». In : *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68.8 (2013), p. 1936-1937.

[212] P. T. LEALI et A. MEROLLI. « Fundamentals of biomaterials ». In : *Biomaterials in Hand Surgery* (2009), p. 1-11.

[213] J. NOYCE, H. MICHELS et C. KEEVIL. « Use of copper cast alloys to control Escherichia coli O157 cross-contamination during food processing ». In : *Applied and environmental microbiology* 72.6 (2006), p. 4239-4244.

[214] M. GROSSI et B. RICCÒ. « Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization : A review ». In : *Journal of sensors and sensor systems* 6.2 (2017), p. 303-325.

[215] K. ASAMI et al. « Dielectric analysis of mitochondria isolated from rat liver I. swollen mitoplasts as simulated by a single-shell model ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 778.3 (1984), p. 559-569.

[216] Y.-H. KIM, J.-S. PARK et H.-I. JUNG. « An impedimetric biosensor for real-time monitoring of bacterial growth in a microbial fermentor ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 138.1 (2009), p. 270-277.

[217] C. PRODAN et al. « Low-frequency, low-field dielectric spectroscopy of living cell suspensions ». In : *Journal of applied physics* 95.7 (2004), p. 3754-3756.

[218] C. BOT et C. PRODAN. « Probing the membrane potential of living cells by dielectric spectroscopy ». In : *European Biophysics Journal* 38.8 (2009), p. 1049-1059.

[219] V. TSOUTI et al. « Capacitive microsystems for biological sensing ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 27.1 (2011), p. 1-11.

[220] P. VAN GERWEN et al. « Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 49.1-2 (1998), p. 73-80.

[221] R. PETHIG. « Dielectrophoresis : using inhomogeneous AC electrical fields to separate and manipulate cells ». In : *Critical reviews in biotechnology* 16.4 (1996), p. 331-348.

[222] G. H. MARKX et R. PETHIG. « Dielectrophoretic separation of cells : Continuous separation ». In : *Biotechnology and bioengineering* 45.4 (1995), p. 337-343.

[223] A. PANDEY et al. « Graphene-interfaced electrical biosensor for label-free and sensitive detection of foodborne pathogenic E. coli O157 : H7 ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 91 (2017), p. 225-231.

[224] J. SAULNIER, C. JOSE et F. LAGARDE. « Electrochemical techniques for label-free and early detection of growing microbial cells and biofilms ». In : *Bioelectrochemistry* 155 (2024), p. 108587.

[225] A. DE LEÓN-HERNÁNDEZ et al. « Effective Capacitance from Equivalent Electrical Circuit as a Tool for Monitoring Non-Adherent Cell Suspensions at Low Frequencies ». In : *Bioengineering* 9.11 (2022), p. 697.

[226] K.-S. LEE et al. « Early detection of bacteria in the lag phase using the distribution of relaxation times analysis ». In : *Electrochimica Acta* 524 (2025), p. 145973.

[227] W. BAI, K. ZHAO et K. ASAMI. « Dielectric properties of E. coli cell as simulated by the three-shell spheroidal model ». In : *Biophysical chemistry* 122.2 (2006), p. 136-142.

[228] K. KUPFER. *Electromagnetic aquametry : Electromagnetic wave interaction with water and moist substances*. Springer Science & Business Media, 2006.

[229] P. JACOBS, A. VARLAN et W. SANSEN. « Design optimisation of planar electrolytic conductivity sensors ». In : *Medical and Biological Engineering and Computing* 33.6 (1995), p. 802-810.

[230] W. OLTHUIS, W. STREEKSTRA et P. BERGVELD. « Theoretical and experimental determination of cell constants of planar-interdigitated electrolyte conductivity sensors ». In : *Sensors and Actuators B : Chemical* 24.1-3 (1995), p. 252-256.

[231] R. EHRET et al. « Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 12.1 (1997), p. 29-41.

[232] N. F. SHEPPARD, R. C. TUCKER et C. WU. « Electrical conductivity measurements using microfabricated interdigitated electrodes ». In : *Analytical Chemistry* 65.9 (1993), p. 1199-1202.

[233] M. C. ZARETSKY, L. MOUAYAD et J. R. MELCHER. « Continuum properties from interdigital electrode dielectrometry ». In : *IEEE Transactions on Electrical Insulation* 23.6 (1988), p. 897-917.

[234] K. SETTU et al. « Concept for E. coli detection using interdigitated microelectrode impedance sensor ». In : *2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*. IEEE. 2013, p. 1712-1715.

[235] M. IBRAHIM et al. « Geometric parameters optimization of planar interdigitated electrodes for bioimpedance spectroscopy ». In : *Journal of Electrical Bioimpedance* 4.1 (2013), p. 13-22.

[236] N. GALOPIN. « Finite element modeling of magnetoelectric composites with interdigitated electrodes ». In : *Proc. 20th Int. Conf. Comput. Electromagn. Fields (COMPUMAG)*. 2015, p. 114.

[237] B. NARAKATHU, M. ATASHBAR et B. BEJCEK. « Improved detection limits of toxic biochemical species based on impedance measurements in electrochemical biosensors ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 26.2 (2010), p. 923-928.

[238] J. R. MACDONALD. « Impedance spectroscopy : old problems and new developments ». In : *Electrochimica Acta* 35.10 (1990), p. 1483-1492.

[239] D. R. FRANCESCHETTI et J. R. MACDONALD. « Electrode kinetics, equivalent circuits, and system characterization : Small-signal conditions ». In : *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 82.1-2 (1977), p. 271-301.

[240] J. R. MACDONALD. « Impedance spectroscopy ». In : *Annals of biomedical engineering* 20 (1992), p. 289-305.

[241] J. R. VARCOE et al. « Anion-exchange membranes in electrochemical energy systems ». In : *Energy & environmental science* 7.10 (2014), p. 3135-3191.

[242] V. ARTEMOV, A. VOLKOV et N. SYSOEV. « Conductivity of aqueous HCl, NaOH and NaCl solutions : Is water just a substrate ? » In : *Europhysics Letters* 109.2 (2015), p. 26002.

[243] L. F. LIMA et al. « Electric impedance of aqueous KCl and NaCl solutions : Salt concentration dependence on components of the equivalent electric circuit ». In : *Journal of molecular liquids* 241 (2017), p. 530-539.

[244] D. RAULY et al. « Stochastic Approach for EM Modelling of Suspended Bacterial Cells with Non-uniform Geometry and Orientation Distribution ». In : *Progress In Electromagnetics Research Symposium*. 2015.

[245] P. XAVIER et al. « Theoretical evidence of maximum intracellular currents versus frequency in an Escherichia coli cell submitted to AC voltage ». In : *Bioelectromagnetics* 38.3 (2017), p. 213-219.

[246] K. ASAMI, T. HANAI et N. KOIZUMI. « Dielectric analysis of Escherichia coli suspensions in the light of the theory of interfacial polarization ». In : *Biophysical journal* 31.2 (1980), p. 215-228.

[247] M. LA et al. « Competitive impedimetric aptasensors for detection of small molecule pollutants by the signal amplification of self-assembled biotin-phenylalanine nanoparticle networks ». In : *Electrochemistry Communications* 118 (2020), p. 106791.

[248] B. A. BOUKAMP. « Distribution (function) of relaxation times, successor to complex nonlinear least squares analysis of electrochemical impedance spectroscopy ? » In : *Journal of Physics : Energy* 2.4 (2020), p. 042001.

[249] A. FRANKLIN et H. DE BRUIN. « The fourier analysis of impedance spectra for electroded solid electrolytes ». In : *physica status solidi (a)* 75.2 (1983), p. 647-656.

[250] E. IVERS-TIFFEE et A. WEBER. « Evaluation of electrochemical impedance spectra by the distribution of relaxation times ». In : *Journal of the Ceramic Society of Japan* 125.4 (2017), p. 193-201.

[251] C. PLANK et al. « A review on the distribution of relaxation times analysis : A powerful tool for process identification of electrochemical systems ». In : *Journal of Power Sources* 594 (2024), p. 233845.

[252] C. SHENG et al. « Diagnosing the SEI layer in a potassium ion battery using distribution of relaxation time ». In : *The Journal of Physical Chemistry Letters* 12.8 (2021), p. 2064-2071.

[253] R. HE et al. « Comparative analysis for commercial li-ion batteries degradation using the distribution of relaxation time method based on electrochemical impedance spectroscopy ». In : *Energy* 263 (2023), p. 125972.

[254] F. CIUCCI et C. CHEN. « Analysis of electrochemical impedance spectroscopy data using the distribution of relaxation times : A Bayesian and hierarchical Bayesian approach ». In : *Electrochimica Acta* 167 (2015), p. 439-454.

[255] J. LIU, T. H. WAN et F. CIUCCI. « A Bayesian view on the Hilbert transform and the Kramers-Kronig transform of electrochemical impedance data : Probabilistic estimates and quality scores ». In : *Electrochimica Acta* 357 (2020), p. 136864.

[256] B. A. BOUKAMP et A. ROLLE. « Analysis and Application of Distribution of Relaxation Times in Solid State Ionics ». In : *Solid State Ionics* 302 (2017), p. 12-18.

[257] B. A. BOUKAMP et A. ROLLE. « Analysis and application of distribution of relaxation times in solid state ionics ». In : *Solid state ionics* 302 (2017), p. 12-18.

[258] A. KULIKOVSKY. « PEM fuel cell distribution of relaxation times : a method for the calculation and behavior of an oxygen transport peak ». In : *Physical Chemistry Chemical Physics* 22.34 (2020), p. 19131-19138.

[259] V. YRJÄNÄ. « DearEIS-A GUI program for analyzing impedance spectra ». In : *Journal of Open Source Software* 7.80 (2022), p. 4808.

[260] M. B. EFFAT et F. CIUCCI. « Bayesian and Hierarchical Bayesian Based Regularization for Deconvolving the Distribution of Relaxation Times from Electrochemical Impedance Spectroscopy Data ». In : *Electrochimica Acta* 247 (2017), p. 1117-1129.

[261] M. DEGHELT et al. « Peptidoglycan–outer membrane attachment generates periplasmic pressure to prevent lysis in Gram-negative bacteria ». In : *Nature microbiology* 10.8 (2025), p. 1963-1974.

[262] R. LAING, V. GILLAN et E. DEVANEY. « Ivermectin–old drug, new tricks ? » In : *Trends in parasitology* 33.6 (2017), p. 463-472.

[263] K. ASAMI et T. YONEZAWA. « Dielectric behavior of wild-type yeast and vacuole-deficient mutant over a frequency range of 10 kHz to 10 GHz ». In : *Biophysical journal* 71.4 (1996), p. 2192-2200.

[264] D. EHGARTNER et al. « A novel real-time method to estimate volumetric mass biodensity based on the combination of dielectric spectroscopy and soft-sensors ». In : *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90.2 (2015), p. 262-272.

[265] R. FEHRENBACH, M. COMBERBACH et J. PETRE. « On-line biomass monitoring by capacitance measurement ». In : *Journal of biotechnology* 23.3 (1992), p. 303-314.

[266] K. KIVIHARJU et al. « On-line biomass measurements in bioreactor cultivations : comparison study of two on-line probes ». In : *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34.8 (2007), p. 561-566.

[267] B.-Y. CHANG et S.-M. PARK. « Electrochemical impedance spectroscopy ». In : *Annual Review of Analytical Chemistry* 3.1 (2010), p. 207.

[268] L. YANG, C. RUAN et Y. LI. « Detection of viable Salmonella typhimurium by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance ». In : *Biosensors and Bioelectronics* 19.5 (2003), p. 495-502.

[269] C. J. FELICE et al. « Impedance bacteriometry : medium and interface contributions during bacterial growth ». In : *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 39.12 (1992), p. 1310-1313.

Publications et conférences

Publication dans une revue à comité de lecture

— **Antoine Rico**, Pascal Xavier, Elise Ghibaudo, Leticia Gimeno. *Bacteria-based Electrochemical Impedance water toxicity biosensor*. (Article soumis en Mars 2024).

Conférences nationales et internationales sans actes

— **Antoine Rico**, Pascal Xavier, Elise Ghibaudo, Leticia Gimeno. *Bacteria-based Electrochemical Impedance water toxicity biosensor*. Biosensor Elsevier, Mai 2025, Lisbon, Protugal.

— **Antoine Rico**, Pascal Xavier, Elise Ghibaudo, Leticia Gimeno. *Bacteria-based Electrochemical Impedance water toxicity biosensor*. BioEM, Juin 2025, Rennes, France.

Colloques et séminaires (sans actes)

— **Antoine Rico**, Pascal Xavier, Elise Ghibaudo, Leticia Gimeno, Hasnaa Haidar. *Detection of Escherichia coli with planar electrodes, an analysis by EIS and DRT*. 5ème Workshop IEEE Sensors France, Juin 2024, Grenoble, France. hal-04939765

— **Antoine Rico**. *Détecteur impédancemétrique et intégré sur verre de pollution de l'eau*. Journées Fédération des Micro et Nanotechnologies (FMNT), 2024, Grenoble, France.

A

Résultat complémentaire de la CMI de L'Ivermectine sur *Escherichia coli*

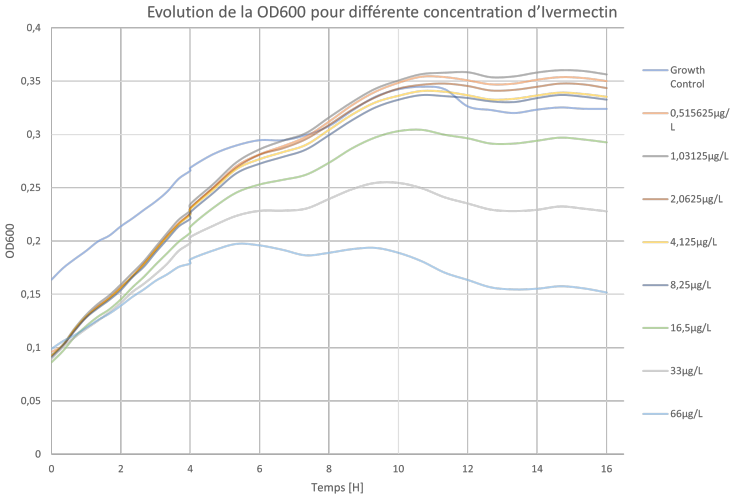


FIGURE A.1 – *Evolution de la Densité Optique à* 600 *nm dans le temps en fonction de la concentration d'Ivermectine mis au contact de E.coli.*

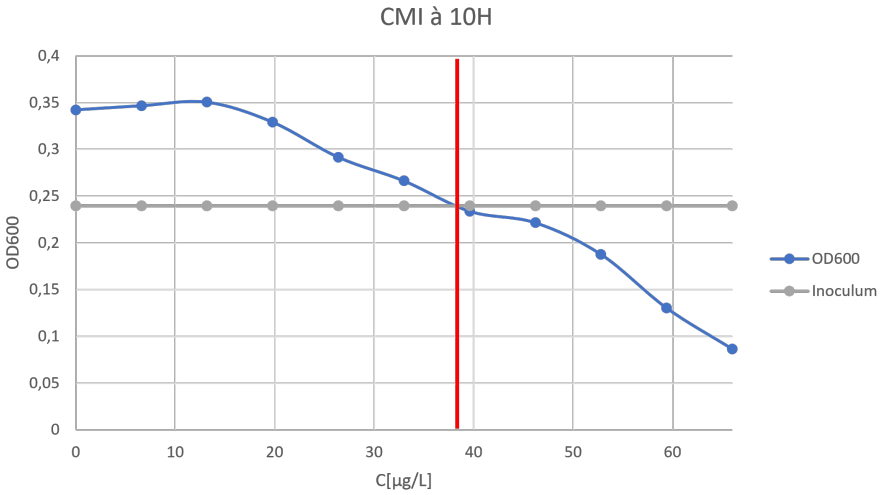


FIGURE A.2 – *Analyse de la Concentration Minimal d'Inhibtion (CMI) de l'Ivermectine sur E.coli au bout de 10 heures.*

B

Condition expérimentale

Sommaire

4.1 Protocole de préparation bactérien 100
4.2 Détection de bactéries E.coli dans des solutions de contrôle 101
4.2.1 Analyse du module et de la phase de l'impédance 101
4.2.2 Propriétés diélectriques 104
4.2.3 Analyse par la méthode DRT 106
4.3 Mesure de solutions polluées 109
4.3.1 Pollution par l'Ampicilline 109
4.3.2 Pollution par l'Ivermectine 116
4.4 Cas du prototype intégrant des électrodes interdigitées 122
4.4.1 Analyse par impédance et régression 123
4.4.2 Analyse par DRT 126

Influence des défauts de planéité La sensibilité aux variations mécaniques de notre dispositif doit être prise en compte. En effet, les échantillons liquides à analyser doivent être posés sur des électrodes désinfectées, ce qui nécessite de d'écarter les deux électrodes avant chaque mesure. Cette contrainte peut entraîner des défauts de parallélisme qui impactent la valeur de la capacité et donc la confiance dans la mesure. L'étude de cet impact a donc été mené. La méthode employée pour l'évaluer est proposée schématiquement sur la figure B.1.

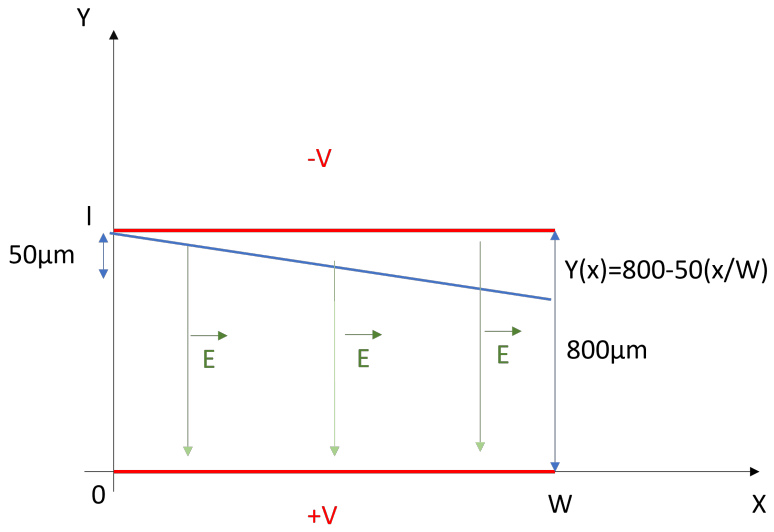


FIGURE B.1 – *représentation d'une capacité idéale et d'un défaut de parallélisme*

La figure B.1 représente une vue en coupe (x,y) des deux électrodes. Afin de simplifier l'étude, on suppose que le problème est invariant selon la direction z. L'électrode du bas est supposée fixe tandis que l'électrode du haut est soit positionnée de manière idéale, parallèle à la première électrode (configuration en rouge), soit inclinée (configuration en bleu). Les dimensions indiquées sur la figure correspondent aux dimensions du dispositif mésoscopique fabriqué

La capacité totale peut se décomposer comme la somme de toute les capacités élémentaires discrétisées selon la direction x.

$$C_{tot} = \sum \Delta C \tag{B.1}$$

Cela est représenté par une intégration sur la longueur des différentes capacités.

$$C_{tot} = \int_0^W C dx \tag{B.2}$$

$$C_{tot} = \int_0^W \varepsilon_0 \frac{S}{y(x)} dx \tag{B.3}$$

Avec S la surface de l'électrode dans le plan (x,z) et y(x) son épaisseur à la cote x. Dans notre cas présent, les électrodes sont espacées de $h = 800\,\mu m$. Dans le cas d'une électrode supérieure inclinée, on peut ainsi définir $y(x)$ à l'aide d'une droite ayant comme coéfficient directeur P comme valant :

$$y(x) = h - P * (\frac{x}{W}) \tag{B.4}$$

L'évolution de la différence de capacités en fonction de la pente est représentée sur la figure B.2 et cela uniquement pour des électrodes de $2.5\,cm \times 2.5\,cm$. Nous avons mesuré en pratique des

variations de hauteur inférieures à $50\,\mu m$ ce qui correspond à une pente de 2% variation de moins de 3% sur la capacité.

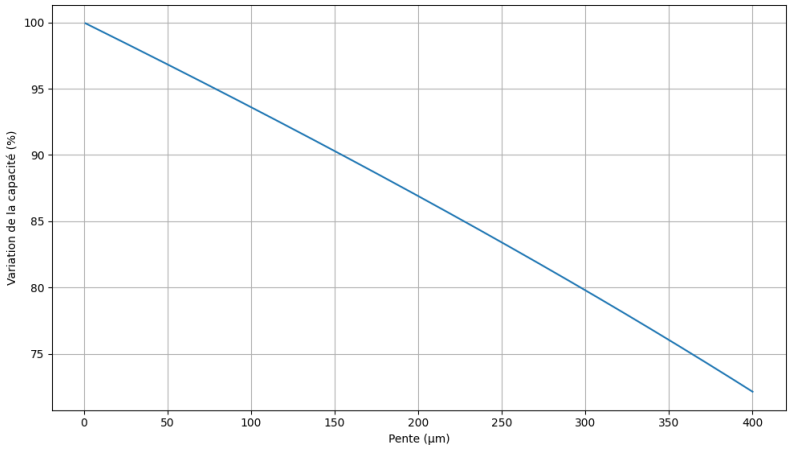


FIGURE B.2 – *Variation de la capacité en fonction de la pente du défaut de parallélisme pour un système à électrodes en vis-à-vis*

L'évolution de la différence de capacités en fonction de la pente est représentée sur la figure B.2 et cela uniquement pour des électrodes de $2.5\,cm \times 2.5\,cm$. Nous avons mesuré en pratique des variations de hauteur inférieures à $50\,\mu m$ ce qui correspond à une pente de 2% variation de moins de 3% sur la capacité.

Cette contribution reste donc marginale au regard des autres sources d'incertitude expérimentales et biologiques considérées dans ce travail. Le bridage mécanique par pinces et cales en verre poncées garantit par ailleurs une reproductibilité suffisante. Nous négligerons ainsi, dans la suite, la correction spécifique liée au non-parallélisme des plaques. Enfin, les comparaisons inter-mesures s'effectueront à géométrie identique, assurant que l'éventuel biais résiduel est commun à l'ensemble des acquisitions.

Condition expérimentale pour la tension

[264] suivi de la permittivité en terme de biomass dans le temps [265] suivi de la capacitié en terme de biomass et dans le temsp [184] pareil mais à une fréquence fixe [266] pareil avec comparaison OD

Modèle par plage de fréquence De nombreux modèles électroniques existent pour analyser le milieu cible [124][267]. Il s'agit d'une capacité en parallèle avec une résistance et en série avec une impédance d'interface avec l'électrode nommé impédance de Warburg. Le tout est en série avec une résistance du milieu. La figure fig-B.3 montre ce schéma équivalent.

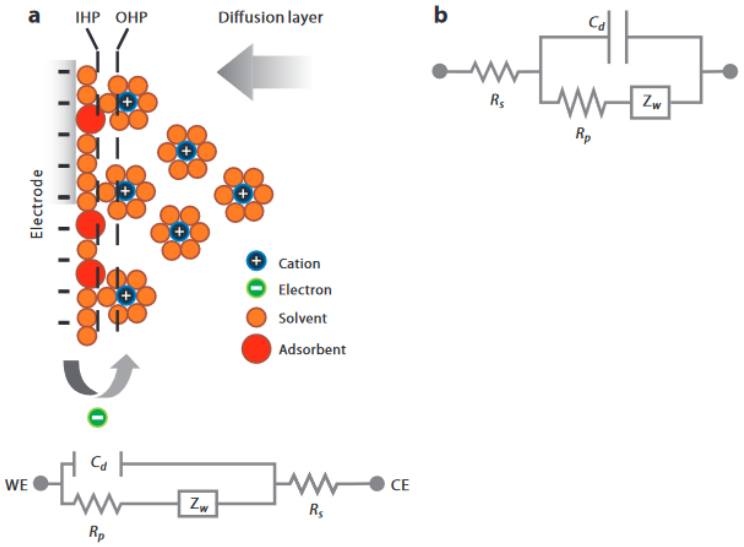


FIGURE B.3 – *circuit équivalent avec C_d capacité du diélectrique ; R_s La résistance du milieu et Z_w l'impédance de warburg et R_p la résistance de polarisation depuis [267]*

Z_w correspond à l'impédance de l'interface avec l'électrode est peut être définit par l'équation suivante :

$$Z_w = \frac{\sigma(1-j)}{\omega^{\frac{1}{2}}} \tag{B.5}$$

La prise en compte de l'électrode dans l'analyse du système implique de nombreuses confusion et d'erreur [238]. Notre objectif étant de retrouver une image de l'état de la membrane de la bactérie nous pouvons nous rentrer dans le régime linéaire du système. En effet, après 10kHz le système peut être analysé comme une simple résistance [268][269].
Lors des études de (Yang et al. 2003) [268]. L'impédance ne dépend plus de la fréquence à partir de 10kHz. Une information supplémentaire est l'impédance observée à 10kHz et à 1MHz. Il observe respectivement 66.6$k\Omega$ et 250Ω. La capacité équivalente du milieu a été évaluée à 2.65nF
En effet, lors de la thèse de médéric Vindret, une observation a été faite sur le milieu DI avec suspension cellulaire. Le nombre de charges apporté change trop l'impédance de milieu. On peut donc prendre en compte que l'impédance est plus forte pour des fréquences proches de 10kHz et donc un changement de milieu changera l'impédance de manière plus grande et permettra peut-être d'observer plus facilement le milieu.

C

Complément de données sur l'étude des populations bactérienne au contact de l'Ampicilline

Données	$\|Z\|_{10\text{kHz}}$	$\varphi_{10\text{kHz}}$	Données	$\|Z\|_{10\text{kHz}}$	$\varphi_{10\text{kHz}}$
A EC1 t0	$2.979e+03 \pm 5.6e+01$	-5.95 ± 0.13	A EC1 t60	$3.109e+03 \pm 2.1e+01$	-6.47 ± 0.02
A EC1 t120	$2.880e+03 \pm 4.2e+00$	-6.23 ± 0.00	A EC1 t180	$2.723e+03 \pm 1.5e+02$	-6.10 ± 0.08
D EC1 t0	$1.398e+03 \pm 9.5e+00$	-3.36 ± 0.00	D EC1 t60	$1.411e+03 \pm 5.6e+00$	-3.49 ± 0.01
D EC1 t120	$1.303e+03 \pm 1.5e+01$	-4.07 ± 0.03	D EC1 t180	$1.303e+03 \pm 1.5e+01$	-4.07 ± 0.03
C1 EC1 t0	$2.751e+03 \pm 4.2e+01$	-5.17 ± 0.13	C1 EC1 t60	$2.288e+03 \pm 1.8e+01$	-5.05 ± 0.01
C1 EC1 t120	$2.070e+03 \pm 1.6e+02$	-4.70 ± 0.27	C1 EC1 t180	$2.066e+03 \pm 1.8e+01$	-5.13 ± 0.07
C3 EC1 t0	$7.834e+02 \pm 8.5e+01$	-2.50 ± 0.03	C3 EC1 t60	$8.462e+02 \pm 1.5e+01$	-2.68 ± 0.02
C3 EC1 t120	$7.753e+02 \pm 1.5e+01$	-3.02 ± 0.01	C3 EC1 t180	$7.435e+02 \pm 1.6e+00$	-3.52 ± 0.02
A EC3 t0	$3.057e+03 \pm 1.0e+02$	-5.94 ± 0.20	A EC3 t60	$2.915e+03 \pm 1.8e+02$	-6.20 ± 0.26
A EC3 t120	$2.789e+03 \pm 1.8e+00$	-5.81 ± 0.11	A EC3 t180	$2.542e+03 \pm 0.0e+00$	-6.08 ± 0.00
D EC3 t0	$1.448e+03 \pm 3.1e+00$	-3.44 ± 0.01	D EC3 t60	$1.519e+03 \pm 1.9e+01$	-3.72 ± 0.04
D EC3 t120	$1.393e+03 \pm 2.0e+00$	-4.19 ± 0.02	D EC3 t180	$1.393e+03 \pm 2.0e+00$	-4.19 ± 0.02
C1 EC3 t0	$2.589e+03 \pm 3.4e+01$	-5.16 ± 0.04	C1 EC3 t60	$2.402e+03 \pm 1.2e+01$	-5.26 ± 0.04
C1 EC3 t120	$2.538e+03 \pm 4.0e+02$	-4.90 ± 0.06	C1 EC3 t180	$2.057e+03 \pm 2.8e+01$	-5.21 ± 0.04
C3 EC3 t0	$8.376e+02 \pm 5.0e+01$	-2.53 ± 0.00	C3 EC3 t60	$8.462e+02 \pm 1.5e+01$	-2.68 ± 0.02
C3 EC3 t120	$7.619e+02 \pm 2.8e+01$	-3.05 ± 0.05	C3 EC3 t180	$7.520e+02 \pm 3.1e+01$	-3.44 ± 0.06
A EC2 t0	$2.807e+03 \pm 0.0e+00$	-5.76 ± 0.00	A EC2 t60	$2.333e+03 \pm 2.8e+01$	-5.13 ± 0.06
A EC2 t120	$2.177e+03 \pm 3.1e+01$	-4.86 ± 0.02	A EC2 t180	$2.018e+03 \pm 7.7e-01$	-4.78 ± 0.02
D EC2 t0	$9.124e+02 \pm 1.0e+01$	-3.05 ± 0.02	D EC2 t60	$8.860e+02 \pm 1.2e+00$	-3.04 ± 0.02
D EC2 t120	$8.834e+02 \pm 8.6e+00$	-3.26 ± 0.01	D EC2 t180	$7.892e+02 \pm 7.2e+00$	-3.20 ± 0.02
C1 EC2 t0	$2.000e+03 \pm 3.0e+00$	-4.41 ± 0.00	C1 EC2 t60	$1.735e+03 \pm 1.5e+01$	-4.14 ± 0.03
C1 EC2 t120	$1.664e+03 \pm 4.1e+00$	-4.10 ± 0.01	C1 EC2 t180	$1.491e+03 \pm 1.4e+01$	-4.03 ± 0.08
C3 EC2 t0	$8.403e+02 \pm 1.3e+00$	-2.99 ± 0.04	C3 EC2 t60	$8.714e+02 \pm 1.1e+01$	-2.72 ± 0.04
C3 EC2 t120	$7.448e+02 \pm 4.5e+00$	-3.14 ± 0.02	C3 EC2 t180	$6.820e+02 \pm 2.7e+00$	-3.15 ± 0.02
A EC4 t0	$2.442e+03 \pm 9.7e+00$	-5.19 ± 0.00	A EC4 t60	$2.055e+03 \pm 3.5e+00$	-4.71 ± 0.02
A EC4 t120	$1.929e+03 \pm 4.2e+00$	-4.51 ± 0.01	A EC4 t180	$1.742e+03 \pm 3.3e+01$	-4.43 ± 0.01
D EC4 t0	$8.488e+02 \pm 7.6e-01$	-3.06 ± 0.02	D EC4 t60	$8.307e+02 \pm 8.2e+01$	-2.87 ± 0.08
D EC4 t120	$8.315e+02 \pm 6.6e-01$	-3.26 ± 0.01	D EC4 t180	$7.540e+02 \pm 3.4e+00$	-3.18 ± 0.02
C1 EC4 t0	$1.870e+03 \pm 3.2e+01$	-4.18 ± 0.03	C1 EC4 t60	$1.609e+03 \pm 1.3e+01$	-3.92 ± 0.02
C1 EC4 t120	$1.509e+03 \pm 2.1e+00$	-3.87 ± 0.01	C1 EC4 t180	$1.396e+03 \pm 1.1e+01$	-3.76 ± 0.00
C3 EC4 t0	$8.197e+02 \pm 1.2e+01$	-2.98 ± 0.06	C3 EC4 t60	$8.714e+02 \pm 1.1e+01$	-2.72 ± 0.04
C3 EC4 t120	$7.743e+02 \pm 9.7e+00$	-3.02 ± 0.02	C3 EC4 t180	$6.588e+02 \pm 1.7e+00$	-3.15 ± 0.02
C2 EC5 t0	$1.825e+03 \pm 1.2e+01$	-4.23 ± 0.02	C2 EC5 t60	$1.620e+03 \pm 3.2e+00$	-4.17 ± 0.04
C2 EC5 t120	$1.564e+03 \pm 3.8e-01$	-4.03 ± 0.02	C2 EC5 t180	$1.449e+03 \pm 4.6e+00$	-3.89 ± 0.06
C2 EC6 t0	$1.693e+03 \pm 2.1e+01$	-4.18 ± 0.00	C2 EC6 t60	$1.614e+03 \pm 1.6e+00$	-4.11 ± 0.01
C2 EC6 t120	$1.492e+03 \pm 2.7e+01$	-3.93 ± 0.02	C2 EC6 t180	$1.388e+03 \pm 3.6e+00$	-3.82 ± 0.04
C2 EC7 t0	$1.752e+03 \pm 4.5e+00$	-4.27 ± 0.04	C2 EC7 t60	$1.636e+03 \pm 1.9e+01$	-4.17 ± 0.01
C2 EC7 t120	$1.576e+03 \pm 7.5e+01$	-3.87 ± 0.02	C2 EC7 t180	$1.548e+03 \pm 2.1e+01$	-3.86 ± 0.03
A EC5 t0	$5.380e+03 \pm 7.6e+01$	-10.86 ± 0.14	A EC5 t60	$3.949e+03 \pm 6.0e+01$	-8.76 ± 0.12
A EC5 t120	$3.549e+03 \pm 2.2e+01$	-8.00 ± 0.04	A EC5 t180	$3.381e+03 \pm 6.5e+01$	-7.16 ± 0.27
A EC6 t0	$5.365e+03 \pm 6.3e+01$	-10.76 ± 0.05	A EC6 t60	$4.005e+03 \pm 1.3e+01$	-8.76 ± 0.02
A EC6 t120	$3.395e+03 \pm 7.1e+01$	-7.61 ± 0.20	A EC6 t180	$3.022e+03 \pm 1.5e+01$	-7.16 ± 0.01
A EC7 t0	$4.855e+03 \pm 1.4e+02$	-10.17 ± 0.29	A EC7 t60	$4.398e+03 \pm 3.0e+01$	-9.33 ± 0.15
A EC7 t120	$3.586e+03 \pm 1.1e+02$	-8.01 ± 0.26	A EC7 t180	$3.100e+03 \pm 2.6e+02$	-7.25 ± 0.44
D EC5 t0	$1.024e+03 \pm 2.5e+00$	-3.05 ± 0.02	D EC5 t60	$1.072e+03 \pm 1.1e+01$	-3.15 ± 0.03
D EC5 t120	$1.050e+03 \pm 3.4e+01$	-3.10 ± 0.06	D EC5 t180	$1.048e+03 \pm 9.4e+01$	-3.05 ± 0.11
D EC6 t0	$9.334e+02 \pm 1.0e+00$	-3.00 ± 0.01	D EC6 t60	$9.980e+02 \pm 8.5e+00$	-3.01 ± 0.03
D EC6 t120	$9.404e+02 \pm 3.5e+00$	-3.01 ± 0.03	D EC6 t180	$8.755e+02 \pm 1.5e+00$	-3.11 ± 0.02
D EC7 t0	$1.040e+03 \pm 1.3e+01$	-3.10 ± 0.00	D EC7 t60	$1.074e+03 \pm 7.6e+00$	-3.11 ± 0.01
D EC7 t120	$9.521e+02 \pm 6.4e+00$	-3.16 ± 0.02	D EC7 t180	$1.083e+03 \pm 9.2e+01$	-3.01 ± 0.03

TABLEAU C.1 – *Paramètres module et phase de l'impédance pour toutes les populations à 10KHz lié à l'Ampicilline*

Condition	Population	$\bar{R}$ (Ω)	σ_R	$\bar{C}$ (F)	σ_C	τ (s)	R^2
C1	EC1	2711.4	103.0	5.05×10^{-10}	4.86×10^{-12}	1.37×10^{-6}	0.999359
C1	EC2	2653.2	96.5	5.10×10^{-10}	1.61×10^{-12}	1.35×10^{-6}	0.999969
C1	EC3	1996.3	10.0	5.19×10^{-10}	3.24×10^{-12}	1.04×10^{-6}	0.999956
C1	EC4	1861.4	37.1	5.18×10^{-10}	4.23×10^{-12}	9.64×10^{-7}	0.999958
C3	EC1	807.4	99.2	5.25×10^{-10}	3.61×10^{-12}	4.24×10^{-7}	0.999921
C3	EC2	825.9	52.9	5.36×10^{-10}	2.23×10^{-11}	4.43×10^{-7}	0.999933
C3	EC3	835.9	0.9	5.26×10^{-10}	4.04×10^{-12}	4.40×10^{-7}	0.999802
C3	EC4	806.0	17.6	5.27×10^{-10}	1.30×10^{-11}	4.25×10^{-7}	0.999815
C2	EC5	1799.0	31.9	5.69×10^{-10}	1.84×10^{-12}	1.02×10^{-6}	0.999750
C2	EC6	1678.2	24.6	5.83×10^{-10}	5.53×10^{-13}	9.79×10^{-7}	0.999901
C2	EC7	1718.8	36.8	5.89×10^{-10}	3.11×10^{-12}	1.01×10^{-6}	0.999931
Alive	EC1	2948.5	110.3	5.09×10^{-10}	1.09×10^{-12}	1.50×10^{-6}	0.999954
Alive	EC2	3114.1	118.9	5.06×10^{-10}	4.13×10^{-13}	1.58×10^{-6}	0.999980
Alive	EC3	2821.2	39.7	5.13×10^{-10}	6.23×10^{-12}	1.45×10^{-6}	0.999944
Alive	EC4	2443.4	15.9	5.16×10^{-10}	2.53×10^{-12}	1.26×10^{-6}	0.999966
Alive	EC5	5542.0	117.4	5.30×10^{-10}	9.07×10^{-13}	2.94×10^{-6}	0.999783
Alive	EC6	5473.4	104.9	5.28×10^{-10}	2.90×10^{-12}	2.89×10^{-6}	0.999838
Alive	EC7	4988.2	204.7	5.50×10^{-10}	1.58×10^{-11}	2.75×10^{-6}	0.999885
Dead	EC1	894.9	14.1	5.57×10^{-10}	3.95×10^{-12}	7.77×10^{-7}	0.999962
Dead	EC2	881.6	14.3	5.45×10^{-10}	3.54×10^{-12}	8.07×10^{-7}	0.999927
Dead	EC3	887.8	23.6	5.37×10^{-10}	2.90×10^{-12}	4.77×10^{-7}	0.999831
Dead	EC4	837.1	3.1	5.49×10^{-10}	1.35×10^{-12}	4.59×10^{-7}	0.999866
Dead	EC5	1010.9	9.5	5.60×10^{-10}	2.87×10^{-12}	5.66×10^{-7}	0.999606
Dead	EC6	929.5	5.1	5.98×10^{-10}	4.32×10^{-11}	5.56×10^{-7}	0.999223
Dead	EC7	1027.4	17.4	5.64×10^{-10}	5.14×10^{-12}	5.79×10^{-7}	0.999746

TABLEAU C.2 – *Paramètres R/C par condition à T=0 min.*

Condition	Population	$\bar{R}$ (Ω)	σ_R	$\bar{C}$ (F)	σ_C	τ (s)	R^2
C1	EC1	2271.7	43.5	5.48×10^{-10}	4.32×10^{-12}	1.24×10^{-6}	0.999828
C1	EC2	2431.0	36.5	5.53×10^{-10}	3.00×10^{-12}	1.34×10^{-6}	0.999891
C1	EC3	1735.0	21.7	5.61×10^{-10}	6.38×10^{-12}	9.74×10^{-7}	0.999770
C1	EC4	1601.8	13.4	5.53×10^{-10}	4.06×10^{-12}	8.85×10^{-7}	0.999813
C3	EC1	887.7	83.9	5.21×10^{-10}	1.94×10^{-11}	4.63×10^{-7}	0.999604
C3	EC2	887.7	83.9	5.21×10^{-10}	1.94×10^{-11}	4.63×10^{-7}	0.999604
C3	EC3	831.1	61.5	5.14×10^{-10}	2.50×10^{-11}	4.28×10^{-7}	0.999604
C3	EC4	831.1	61.5	5.14×10^{-10}	2.50×10^{-11}	4.28×10^{-7}	0.999604
C2	EC5	1627.0	21.9	5.92×10^{-10}	2.41×10^{-11}	9.63×10^{-7}	0.999762
C2	EC6	1594.6	21.2	6.16×10^{-10}	6.48×10^{-13}	9.83×10^{-7}	0.999609
C2	EC7	1637.9	23.5	5.98×10^{-10}	1.80×10^{-11}	9.80×10^{-7}	0.999839
Alive	EC1	3124.4	40.4	5.42×10^{-10}	4.84×10^{-12}	1.69×10^{-6}	0.999960
Alive	EC2	3001.2	215.6	5.48×10^{-10}	8.52×10^{-12}	1.64×10^{-6}	0.999963
Alive	EC3	2355.6	45.9	5.35×10^{-10}	2.11×10^{-12}	1.26×10^{-6}	0.999963
Alive	EC4	2054.0	5.4	5.32×10^{-10}	2.41×10^{-13}	1.09×10^{-6}	0.999844
Alive	EC5	3997.3	74.5	6.11×10^{-10}	1.03×10^{-12}	2.44×10^{-6}	0.999723
Alive	EC6	4030.9	33.4	6.09×10^{-10}	2.71×10^{-12}	2.45×10^{-6}	0.999684
Alive	EC7	4444.3	25.9	5.76×10^{-10}	3.43×10^{-11}	2.56×10^{-6}	0.999468
Dead	EC1	896.7	16.7	5.67×10^{-10}	1.14×10^{-11}	7.92×10^{-7}	0.999916
Dead	EC2	808.9	21.9	5.41×10^{-10}	1.65×10^{-12}	8.16×10^{-7}	0.999631
Dead	EC3	875.5	1.9	5.31×10^{-10}	1.30×10^{-13}	4.64×10^{-7}	0.999763
Dead	EC4	823.4	83.0	5.32×10^{-10}	2.50×10^{-11}	4.38×10^{-7}	0.999882
Dead	EC5	1057.2	18.1	5.79×10^{-10}	8.98×10^{-12}	6.12×10^{-7}	0.999949
Dead	EC6	974.2	29.3	5.37×10^{-10}	1.40×10^{-11}	5.23×10^{-7}	0.999252
Dead	EC7	1075.6	12.7	5.54×10^{-10}	1.32×10^{-13}	5.96×10^{-7}	0.999943

TABLEAU C.3 – *Paramètres R/C par condition à T=60 min.*

Condition	Population	$\bar{R}$ (Ω)	σ_R	$\bar{C}$ (F)	σ_C	τ (s)	R^2
C1	EC1	2074.3	162.6	5.67×10^{-10}	1.84×10^{-11}	1.18×10^{-6}	0.999761
C1	EC2	2517.6	402.1	5.31×10^{-10}	5.15×10^{-11}	1.34×10^{-6}	0.997276
C1	EC3	1644.7	16.3	5.62×10^{-10}	6.79×10^{-13}	9.25×10^{-7}	0.999805
C1	EC4	1501.2	0.3	5.21×10^{-10}	2.88×10^{-13}	7.82×10^{-7}	0.999398
C3	EC1	797.9	54.6	5.46×10^{-10}	3.18×10^{-11}	4.36×10^{-7}	0.999870
C3	EC2	783.6	56.9	5.47×10^{-10}	3.66×10^{-11}	4.28×10^{-7}	0.999874
C3	EC3	735.9	5.5	5.50×10^{-10}	3.05×10^{-12}	4.05×10^{-7}	0.999814
C3	EC4	779.8	23.7	5.05×10^{-10}	4.94×10^{-12}	3.94×10^{-7}	0.999706
C2	EC5	1556.1	1.9	6.14×10^{-10}	1.76×10^{-12}	9.55×10^{-7}	0.999643
C2	EC6	1486.2	26.8	6.11×10^{-10}	2.18×10^{-12}	9.08×10^{-7}	0.999767
C2	EC7	1552.6	79.3	5.89×10^{-10}	3.07×10^{-11}	9.15×10^{-7}	0.999736
Alive	EC1	2942.8	66.3	5.59×10^{-10}	3.06×10^{-12}	1.65×10^{-6}	0.999969
Alive	EC2	2877.6	119.4	5.37×10^{-10}	9.73×10^{-12}	1.55×10^{-6}	0.999968
Alive	EC3	2180.9	33.4	5.38×10^{-10}	3.31×10^{-12}	1.17×10^{-6}	0.999896
Alive	EC4	1913.8	1.3	5.66×10^{-10}	2.27×10^{-12}	1.08×10^{-6}	0.999701
Alive	EC5	3358.1	355.5	6.10×10^{-10}	1.39×10^{-11}	2.05×10^{-6}	0.999713
Alive	EC6	3394.1	81.2	5.81×10^{-10}	1.06×10^{-11}	1.97×10^{-6}	0.999751
Alive	EC7	3652.3	161.6	6.01×10^{-10}	2.40×10^{-11}	2.19×10^{-6}	0.999657
Dead	EC1	813.7	30.4	5.98×10^{-10}	1.70×10^{-11}	7.86×10^{-7}	0.999935
Dead	EC2	898.3	7.8	6.06×10^{-10}	6.55×10^{-12}	8.48×10^{-7}	0.999933
Dead	EC3	865.0	15.1	5.34×10^{-10}	2.33×10^{-12}	4.62×10^{-7}	0.999812
Dead	EC4	817.0	5.1	5.51×10^{-10}	2.35×10^{-12}	4.50×10^{-7}	0.999830
Dead	EC5	1035.8	45.6	5.89×10^{-10}	2.67×10^{-11}	6.10×10^{-7}	0.999699
Dead	EC6	922.4	18.7	6.17×10^{-10}	1.28×10^{-11}	5.69×10^{-7}	0.999502
Dead	EC7	937.8	16.4	6.29×10^{-10}	3.41×10^{-11}	5.90×10^{-7}	0.999600

TABLEAU C.4 – *Paramètres R/C par condition à T=120 min.*

Condition	Population	$\bar{R}$ (Ω)	σ_R	$\bar{C}$ (F)	σ_C	τ (s)	R^2
C1	EC1	2013.6	87.3	6.05×10^{-10}	1.14×10^{-11}	1.22×10^{-6}	0.999882
C1	EC2	2075.5	50.2	6.09×10^{-10}	1.05×10^{-11}	1.26×10^{-6}	0.999866
C1	EC3	1493.0	20.6	6.05×10^{-10}	1.71×10^{-12}	9.03×10^{-7}	0.999632
C1	EC4	1381.7	16.5	5.66×10^{-10}	3.28×10^{-12}	7.82×10^{-7}	0.999930
C3	EC1	730.2	7.3	6.00×10^{-10}	1.38×10^{-12}	4.38×10^{-7}	0.999813
C3	EC2	732.3	36.4	5.86×10^{-10}	2.24×10^{-11}	4.29×10^{-7}	0.999835
C3	EC3	675.3	3.3	5.95×10^{-10}	3.88×10^{-12}	4.02×10^{-7}	0.999780
C3	EC4	651.5	1.9	5.97×10^{-10}	2.51×10^{-12}	3.89×10^{-7}	0.999740
C2	EC5	1429.6	26.6	6.05×10^{-10}	1.35×10^{-11}	8.65×10^{-7}	0.999951
C2	EC6	1381.5	8.8	6.19×10^{-10}	8.31×10^{-12}	8.55×10^{-7}	0.999962
C2	EC7	1515.9	51.4	6.05×10^{-10}	2.00×10^{-12}	9.17×10^{-7}	0.999677
Alive	EC1	2647.9	269.5	5.71×10^{-10}	4.57×10^{-11}	1.51×10^{-6}	0.999870
Alive	EC2	2468.7	59.7	5.97×10^{-10}	4.36×10^{-12}	1.47×10^{-6}	0.999855
Alive	EC3	2003.9	10.7	5.81×10^{-10}	4.08×10^{-12}	1.16×10^{-6}	0.999663
Alive	EC4	1717.0	40.9	5.84×10^{-10}	2.95×10^{-11}	1.00×10^{-6}	0.999571
Alive	EC5	3430.8	75.2	5.61×10^{-10}	1.71×10^{-11}	1.92×10^{-6}	0.999971
Alive	EC6	3009.7	15.3	5.98×10^{-10}	8.59×10^{-12}	1.80×10^{-6}	0.999420
Alive	EC7	3348.7	78.6	5.84×10^{-10}	9.45×10^{-12}	1.96×10^{-6}	0.999428
Dead	EC1	813.7	30.4	5.98×10^{-10}	1.70×10^{-11}	7.86×10^{-7}	0.999935
Dead	EC2	898.3	7.8	6.06×10^{-10}	6.55×10^{-12}	8.48×10^{-7}	0.999933
Dead	EC3	782.4	8.4	5.66×10^{-10}	1.49×10^{-12}	4.43×10^{-7}	0.999716
Dead	EC4	745.5	3.3	5.78×10^{-10}	2.17×10^{-12}	4.31×10^{-7}	0.999843
Dead	EC5	1071.1	106.0	5.57×10^{-10}	7.90×10^{-11}	5.97×10^{-7}	0.999783
Dead	EC6	883.8	26.6	6.03×10^{-10}	1.23×10^{-11}	5.33×10^{-7}	0.999573
Dead	EC7	1078.5	93.0	5.49×10^{-10}	6.43×10^{-11}	5.92×10^{-7}	0.999652

TABLEAU C.5 – *Paramètres R/C par condition à T=180 min.*

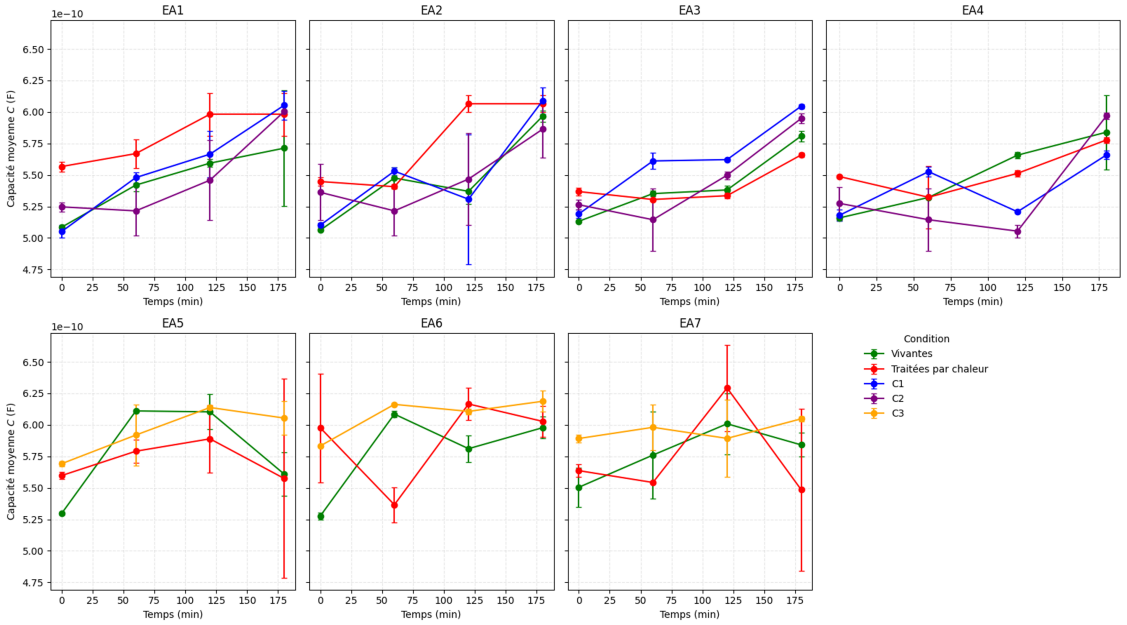


FIGURE C.1 – *Paramètres C de la régression par population bactérienne dans le temps*

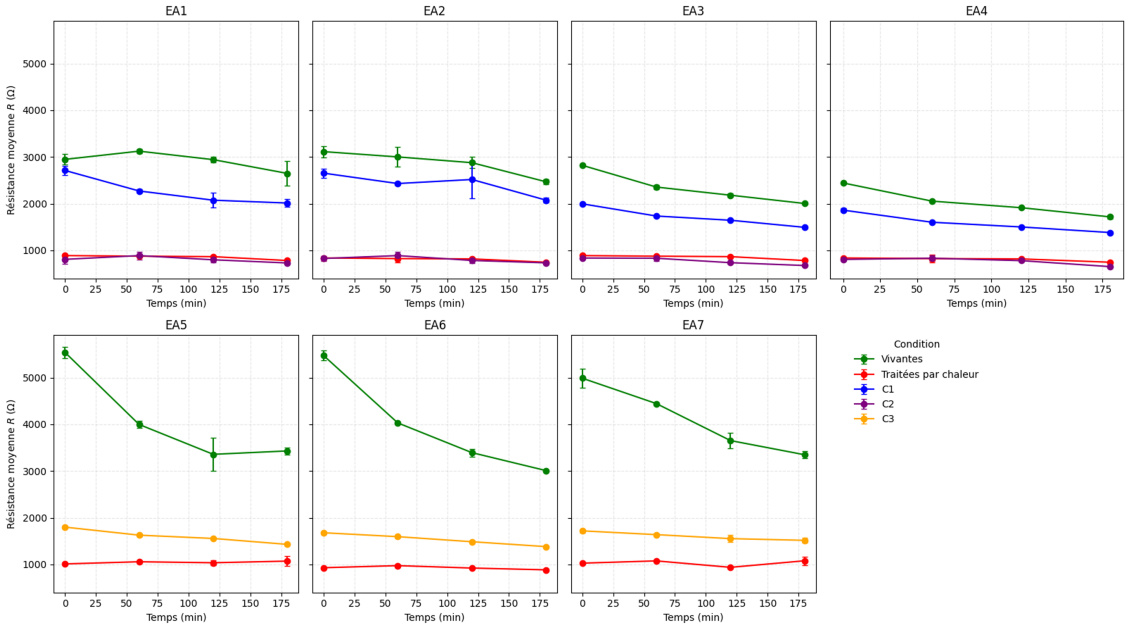


FIGURE C.2 – *Paramètres R de la régression par population bactérienne dans le temps*

D

Complément de données sur l'étude des populations bactérienne au contact de l'Ivermectine

Données	$\|Z\|_{10\text{kHz}}$	$\varphi_{10\text{kHz}}$	Données	$\|Z\|_{10\text{kHz}}$	$\varphi_{10\text{kHz}}$
C2 EC1 t0	$2.728e+03 \pm 5.1e-01$	-6.01 ± 0.02	C2 EC1 t60	$2.360e+03 \pm 5.5e+01$	-5.35 ± 0.14
C2 EC1 t120	$2.213e+03 \pm 2.5e+01$	-5.14 ± 0.04	C2 EC1 t180	$1.948e+03 \pm 2.3e+01$	-4.84 ± 0.02
C2 EC2 t0	$2.460e+03 \pm 5.1e+01$	-5.56 ± 0.09	C2 EC2 t60	$2.360e+03 \pm 5.5e+01$	-5.35 ± 0.14
C2 EC2 t120	$1.993e+03 \pm 9.9e+01$	-4.82 ± 0.02	C2 EC2 t180	$1.945e+03 \pm 1.5e+01$	-4.55 ± 0.01
C2 EC3 t0	$2.859e+03 \pm 8.1e+01$	-6.19 ± 0.00	C2 EC3 t60	$2.634e+03 \pm 3.0e+01$	-5.41 ± 0.17
C2 EC3 t120	$2.293e+03 \pm 8.3e+01$	-5.35 ± 0.07	C2 EC3 t180	$1.948e+03 \pm 2.3e+01$	-4.84 ± 0.02
A EC1 t0	$4.415e+03 \pm 1.2e+02$	-9.04 ± 0.25	A EC1 t60	$3.796e+03 \pm 2.3e+02$	-7.01 ± 0.41
A EC1 t120	$3.001e+03 \pm 3.6e+01$	-6.88 ± 0.01	A EC1 t180	$2.765e+03 \pm 6.6e+01$	-6.21 ± 0.12
A EC2 t0	$3.636e+03 \pm 2.5e+02$	-7.42 ± 0.44	A EC2 t60	$3.244e+03 \pm 1.4e+02$	-6.36 ± 0.01
A EC2 t120	$2.725e+03 \pm 2.8e+02$	-5.86 ± 0.02	A EC2 t180	$2.578e+03 \pm 1.1e+01$	-5.51 ± 0.01
A EC3 t0	$4.835e+03 \pm 7.9e+01$	-9.84 ± 0.03	A EC3 t60	$4.051e+03 \pm 8.7e+01$	-7.87 ± 0.14
A EC3 t120	$3.267e+03 \pm 7.9e+01$	-7.10 ± 0.00	A EC3 t180	$2.765e+03 \pm 6.6e+01$	-6.21 ± 0.12
D EC1 t0	$1.028e+03 \pm 3.2e+00$	-2.80 ± 0.06	D EC1 t60	$1.192e+03 \pm 1.6e+01$	-3.18 ± 0.04
D EC1 t120	$1.097e+03 \pm 2.5e+01$	-3.20 ± 0.02	D EC1 t180	$9.862e+02 \pm 1.1e+01$	-3.22 ± 0.01
D EC2 t0	$1.028e+03 \pm 5.4e+01$	-2.84 ± 0.10	D EC2 t60	$9.954e+02 \pm 2.8e+00$	-3.45 ± 0.03
D EC2 t120	$1.030e+03 \pm 9.3e+01$	-3.31 ± 0.16	D EC2 t180	$9.273e+02 \pm 5.5e+00$	-3.20 ± 0.02
D EC3 t0	$1.200e+03 \pm 1.5e+02$	-2.98 ± 0.05	D EC3 t60	$1.080e+03 \pm 1.1e+01$	-3.65 ± 0.02
D EC3 t120	$1.213e+03 \pm 4.0e+01$	-3.28 ± 0.03	D EC3 t180	$9.862e+02 \pm 1.1e+01$	-3.22 ± 0.01
C1 EC5 t0	$4.001e+03 \pm 1.1e+02$	-7.91 ± 0.23	C1 EC5 t60	$3.411e+03 \pm 8.5e+00$	-7.01 ± 0.03
C1 EC5 t120	$3.051e+03 \pm 8.8e+00$	-6.35 ± 0.04	C1 EC5 t180	$2.827e+03 \pm 1.4e+00$	-6.00 ± 0.01
C1 EC6 t0	$3.921e+03 \pm 2.2e+02$	-7.89 ± 0.34	C1 EC6 t60	$3.431e+03 \pm 7.1e+00$	-7.10 ± 0.01
C1 EC6 t120	$2.972e+03 \pm 1.4e+02$	-6.20 ± 0.31	C1 EC6 t180	$2.813e+03 \pm 8.3e+01$	-5.92 ± 0.14
C1 EC7 t0	$3.704e+03 \pm 5.5e+01$	-7.47 ± 0.05	C1 EC7 t60	$3.130e+03 \pm 6.5e+01$	-6.35 ± 0.38
C1 EC7 t120	$2.921e+03 \pm 9.2e+00$	-6.15 ± 0.02	C1 EC7 t180	$2.508e+03 \pm 9.4e+01$	-5.58 ± 0.14
A EC5 t0	$5.843e+03 \pm 1.3e+02$	-11.27 ± 0.26	A EC5 t60	$4.049e+03 \pm 6.0e+01$	-8.28 ± 0.16
A EC5 t120	$3.523e+03 \pm 8.2e+01$	-7.33 ± 0.13	A EC5 t180	$3.319e+03 \pm 3.8e+01$	-6.83 ± 0.07
A EC6 t0	$5.827e+03 \pm 1.9e+02$	-11.25 ± 0.35	A EC6 t60	$4.207e+03 \pm 1.9e+02$	-8.35 ± 0.13
A EC6 t120	$3.667e+03 \pm 5.9e+00$	-7.52 ± 0.00	A EC6 t180	$3.331e+03 \pm 7.3e+00$	-6.86 ± 0.02
A EC7 t0	$4.802e+03 \pm 7.6e+00$	-9.50 ± 0.01	A EC7 t60	$3.840e+03 \pm 1.7e+02$	-7.63 ± 0.12
A EC7 t120	$3.303e+03 \pm 1.7e+01$	-6.85 ± 0.01	A EC7 t180	$2.996e+03 \pm 1.8e+01$	-6.33 ± 0.06
D EC5 t0	$1.443e+03 \pm 6.6e+01$	-3.39 ± 0.07	D EC5 t60	$1.473e+03 \pm 1.5e+01$	-3.46 ± 0.02
D EC5 t120	$1.512e+03 \pm 5.6e+01$	-3.43 ± 0.06	D EC5 t180	$1.353e+03 \pm 1.6e+00$	-3.42 ± 0.02
D EC6 t0	$1.548e+03 \pm 1.0e+01$	-3.56 ± 0.00	D EC6 t60	$1.492e+03 \pm 2.5e-01$	-3.53 ± 0.01
D EC6 t120	$1.440e+03 \pm 1.3e+01$	-3.52 ± 0.02	D EC6 t180	$1.379e+03 \pm 2.4e+00$	-3.46 ± 0.00
D EC7 t0	$1.532e+03 \pm 8.5e+00$	-3.55 ± 0.04	D EC7 t60	$1.480e+03 \pm 3.5e+01$	-3.45 ± 0.04
D EC7 t120	$1.418e+03 \pm 2.0e+01$	-3.45 ± 0.02	D EC7 t180	$1.354e+03 \pm 1.4e+00$	-3.43 ± 0.04

TABLEAU D.1 – *Paramètres module et phase de l'impédance pour toutes les populations à 10KHz lié à l'Ivermectine*

Condition	Population	$\bar{R}$ (Ω)	σ_R	$\bar{C}$ (F)	σ_C	τ (s)	R^2
C1	EC5	4064.6	127.7	5.23×10^{-10}	4.24×10^{-12}	2.13×10^{-6}	0.999954
C1	EC6	3967.8	322.0	5.28×10^{-10}	9.19×10^{-12}	2.10×10^{-6}	0.999849
C1	EC7	3637.7	148.4	5.34×10^{-10}	1.54×10^{-11}	1.94×10^{-6}	0.999897
C2	EC1	2767.1	43.2	5.66×10^{-10}	6.96×10^{-12}	1.57×10^{-6}	0.999946
C2	EC2	2408.5	119.1	5.65×10^{-10}	2.92×10^{-12}	1.36×10^{-6}	0.999900
C2	EC3	2921.0	104.7	5.53×10^{-10}	1.36×10^{-11}	1.61×10^{-6}	0.999965
Alive	EC1	4584.5	224.1	5.31×10^{-10}	3.71×10^{-12}	2.44×10^{-6}	0.999562
Alive	EC2	3744.4	396.7	5.29×10^{-10}	8.95×10^{-12}	1.98×10^{-6}	0.999869
Alive	EC3	4814.3	157.2	5.56×10^{-10}	2.56×10^{-11}	2.68×10^{-6}	0.999837
Alive	EC5	5961.7	125.1	5.25×10^{-10}	4.00×10^{-12}	3.13×10^{-6}	0.999967
Alive	EC6	5925.2	193.2	5.22×10^{-10}	4.12×10^{-12}	3.09×10^{-6}	0.999971
Alive	EC7	4954.6	162.1	5.24×10^{-10}	4.84×10^{-13}	2.59×10^{-6}	0.999900
Dead	EC1	983.5	56.2	5.23×10^{-10}	9.11×10^{-12}	5.15×10^{-7}	0.999636
Dead	EC2	996.4	67.8	5.17×10^{-10}	1.52×10^{-11}	5.16×10^{-7}	0.999434
Dead	EC3	1195.9	148.5	5.07×10^{-10}	1.24×10^{-11}	6.07×10^{-7}	0.998918
Dead	EC5	1455.1	72.0	5.36×10^{-10}	1.57×10^{-11}	7.80×10^{-7}	0.999846
Dead	EC6	1549.6	19.8	5.47×10^{-10}	4.49×10^{-12}	8.47×10^{-7}	0.999908
Dead	EC7	1546.9	39.5	5.30×10^{-10}	2.13×10^{-11}	8.21×10^{-7}	0.999766

TABLEAU D.2 – *Paramètres R/C par condition à T=0 min.*

Condition	Population	$\bar{R}$ (Ω)	σ_R	$\bar{C}$ (F)	σ_C	τ (s)	R^2
C1	EC5	3393.1	50.4	5.39×10^{-10}	4.50×10^{-13}	1.83×10^{-6}	0.999966
C1	EC6	3475.0	28.6	5.42×10^{-10}	1.16×10^{-12}	1.88×10^{-6}	0.999955
C1	EC7	3163.3	79.7	5.35×10^{-10}	2.67×10^{-11}	1.69×10^{-6}	0.999970
C2	EC1	2377.8	56.9	5.52×10^{-10}	4.32×10^{-12}	1.31×10^{-6}	0.999879
C2	EC2	2377.8	56.9	5.52×10^{-10}	4.32×10^{-12}	1.31×10^{-6}	0.999879
C2	EC3	2676.8	52.2	5.15×10^{-10}	1.41×10^{-11}	1.38×10^{-6}	0.999946
Alive	EC1	3810.6	341.3	5.07×10^{-10}	1.39×10^{-11}	1.93×10^{-6}	0.999772
Alive	EC2	3188.1	194.8	5.22×10^{-10}	1.88×10^{-11}	1.66×10^{-6}	0.999925
Alive	EC3	4114.5	89.4	5.13×10^{-10}	3.37×10^{-12}	2.11×10^{-6}	0.999974
Alive	EC5	4094.4	72.0	5.28×10^{-10}	1.16×10^{-12}	2.16×10^{-6}	0.999634
Alive	EC6	4186.4	206.6	5.25×10^{-10}	5.34×10^{-12}	2.20×10^{-6}	0.999747
Alive	EC7	3839.8	186.3	5.23×10^{-10}	8.16×10^{-12}	2.01×10^{-6}	0.999798
Dead	EC1	1140.2	80.1	5.04×10^{-10}	6.67×10^{-12}	5.75×10^{-7}	0.999191
Dead	EC2	983.1	5.7	5.27×10^{-10}	1.69×10^{-12}	5.18×10^{-7}	0.999165
Dead	EC3	1084.2	21.7	5.40×10^{-10}	1.86×10^{-11}	5.85×10^{-7}	0.999679
Dead	EC5	1479.4	26.3	5.28×10^{-10}	1.80×10^{-11}	7.81×10^{-7}	0.999661
Dead	EC6	1488.5	4.6	5.17×10^{-10}	2.88×10^{-13}	7.70×10^{-7}	0.999514
Dead	EC7	1474.0	34.7	5.27×10^{-10}	1.46×10^{-11}	7.77×10^{-7}	0.999626

TABLEAU D.3 – *Paramètres R/C par condition à T=60 min.*

Condition	Population	$\bar{R}$ (Ω)	σ_R	$\bar{C}$ (F)	σ_C	τ (s)	R^2
C1	EC5	3075.3	16.9	5.43×10^{-10}	8.20×10^{-13}	1.67×10^{-6}	0.999969
C1	EC6	3039.6	173.4	5.36×10^{-10}	9.56×10^{-12}	1.63×10^{-6}	0.999976
C1	EC7	2928.7	10.5	5.44×10^{-10}	1.37×10^{-13}	1.59×10^{-6}	0.999968
C2	EC1	2218.0	25.7	5.44×10^{-10}	3.73×10^{-13}	1.21×10^{-6}	0.999831
C2	EC2	1973.4	104.7	5.71×10^{-10}	4.12×10^{-11}	1.13×10^{-6}	0.999704
C2	EC3	2294.0	82.6	5.67×10^{-10}	2.40×10^{-11}	1.30×10^{-6}	0.999928
Alive	EC1	3012.4	55.5	5.65×10^{-10}	2.51×10^{-11}	1.70×10^{-6}	0.999825
Alive	EC2	2637.1	336.3	5.61×10^{-10}	5.29×10^{-11}	1.48×10^{-6}	0.999943
Alive	EC3	3311.0	83.0	5.65×10^{-10}	1.61×10^{-11}	1.87×10^{-6}	0.999961
Alive	EC5	3521.5	85.3	5.37×10^{-10}	5.40×10^{-12}	1.89×10^{-6}	0.999847
Alive	EC6	3655.9	36.2	5.34×10^{-10}	9.40×10^{-12}	1.95×10^{-6}	0.999798
Alive	EC7	3299.4	10.5	5.45×10^{-10}	6.22×10^{-13}	1.80×10^{-6}	0.999955
Dead	EC1	1078.1	33.0	5.09×10^{-10}	6.25×10^{-12}	5.48×10^{-7}	0.999851
Dead	EC2	1053.9	109.3	5.18×10^{-10}	2.98×10^{-11}	5.46×10^{-7}	0.999622
Dead	EC3	1206.8	41.0	5.00×10^{-10}	5.01×10^{-13}	6.04×10^{-7}	0.999764
Dead	EC5	1479.9	75.5	5.13×10^{-10}	1.17×10^{-11}	7.59×10^{-7}	0.999705
Dead	EC6	1439.8	15.4	5.48×10^{-10}	5.99×10^{-12}	7.89×10^{-7}	0.999938
Dead	EC7	1422.2	26.0	5.34×10^{-10}	2.26×10^{-11}	7.59×10^{-7}	0.999632

TABLEAU D.4 – *Paramètres R/C par condition à T=120 min.*

Condition	Population	$\bar{R}$ (Ω)	σ_R	$\bar{C}$ (F)	σ_C	τ (s)	R^2
C1	EC5	2852.8	37.5	5.45×10^{-10}	2.61×10^{-12}	1.55×10^{-6}	0.999967
C1	EC6	2846.3	94.5	5.45×10^{-10}	5.95×10^{-13}	1.55×10^{-6}	0.999959
C1	EC7	2526.0	93.8	5.56×10^{-10}	2.18×10^{-12}	1.40×10^{-6}	0.999924
C2	EC1	1930.7	25.8	6.15×10^{-10}	1.82×10^{-12}	1.19×10^{-6}	0.999603
C2	EC2	1998.3	103.8	5.57×10^{-10}	3.13×10^{-11}	1.11×10^{-6}	0.999786
C2	EC3	1930.7	25.8	6.15×10^{-10}	1.82×10^{-12}	1.19×10^{-6}	0.999603
Alive	EC1	2724.5	106.8	5.70×10^{-10}	2.71×10^{-11}	1.55×10^{-6}	0.999849
Alive	EC2	2623.2	71.4	5.23×10^{-10}	1.45×10^{-11}	1.37×10^{-6}	0.999971
Alive	EC3	2724.5	106.8	5.70×10^{-10}	2.71×10^{-11}	1.55×10^{-6}	0.999849
Alive	EC5	3353.2	40.1	5.43×10^{-10}	2.70×10^{-12}	1.82×10^{-6}	0.999963
Alive	EC6	3325.8	35.5	5.45×10^{-10}	2.52×10^{-12}	1.81×10^{-6}	0.999965
Alive	EC7	3022.0	34.8	5.48×10^{-10}	2.83×10^{-12}	1.66×10^{-6}	0.999966
Dead	EC1	981.1	14.4	5.63×10^{-10}	4.52×10^{-11}	5.53×10^{-7}	0.999220
Dead	EC2	927.0	14.9	5.93×10^{-10}	3.43×10^{-11}	5.50×10^{-7}	0.999342
Dead	EC3	981.1	14.4	5.63×10^{-10}	4.52×10^{-11}	5.53×10^{-7}	0.999220
Dead	EC5	1345.8	0.8	5.65×10^{-10}	9.33×10^{-12}	7.60×10^{-7}	0.999959
Dead	EC6	1372.2	1.9	5.63×10^{-10}	1.64×10^{-11}	7.72×10^{-7}	0.999866
Dead	EC7	1345.9	6.0	5.78×10^{-10}	1.61×10^{-12}	7.77×10^{-7}	0.999842

TABLEAU D.5 – *Paramètres R/C par condition à T=180 min.*

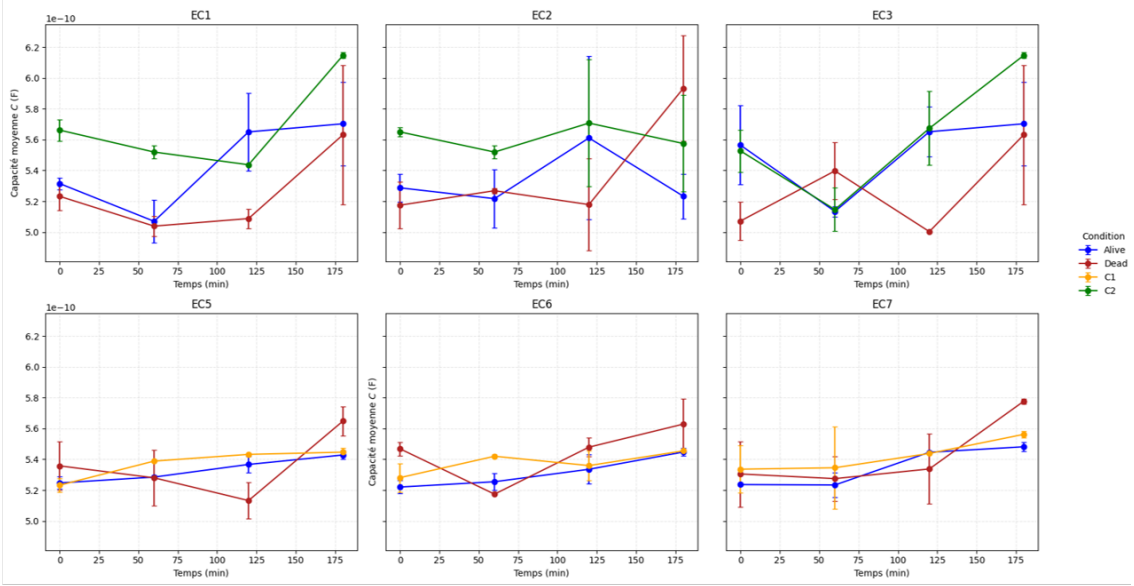


FIGURE D.1 – *Paramètres C de la régression par population bactérienne dans le temps*

E

Complément de mesure RC et de la DRT pour la détection bactérienne

Groupe	$R(\Omega)$	$C(F)$	r^2_{mag}	r^2_{phase}	σ_R	σ_C	$\tau = RC$
Vivantes (A) S1	9.1×10^3	5.06×10^{-10}	> 0.999	0.996	411	9.84×10^{-12}	4.6×10^{-6}
Traitées par chaleur (D) S1	8.1×10^3	5.37×10^{-10}	> 0.999	0.996	273	1.42×10^{-11}	4.4×10^{-6}
Vivantes (A) S2	3.7×10^3	5.19×10^{-10}	> 0.999	0.998	405	1×10^{-11}	1.9×10^{-6}
Traitées par chaleur (D) S2	2.9×10^3	5.21×10^{-10}	> 0.999	0.998	145	1.92×10^{-11}	1.5×10^{-6}
Vivantes (A) S3	626	5.37×10^{-10}	> 0.999	0.999	4.28	1.7×10^{-11}	3.4×10^{-7}
Traitées par chaleur (D) S3	413	5.13×10^{-10}	> 0.999	0.998	23.9	1.41×10^{-11}	2.1×10^{-7}

FIGURE E.1 – *Tableau d'évolution des paramètres R et C pour les trois dilutions bactériennes et deux états de contrôle*

Paramètres	$\lambda = 10^{-4}$ τ std			$\lambda = 10^{-5}$ τ std		
	τ_1	τ_2	τ_3	τ_1	τ_2	τ_3
Vivante S1	3.01×10^{-7}			2.84×10^{-7}		
Vivante S2	2.07×10^{-7}	0*		5.19×10^{-7}	1.36×10^{-6}	
Vivante S3	9.7×10^{-8}	2.78×10^{-6}		7.72×10^{-8}	2.71×10^{-6}	1.19×10^{-6}
Traités par chaleur S1	1.58×10^{-7}			1.58×10^{-7}		
Traités par chaleur S2	1.49×10^{-8}	0*		1.22×10^{-8}	8.18×10^{-7}	
Traités par chaleur S3	1.99×10^{-9}	2.80×10^{-7}		1.99×10^{-9}	1.83×10^{-8}	2.90×10^{-7}

TABLEAU E.1 – *Évolution de l'écart-type sur la détection des différents pic de la DRT pour les mesures réalisées dans le cadre de la section 4.2. 0* lorsque le pic est présent sur une seule mesure.*

F

Complément de mesure RC et de la DRT pour la détection bactérienne sur Electrodes Interdigitées

Cond.	Pop.	État	$R \pm \sigma_R$ ($k\Omega$)	$C \pm \sigma_C$ (pF)	État	$R \pm \sigma_R$ ($k\Omega$)	$C \pm \sigma_C$ (pF)
0 mM	EC1	A	15.66 ± 2.50	23.4 ± 2.37	D	2.79 ± 0.35	19.7 ± 2.2
0 mM	EC2	A	13.61 ± 1.79	22.1 ± 2.53	D	2.38 ± 0.45	23.2 ± 5.2
0 mM	EC3	A.	24.67 ± 3.25	21.5 ± 2.53	D	3.25 ± 0.17	24.6 ± 5.1
0 mM	**Globale**	**A**	**18.24 ± 5.54**	**22.3 ± 2.6**	**D**	**2.78 ± 0.05**	**22.4± 4.6**
1 mM	EC1	A	3.39 ± 0.18	29.9 ± 1.21	D	2.67 ± 0.49	20.0 ± 3.7
1 mM	EC2	A	3.64 ± 0.42	19.7 ± 2.78	D	2.21 ± 0.02	20.6 ± 1.6
1 mM	EC3	A	4.1 ± 1.3	18 ± 4.41	D	2.36 ± 0.36	17.8 ± 1.4
1 mM	**Globale**	**A**	**3.73 ± 0.84**	**20 ± 3.3**	**D**	**2.44 ± 0.05**	**19.3 ± 2.7**
10 mM	EC1	A	0.45 ± 0.03	18 ± 0.8	D	0.41 ± 0.03	18.9 ± 1.3
10 mM	EC2	A	0.45 ± 0.07	18.5 ± 2.2	D	0.38 ± 0.06	19.1 ± 2.5
10 mM	EC3	A	0.44 ± 0.07	19.3 ± 2.64	D	0.36 ± 0.05	19.4 ± 1.9
10 mM	**Globale**	**A**	**0.45 ± 0.05**	**18.8 ± 1.93**	**D**	**0.38 ± 0.05**	**19.1 ± 1.8**
30 mM	EC1	A	0.20 ± 0.05	15.6 ± 2.6	D	0.19 ± 0.04	14.5 ± 1.8
30 mM	EC2	A	0.25 ± 0.03	12.7 ± 1.8	D	0.17 ± 0.02	15.5 ± 0.7
30 mM	EC3	A	0.22 ± 0.03	14.7 ± 1.3	D	0.21 ± 0.02	11.3 ± 1.5
30 mM	**Globale**	**A**	**0.22 ± 0.04**	**14.4 ± 2.20**	**D**	**0.19 ± 0.03**	**13.8 ± 2.3**

TABLEAU F.1 – *Paramètres R/C par condition pour les expérimentations sur IDE*

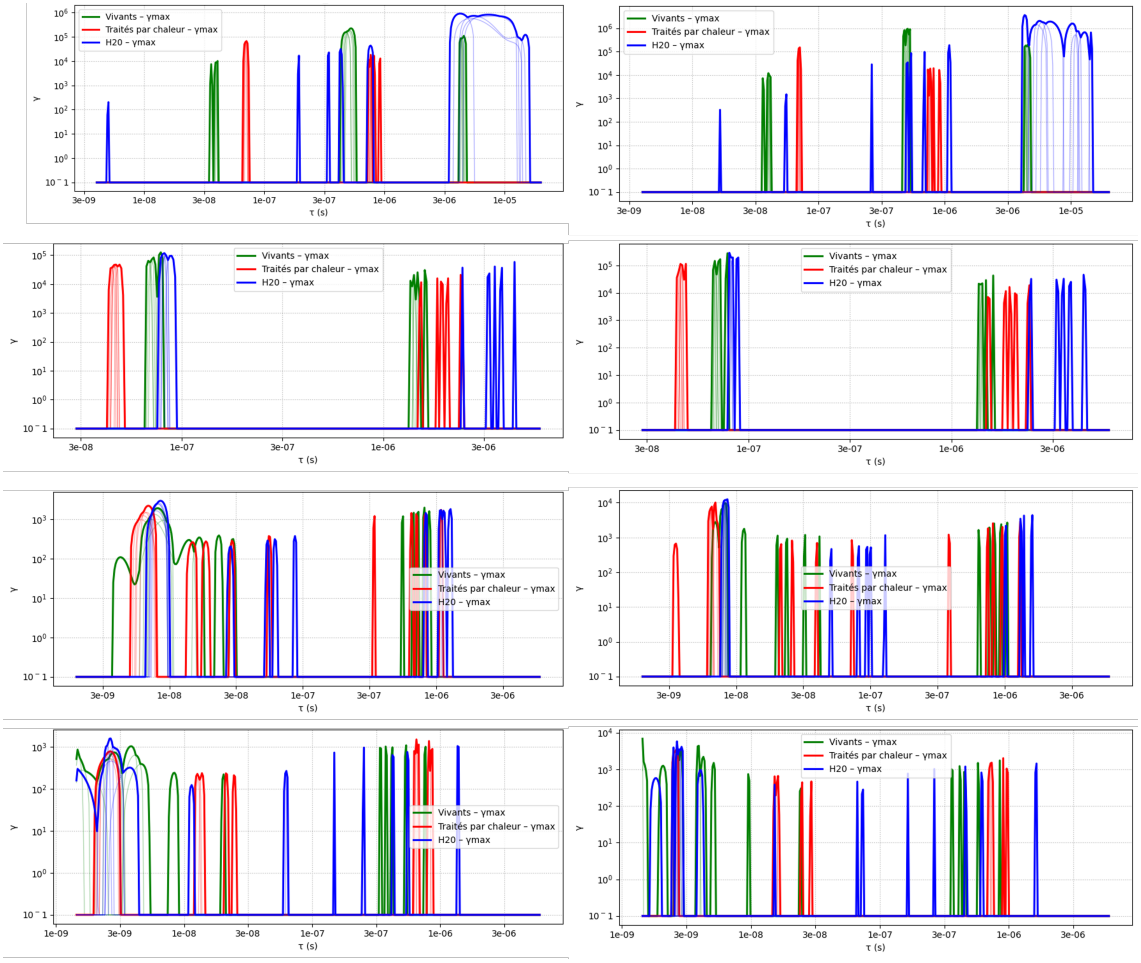


FIGURE F.1 – *Évolution des temps de relaxation pour les expérimentations de contrôle 'Vivantes' et 'Traitées par chaleur' pour les diverses solutions ioniques ($\lambda = 10^{-5}$). De gauche à droite et de haut en bas : Eau désionisée, 1 mM, 10 mM et 30 mM de NaCl.*

G

Comparaison d'utilisation des méthodes de détection de métaux lourds, antibiotique et pesticides dans l'eau

Méthodes	**Métaux**	**Antibiotiques**	**Pesticides**
SAA	Oui	Non	Non
ETAAS	Oui	Non	Non
ICP-MS	Oui	Non	Non
NAA	Oui	Non	Non
XRF	Oui	Non	Non
AFS	Oui	Non	Non
LC-MS/MS	Non	Oui	Oui
HPLC-MS/MS	Non	Oui	Oui
GC-MS	Non	Rarement	Oui

TABLEAU G.1 – *Résumé des méthodes analytiques pour la détection des métaux lourds, antibiotiques et pesticides dans l'eau*