

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
La République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR-KHENCHELA-
FACULTE DES SCIENCES ET DE TECHNOLOGIE
Département de génie des procédés



جامعة عباس لغرور-خنشلة-
كلية العلوم والتكنولوجيا
قسم: هندسة الطرائق

Domaine : Science et Technique
Spécialité : Génie des procédés
Option : Microbiologie, santé et environnement

Thèse de doctorat de l'Université Abbes Laghrou-Khenchela

Soutenue publiquement le 10/07/2025 par

El kahina GHEDIR

Pour obtenir le grade de Docteur

Nouveaux biocapteurs sélectifs pour la détection des cations et des protéines dans les liquides biologiques

Devant le jury composé de :

FALEK Mokhtar	Professeur ,U. Khenchela, Algérie	Président
BENOUNIS Messaoud	Professeur , U. Khenchela, Algérie	Directeur de thèse
BEN-ALI Mounir	Professeur ,U.de Sousse, Tunisié	Examineur
HAMIZI Kamel	Professeur, U. Batna 2, Algérie	Examineur
FERKHI Mosbah	Professeur, U. Jijel, Algérie	Examineur
TOUATI Amina	Docteur, U. Khenchela, Algérie	Examineur

Dédicaces

À moi.

Je me dédie ce travail, résultat

d'un rêve poursuivi contre vents et marées.

Pour chaque instant arraché au temps, pour chaque victoire sur le découragement.

À toi, ma mère.

Toi qui as offert inconditionnellement.

Tes sacrifices m'ont élevée plus haut que mes peurs.

Cette thèse porte la trace de ton amour infini.

À toi, mon père.

L'homme courageux et persévérant .

Ton regard fier m'a appris à tenir debout.

À mes sœurs : Houda, Naouel, Ratiba et Haoua.

Présences douces, âmes complices. Vos mots, vos gestes, vos silences m'ont portée quand mes forces faiblissaient.

À mes frères : Jalil, Houari et Ahmed.

Pour cette fraternité solide qui m'a toujours accompagnée.

Et à mes petits soleils, mes neveux : Ghaith et Laith,

A mon oncle Zoubir (Toutou) , un frère de coeur

A vous les personnes que j'aime

Que ce travail soit un phare, un écho doux d'une voix qui vous dit :

La victoire appartient au plus opiniâtre

Remerciement

En tout premier lieu, je rends grâce à **Allah**, Le Tout-Puissant, pour Ses innombrables bienfaits. Par Sa volonté, les obstacles se sont transformés en opportunités, et les épreuves en forces. C'est avec une profonde reconnaissance que je Lui dis merci infiniment pour m'avoir facilité ce chemin.

Ce travail de recherche a été principalement réalisé au sein du Laboratoire des Capteurs, Instrumentation et Procédés (**LCIP**) de l'Université de Khenchela, Algérie sous la direction du **Professeur BENOUNIS Messaoud**. Il a également été mené en collaboration avec l'Institut des Sciences Analytiques (**ISA**) de l'Université Claude Bernard Lyon 1, en France, sous la direction du **Professeur ERRACHID EL-SALHI Abdelhamid**. À chacun d'eux, je témoigne ici toute ma reconnaissance pour la richesse de cette expérience scientifique et humaine.

Je remercie également le programme franco-algérien **PROFAS B+** pour le soutien financier qu'il m'a apporté. Ce financement a été déterminant pour la concrétisation de cette collaboration internationale et la réalisation de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse **le professeur BENOUNIS Messaoud**, pour la chance qu'il m'a donnée d'intégrer son laboratoire et de réaliser ce travail sous sa direction. Sa confiance indéfectible a été un moteur constant. Rien que le fait de savoir que l'on travaille avec le professeur **BENOUNIS** donne un sentiment d'assurance : on se sent soutenu, on se sent capable. Même lorsque des difficultés surgissent, cette confiance suffit à nous faire croire que tout finira par s'arranger. Je vous remercie également pour votre confiance qui m'a permis de travailler en toute liberté, d'explorer mes idées et d'évoluer avec autonomie tout au long de ce parcours. Merci infiniment pour cette occasion précieuse.

Je remercie chaleureusement le **Professeur ERRACHID EL-SALHI Abdelhamid** pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire à l'Institut des Sciences Analytiques de Lyon pendant un an et demi, et pour son soutien tout au long de cette période. Son invitation, qui pouvait sembler anodine, a été pour moi un véritable tournant. Cette expérience a profondément marqué mon parcours, tant sur le plan scientifique que personnel. Elle a forgé mon identité de chercheuse, mais aussi enrichi mon humanité. J'ai beaucoup appris grâce à vous, par votre professionnalisme, votre bienveillance et votre humilité. Merci du fond du cœur.

Ma gratitude va particulièrement au **Docteur BARAKAT Abdellatif**, pour son accompagnement, son soutien, son écoute et ses encouragements. Il a été à la fois un encadrant

rigoureux, un ami fidèle et un frère de cœur. Je lui serai toujours reconnaissante pour sa présence constante à mes côtés.

Je n'oublie pas **le professeur Jaffrezic-Renault Nicole**, que je remercie chaleureusement de m'avoir accueillie pour la toute première fois en 2018. Elle m'a ouvert les portes de son laboratoire avec générosité et bienveillance, me donnant ainsi accès à un environnement de recherche stimulant. Merci.

Je remercie également **GHOUMRASSI Moussa** pour son soutien, ses conseils et ses encouragements constants. Vous avez toujours cru en moi, et cela a compté plus que vous ne pouvez l'imaginer. Je vous suis éternellement reconnaissante.

À **mes collègues** de laboratoire **LCIP et ISA**, docteurs et doctorants, merci pour cette aventure humaine et scientifique partagée.

Un Merci tout particulier à **Docteur Amina BOUGHOUAL, Docteur Souad KOUCAR, et Docteur Sarah ATAILIA**, pour le temps qu'elles m'ont consacré, leur précieuse disponibilité, leurs réponses à chacune de mes questions, leurs mots doux et leur soutien. Je ne l'oublierai jamais.

Je pense aussi à mes amies **Soumia et Amel**, dont la présence et le soutien m'ont été d'un grand réconfort tout au long de cette étape.

Une pensée toute particulière à **Bouthaiena et Louisa** : vous avez été là durant une période très sensible de ma vie, et si je suis arrivée jusqu'ici aujourd'hui, c'est aussi grâce à vous. Merci infiniment.

Je remercie surtout **ma famille** pour leur soutien inconditionnel qui m'a portée dans les moments les plus exigeants. Et un merci du cœur à **ma sœur Houda**, mon âme sœur, pour sa présence, sa force et son amour inépuisable. Ce chemin, je ne l'aurais pas parcouru sans vous.

Enfin, je remercie **toute personne**, de près ou de loin, qui a contribué à la réalisation de ce travail. Votre aide, même discrète, a compté. Que chacun trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

Merci

Table des matières

Dédicaces	II
Remerciement	III
Liste des figures	IX
Liste des tableaux.....	XI
Liste d'acronymes et symboles	XII
Introduction générale	2
Chapitre 01 : Introduction aux biocapteurs : principe de fonctionnement, typologie et fonctionnalisation.....	7
1 Introduction	7
2 Biocapteur	7
3 Classification des biocapteurs	8
3.1 Classification des biocapteurs en fonction de bio-récepteur	9
3.1.1 Biocapteurs d'affinité.....	9
3.1.2 Biocapteurs catalytiques	9
3.1.3 Biocapteurs biomimétiques.....	9
3.2 Classification des biocapteurs en fonction de type de transducteur	9
3.2.1 Biocapteur thermique	10
3.2.2 Biocapteur optique.....	10
3.2.2.1 Biocapteur optique à résonance de plasmons de surface (SPR).....	10
3.2.2.2 Biocapteur optique à base de fluorescence.....	11
3.2.3 Biocapteur mécanique.....	11
3.2.3.1 Biocapteur piézoélectrique	11
3.2.3.2 Biocapteurs à base de microcantilever.....	13
3.2.4 Biocapteurs électrochimiques	13
3.2.4.1 Biocapteurs ampérométriques.....	13
3.2.4.2 Biocapteurs potentiométriques	15
3.2.4.3 Biocapteurs conductimétriques.	16
3.2.4.4 Biocapteurs impédancemétriques	18
4 Techniques de biofonctionnalisation des biocapteurs	19
4.1 Biofonctionnalisation par liaison covalente	19
4.2 Biofonctionnalisation par adsorption	20
4.3 Biofonctionnalisation par réticulation	20
4.4 Biofonctionnalisation par emprisonnement physique et encapsulation	21
5 Les caractéristiques de performance d'un biocapteur	22
6 Conclusion.....	23

7	Références	24
Chapitre 02 : Insuffisance cardiaque et biomarqueurs : de la physiopathologie aux marqueurs clés NT-proBNP et Cortisol		
1	Introduction	30
2	L'insuffisance cardiaque	30
3	Les biomarqueurs cardiaques	31
4	La prohormone N-terminale du peptide natriurétique cérébral (NT-pro BNP)	33
4.1	Les peptides natriurétiques	33
4.2	Biosynthèse et physiologie de NT-proBNP	35
4.3	Physiopathologie et dosage de NT-proBNP dans les liquides biologiques	37
5	Cortisol	39
5.1	Cortisol : structure et caractéristiques biochimiques	39
5.2	Biosynthèse et physiologie du Cortisol	40
5.3	Physiopathologie et dosage du cortisol dans les liquides biologiques	42
6	Méthodes de détection de NT-proBNP et du Cortisol dans l'insuffisance cardiaque	43
7	Les fluides biologiques	44
7.1	Sang	44
7.2	Urine	45
7.3	Salive	45
8	Conclusion	46
9	Références	47
Chapitre 03 : Conception expérimentale et mise en œuvre du biocapteur électrochimique salivaire pour la détection simultanée de NT-proBNP et de cortisol : approche méthodologique		
		54
1	Introduction	54
2	Le choix de biomarqueurs	54
3	Matériaux et réactifs	54
3.1	Produits utilisés	54
3.2	Appareils et dispositifs de mesures	56
4	Préparation des solutions	57
4.1	Préparation des anticorps Anti-NT-proBNP et Anti-Cortisol	57
4.2	Préparation des solutions standards des biomarqueurs	58
4.3	Préparation de la salive artificielle	59
4.4	Préparation des solutions standards pour la méthode des ajouts dosés	60
4.4.1	Principe général de la méthode des ajouts dosés	60
4.4.2	Préparation des solution (SAM)	60
5	Biofonctionnalisation de la surface du biocapteur	61

5.1	Nettoyage de la surface du capteur	61
5.2	Fonctionnalisation de la surface du capteur	62
5.2.1	Préparation du sel de diazonium (4-APA)-Principe.....	62
5.2.2	Electrodéposition de 4-APA.....	64
5.2.3	Activation de 4-APA par EDC/NHS-Principe.....	65
5.2.4	Immobilisation des anticorps Anti-NT-proBNP et Anti-Cortisol.....	66
5.2.5	Blocages des groupes -COOH résiduels	66
6	Techniques électrochimiques	66
6.1	Voltampérométrie cyclique (CV).....	66
6.1.1	Principe de CV	66
6.1.2	Les grandeurs d'un voltammogramme cyclique	68
6.1.3	Application de CV	69
6.2	Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)	70
6.2.1	Principe de SIE	70
6.2.2	Représentations graphiques de SIE.....	73
6.2.2.1	Diagramme de Nyquist	73
6.2.2.2	Digramme de Bode	75
6.2.3	Modèles de circuits électriques équivalents	76
6.2.3.1	Circuits de Randles	76
6.2.3.2	Le fitting (Ajustement des données)	78
6.2.4	Application de SIE	79
6.3	Paramètres expérimentaux appliqués en CV et SIE	79
7	Conclusion	80
8	Références	81
Chapitre 4 : Evaluation de la performance analytique des biocapteurs élaborés pour la détection de NT pro BNP et Cortisol dans la salive		84
1	Introduction	84
2	Synthèse globale de l'approche méthodologique de biofonctionnalisation du biocapteur	84
3	Caractérisation électrochimique de biocapteur	87
3.1	Electrodéposition de 4-APA.....	87
3.2	Caractérisation par la voltampérométrie cyclique (CV).....	88
3.3	Caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).....	89
3.4	Caractérisation microscopique	91
4	Validation de la détection des biomarqueurs par spectroscopie d'impédance électrochimique dans une solution tapon PBS	91
4.1	Détection simultanée de NT-proBNP et de Cortisol.....	92

4.2	Etude de la sélectivité de biocapteur en présence des interférents biologiques	95
5	Validation de la détection des biomarqueurs par spectroscopie d'impédance électrochimique dans la salive artificielle humaine (SAH)	96
5.1	Evaluation de l'effet de la matrice salivaire et son impact sur la détection.....	96
5.2	Détection simultanée de NT-proBNP et de Cortisol dans la SAH	97
5.3	Etude de la sélectivité de biocapteur en présence des interférents biologiques	100
5.4	Validation de la détection par la méthodes des ajouts dosées (SAM)	101
6	Conclusions et perspectives.....	103
7	Références	104
	Conclusion générale et perspectives	106
	Annexes	103
	IL-10.....	103
	TNF- α	104
	Résumé	103
	Abstract.....	104
	ملخص	105
	Production scientifique	106

Liste des figures

Figure 1 : Illustration schématique de la composition d'un biocapteur	8
Figure 2: Principe de fonctionnement d'un biocapteur SPR	10
Figure 3: Principe de détection dans un immuncapteur basé sur QCM	12
Figure 4: Principe de détection dans un biocapteur ampérométrique	14
Figure 5 : Principe de détection dans un biocapteur potentiométrique	16
Figure 6: Principe de détection dans un biocapteur conductimétrique.....	18
Figure 7 : Montage pour la mesure de l'impédance.....	19
Figure 8 : Les différentes techniques de biofonctionnalisation des biocapteur	22
Figure 9: Structure primaire des trois peptides natriurétiques (ANP-28AAs, BNP-32AAs, CNP-22AAs.).....	34
Figure 10 : Schéma illustrant la biosynthèse des peptides natriurétiques	37
Figure 11 : Structure moléculaire du Cortisol.....	40
Figure 12 : Schéma représentant l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et l'effet du complexe cortisol-GR sur la transcription. CRH : Corticotropin-Releasing Hormone, ACTH : hormone adrénocorticotrope.	41
Figure 13 : Le système de mesure électrochimique (Boite de Faraday et le potentiostat VMP3)	56
Figure 14 : Le transducteur électrochimique	57
Figure 15 : Illustration du principe de la méthode des ajouts dosés appliquée à la détection de NT-proBNP et de cortisol dans la salive artificielle.....	61
Figure 16 : Structure chimique de 4-Aminophénylacétique Acide (4-APA)	62
Figure 17 : Illustration des étapes de formation du sel de diazonium.....	63
Figure 18 : Illustration du mécanismes d'activation des groupements -COOH de 4-APA avec l'EDC/NHS	65
Figure 19 : (a) rampe triangulaire d'un potentiel utilisé en voltampérométrie cyclique pour obtenir le voltammogramme (b)	67
Figure 20 : Allure typique d'un voltammogramme cyclique	68
Figure 21 : (a) Système électrochimique a 3électrodes, (b) Représentation schématique de déphasage entre le potentiel appliqué (E) et le courant résultant (I).....	70
Figure 22 : Système électrochimique non linéaire soumis a un potentiel sinusoïdal.....	71
Figure 23 : Représentation d'un vecteur impédancemétrique : $Im(Z)$ en fonction de $Re(Z)$..	73
Figure 24 : Digramme de Nyquist typique des phénomènes électrochimiques en fonction de la fréquence appliquée	74
Figure 25 : Digramme de Bode du module $ z $ (a) et la phase de l'impédance en fonction des fréquences appliquées.....	76
Figure 26 : Circuit de Randles équivalent au diagramme de Nyquist (figure 24)	78
Figure 27 : Exemple d'une modélisation d'un diagramme de Nyquist utilisant le Zfit, la courbe bleue correspond aux données expérimentales, et la courbe rouge au fitting. Le valeurs extraits de modélisation sont présentés dans le tableau à droite	79
Figure 28 : Plateforme électrochimique de biocapteur.....	85
Figure 29 : Synthèse globale de l'approche méthodologique de biofonctionnalisation du biocapteur.....	86
Figure30 : (a)Voltammogramme de l'électrodéposition de 4-APA (b) Le premier cycle de l'électrodéposition (Fenêtre de potentiel ; 0 V to -1.1 V, Vitrasse de balayage = 80 mV/s)..	87

Figure 31 : Voltammogramme de caractérisation avant (a) et après électrodéposition (b) de 4-APA Vitesse de balayage 80 mV/s , Fenêtre de potentiel -0,2 a +0,6 V.....	89
Figure 32 : Diagramme de Nyquist avant (noir), après (rouge) l'électrodéposition de 4-APA, et après immobilisation des anticorps (Bleu).....	90
Figure 33 : Photo de la plateforme des électrodes avant (a) et après (b) l'électrodéposition de 4-APA.....	91
Figure 34 ; Diagrammes de Nyquist a déférentes concentrations des biomarqueurs cibles préparées dans le PBS a 5 mM of K ₃ [Fe(CN) ₆]/ K ₄ [Fe(CN) ₆] (A) EIS détection de NT-proBNP dans l'absence de Cortisol, (B) EIS détection de Cortisol dans l'absences de NT-proBNP ; (C) EIS détection de NT-proBNP en présence de Cortisol ; (D) EIS détection de Cortisol en présence de NT-proBNP.....	93
Figure 35 : (A) Sensibilité de biocapteur pour la détection séparée de NT-proBNP et Cortisol (B) Sensibilité de biocapteur pour la détection simultanée de NT-proBNP et Cortisol.....	95
Figure 36 : Evaluation de la Sélectivité du biocapteurs en présence d'interférons biologiques IL-10 et TNF- α dans le PBS.....	96
Figure 37 : Digramme de Nyquist après plusieurs incubation dans la salive artificielle-effet matrice de la SAH.....	97
Figure 38 : Diagrammes de Nyquist a déférentes concentrations des biomarqueurs cibles préparées dans la salive artificielle (A) EIS détection de NT-proBNP (B) EIS détection de Cortisol.....	98
Figure 39 A) Sensibilité de biocapteur pour la détection simultané de NT-proBNP et Cortisol dans le PBS (B) Sensibilité de biocapteur pour la détection simultanée de NT-proBNP et Cortisol dans la salive artificielle.....	98
Figure 40 ; Droite de régression de la modélisation $\Delta R_{ct}R_{ct}$ en fonctions de concentrations de NT-proBNP (A) et Cortisol (B) dans la salive artificielle.....	100
Figure 41 : Evaluation de la Sélectivité du biocapteurs en présence d'interférons biologiques IL-10 et TNF- α dans la salive artificielle.....	101
Figure 42 : Diagrammes de Nyquist obtenus en appliquant la SAM : (A) NT-proBNP, (B) Cortisol , Level (1,2,3,4) correspond a (0,5,10,15) NT-proBNP (en pg/mL) et du Cortisol (en ng/mL) respectivement , (C) Droite de régression de la modélisation $\Delta R_{ct}R_{ct}$ en fonctions de concentrations de NT-proBNP utilisée pour trouver la concentration inconnu dans l'échantillon (NT-proBNP/Cortisol). (D) Droite de régression de la modélisation $\Delta R_{ct}R_{ct}$ en fonctions de concentrations du Cortisol utilisée pour trouver la concentration inconnu dans l'échantillon (NT-proBNP/Cortisol).	102
Figure 43 : Structure de IL-10.....	103
Figure 44 : Structure cristallisée de TNF- α humain.....	104

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des biomarqueurs cardiaques.....	33
Tableau 2 : Valeurs seuils de NT-proBNP en cas d'insuffisance cardiaque aigue	39
Tableau 3 : Concentrations usuelles du cortisol dans différents liquides biologiques (valeurs indicatives).....	42
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des principales méthodes validées ou en cours de validations utilisées pour la détection de NT-proBNP et du Cortisol	44
Tableau 5 : Inventaire des produits impliqués dans le protocole expérimental	55
Tableau 6 : Concentrations des solutions standards de biomarqueurs et des solutions d'interférences.....	59
Tableau 7 : Niveaux de concentrations en NT-proBNP et de cortisol utilisés pour la méthodes des ajouts dosés	60
Tableau 8 : Récapitulatif des paramètres de l'électrodéposition de 4-APA.....	64
Tableau 9 : Correspondance entre la forme du voltammogramme et la nature de processus .	69
Tableau 10 : Corrélation entre les phénomènes électrochimiques et le digramme de Nyquist en fonction des plages de fréquences appliquées dans un système étudié par SIE	75
Tableau 11 : les composants du circuit de Randles et leur interprétation dans un système électrochimique	77

Liste d'acronymes et symboles

Liste d'acronymes

AA	Acide Aminé
Ac	Anticorps
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
ACTH	hormone adrénocorticotrope
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CE	Counter Electrode (Anglais)/Contre électrode
Cdl	Capacité de la double couche idéale
CLIA	Chimoluminescent immunoassay
CNP	C-type Natriuretic Peptide
CPE	Elément de phase constante
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CV%	Coefficient de variation
EDC	N-(3-diméthylaminopropyl)-N-ethyl carbodiimide hydrochloride
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HHS	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
IC	Insuffisance cardiaque
IL-10	Interleukine-10
LC-MS/MS	Chromatographie liquide-spectrométrie de masse
LDL	low density lipoproteins (Lipoprotéines de basse densité)
LOD	Limit of detection
MCV	Maladie cardiovasculaire
NPR	Neuropeptides récepteurs
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NT-proBNP	N-Terminal prohormone of brain natriuretic peptide (Anglais)
NP	Peptides natriurétique
PBS	Phosphate buffer solution
QCM	Quartz cristal microbalance
Rct	Résistance de transfert de charge
RE	Reference Electrode (Anglais)/ électrode de référence
RIA	Radioimmunoassay
SAH	Salive artificielle humaine

SAM	Standard addition method (Anglais)/ méthode des ajouts dosés
SPR	résonance de plasmons de surface
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
WE	Working Electrode (Anglais)/ electrode de travail

Liste de symboles

E_i	Potentiel initial
E_f	Potentiel final
E_{pa}	Potentiel de pic anodique
E_{pc}	Potentiel de pic cathodique
Hz	Hertz
I	Intensité du courant
I_{pa}	Courant de pic anodique
I_{pc}	Courant de pic cathodique
Ω	Ohms
R^2	Coefficient de corrélation
ω	Fréquence de signal
Z	Résistance totale (l'impédance)
Z'	Résistance réelle $Re(Z)$
Z''	Résistance imaginaire $Im(Z)$
Φ	Déphasage entre potentiel et courant

Introduction générale

Introduction générale

Les maladies à fort impact mondial telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les cancers...etc. présentent un défi majeur dans le monde entier, et génèrent une charge lourde sur les systèmes de santé selon les institutions sanitaires, notamment l'organisation mondiale de santé (OMS), non seulement par leur taux de mortalité, mais aussi par leur impact socio-économique.[1, 2]

Ces maladies non transmissibles évoluent souvent lentement et silencieusement pendant des années, durant cette phase asymptomatique aucun signe clinique est visible pour pouvoir prédire ou détecter la maladie[2], néanmoins des changements métaboliques moléculaires sont en cours dans l'organisme. Pour répondre au besoin de la médecine moderne dans sa quête d'un diagnostic précoce et un pronostic fiable, les biomarqueurs se positionnent comme des indicateurs physiopathologiques robustes en fournissant des informations fiables, objectives et mesurables concernant un processus ou l'état de santé d'un patient.[3, 4]

Les maladies cardiovasculaires notamment l'insuffisance cardiaque (IC) est l'une des maladies multifactorielles les plus complexes, car les manifestations cliniques sont souvent non spécifiques, ce qui rend difficile un diagnostic précoce uniquement sur la base des symptômes cliniques vagues et tardives. Pour ces raisons, cette maladie est considérée comme l'une des principales causes de morbi-mortalité dans le monde. Aujourd'hui environ 26 millions de personnes sont touchés par l'IC selon l'OMS. [5, 6] Dans ce contexte, et comme il a été déjà indiqué, les biomarqueurs font un choix prometteur pour un diagnostic précoce, un pronostic fiable, et un suivi thérapeutique efficace[7]. Le NT-proBNP et le Cortisol sont deux biomarqueurs reconnus par leur pertinence clinique dans ce domaine : le NT-proBNP (N-terminal pro-B-type Natriuretic Peptide) protéine produite par le myocarde présentée aujourd'hui comme le biomarqueur standard pour sa valeur pronostique dans l'évaluation de l'IC[8], et le cortisol, hormone glucocorticoïde liée à la réponse au stress, qui s'avère également impliquée dans la régulation cardiovasculaire[9]. Ces biomarqueurs font l'objet de recherches approfondies et sont généralement dosés dans les fluides biologiques tels que le sang, le plasma ou le sérum.[9, 10] Toutefois, une autre problématique s'impose, le prélèvement sanguin reste une procédure invasive, potentiellement stressante, et peu adaptée aux situations nécessitant des mesures répétées ou au dépistage à grande échelle ce qui retarde souvent l'initiation du traitement, avec un impact négatif sur le diagnostic et/ou le pronostic affectant ainsi la qualité de vie de ces patients. Face à ces limitations, la salive offre de nombreux avantages par rapport au sang, c'est un fluide biologique alternatif, indolore, non invasif, facile à collecter, sans

besoin de personnel médical, et utilisable dans des contextes variés, y compris en dehors des structures hospitalières.[11]. Cependant, l'exploitation de ce fluide dans le cadre de diagnostics soulève plusieurs défis techniques, notamment en termes de sensibilité, de sélectivité et de stabilité des dispositifs de détection. Les méthodes de dosage classiques des biomarqueurs, telles que les techniques immunoenzymatiques (ELISA)[12], radio-immunologiques ou enzymatiques, présentent des inconvénients majeurs : elles sont coûteuses, exigent une infrastructure de laboratoire avancée, un temps d'analyse long ; et ne permettent pas une détection en temps réel.[13]

Face à ces limitations, les capteurs biomédicaux, et en particulier les biocapteurs offrent une solution innovante et prometteuse. Ces outils analytiques allient sensibilité, rapidité, miniaturisation et faible coût de production, tout en permettant une intégration facile dans des systèmes portables et automatisés non invasifs.[14] Leur capacité à effectuer des analyses multiplexées en temps réel tout en exploitant les fluides corporels accessibles tels que la salive, en fait des outils de choix dans le cadre d'un diagnostic point-of-care (POC). C'est dans cette optique que s'inscrit notre projet : le développement d'un biocapteur électrochimique sans marquage, simple à utiliser et basé sur la mesure d'impédance et de signaux électriques, pour la détection simultanée de NT-proBNP et de Cortisol (des biomarqueurs de l'IC).[15]

C'est dans cette perspective que s'inscrit la présente recherche, qui vise à concevoir un biocapteur électrochimique capable de détecter simultanément le NT-proBNP[16] et le cortisol dans la salive,[11, 17] en s'appuyant sur des techniques de biofonctionnalisation de surface adaptées et une architecture analytique optimisée.

Cette thèse s'organise en quatre chapitres complémentaires :

- Le premier chapitre présente un état de l'art détaillé sur les capteurs, avec un accent particulier sur les biocapteurs électrochimiques, leurs principes de fonctionnement, et leurs composants clés. Ce socle théorique permet de contextualiser les choix technologiques effectués dans la présente étude.
- Le deuxième chapitre est consacré à la compréhension des maladies cardiaques notamment l'insuffisance cardiaque(IC), la biosynthèse et la physiopathologie de NT-proBNP et le Cortisol. Et retrace les grandes lignes des fluides biologiques, en mettant l'accent sur la salive.
- Le troisième chapitre présente l'approche méthodologique utilisés pour la conception du biocapteur. Il expose en détail les matériaux utilisés, les étapes de

biofonctionnalisation des surfaces électrochimiques, les protocoles de préparation des échantillons, ainsi que les techniques électrochimiques utilisés pour détection.

- Enfin, le quatrième chapitre discute les résultats obtenus, en analysant leur cohérence et leur pertinence avec le contexte de notre projet. En conclusion les limites et les perspectives d'applications cliniques seront abordées.

L'objectif de ce travail est de participer au développement d'outils d'analyses médicales intelligents accessibles et adaptés aux besoins croissants de la médecine moderne. Le défi scientifique de cette étude demeure dans l'intégration de deux axes innovants :

- D'un côté, le développement d'un biocapteur multiplexé capable de détecter deux biomarqueurs simultanément dans un même échantillon.
- D'un autre côté, tester la fiabilité de la salive artificielle et par la suite exploiter la salive comme fluide biologique fiable pour le diagnostic cardiovasculaire.

La réalisation de ce travail exige des connaissances interdisciplinaires, appelant des connaissances en biologie moléculaire, en électrochimie, en chimie analytique et en ingénierie des matériaux.

Ainsi, cette thèse vise à rapprocher les laboratoires de recherche des véritables besoins cliniques afin d'améliorer la qualité de vie des patients et faciliter le travail des cliniciens en proposant des solutions technologiques innovantes pour le diagnostic précoce des désordres physiopathologiques majeurs.

Références

- [1] M.-A. Bloch and L. Hénaut, *Coordination et parcours: la dynamique du monde sanitaire, social et médico-social*: Dunod, 2024.
- [2] M. de la Santé, "OMS," *Rapport Annuel*, p. 1, 2011.
- [3] B. Buszewski, M. Kęsy, T. Ligor, and A. Amann, "Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases," *Biomedical chromatography*, vol. 21, pp. 553-566, 2007.
- [4] M. Kumar and S. K. Sarin, "Biomarkers of diseases in medicine," *Current Trends in Science*, vol. 70, pp. 403-417, 2009.
- [5] M. W. Rich, "Heart failure disease management: a critical review," *Journal of cardiac failure*, vol. 5, pp. 64-75, 1999.
- [6] D. Tomasoni, M. Adamo, C. M. Lombardi, and M. Metra, "Highlights in heart failure," *ESC heart failure*, vol. 6, pp. 1105-1127, 2019.
- [7] M. Sarhene, Y. Wang, J. Wei, Y. Huang, M. Li, L. Li, *et al.*, "Biomarkers in heart failure: the past, current and future," *Heart failure reviews*, vol. 24, pp. 867-903, 2019.
- [8] N. Ibrahim and J. L. Januzzi, "The potential role of natriuretic peptides and other biomarkers in heart failure diagnosis, prognosis and management," *Expert review of cardiovascular therapy*, vol. 13, pp. 1017-1030, 2015.
- [9] M. Yamaji, T. Tsutamoto, C. Kawahara, K. Nishiyama, T. Yamamoto, M. Fujii, *et al.*, "Serum cortisol as a useful predictor of cardiac events in patients with chronic heart failure: the impact of oxidative stress," *Circulation: Heart Failure*, vol. 2, pp. 608-615, 2009.
- [10] G. Lippi, A. Von Meyer, J. Cadamuro, and A.-M. Simundic, "Blood sample quality," *Diagnosis*, vol. 6, pp. 25-31, 2019.
- [11] J. Pytko-Polonczyk, A. Jakubik, A. Przeklasa-Bierowiec, and B. Muszynska, "Artificial saliva and its use in biological experiments," *J. Physiol. Pharmacol*, vol. 68, pp. 807-813, 2017.
- [12] N. Benabbou, S. Boukerrouche, and H. Salmi, "Intérêts et limites de l'utilisation de la technique ELISA dans la recherche d'auto-anticorps anti-nucléaires dans le diagnostic des connectivites," Université Mouloud Mammeri, 2022.
- [13] S. Avrameas, "Enzyme immunoassays and related techniques: development and limitations," *New developments in diagnostic virology*, pp. 93-99, 1983.
- [14] P. Mehrotra, "Biosensors and their applications—A review," *Journal of oral biology and craniofacial research*, vol. 6, pp. 153-159, 2016.
- [15] V. Naresh and N. Lee, "A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors," *Sensors*, vol. 21, p. 1109, 2021.
- [16] A. Palazzuoli, M. Gallotta, I. Quatrini, and R. Nuti, "Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure," *Vascular health and risk management*, pp. 411-418, 2010.
- [17] A. Ilea, V. Andrei, C. N. Feurdean, A.-M. Băbțan, N. B. Petrescu, R. S. Câmpian, *et al.*, "Saliva, a magic biofluid available for multilevel assessment and a mirror of general health—A systematic review," *Biosensors*, vol. 9, p. 27, 2019.

Chapitre 01 :

Introduction aux biocapteurs : principe de fonctionnement, typologie et fonctionnalisation

Chapitre 01 : Introduction aux biocapteurs : principe de fonctionnement, typologie et fonctionnalisation

1 Introduction

Au cœur des biotechnologies moderne où la science s'associe à l'ingénierie pour créer des outils puissants qui repoussent les limites de la connaissance, les biocapteurs se dressent comme des outils essentiels, Ces dispositifs miniaturisés, dotés d'une puissante capacité de détection, nous permettent d'explorer le monde invisible des molécules biologiques, de résoudre les mystères de la vie à une échelle inimaginable et ouvrent de nouvelles perspective pour l'avenir dans différents domaines.

Dans ce chapitre nous présenterons le principe du fonctionnement d'un biocapteur, les différents types de biocapteurs, et leurs composants, en mettant un accent particulier sur les biocapteurs électrochimiques.

2 Biocapteur

Un biocapteur est un dispositif analytique complexe qui combine plusieurs composants afin de détecter de manière sélective un substance cible dans un échantillon biologique ou environnemental. Un biocapteur est composé essentiellement d' un élément de reconnaissance biologique appelé « Biorécepteur », c'est la partie biologique de biocapteur qui interagit avec la substance cible d'une manière spécifique et sélective. Cela peut inclure des enzymes, des anticorps, des cellules vivantes ou d'autres biomolécules qui seront immobilisés sur une interface appelé "Transducteur", le transducteur convertit le signal biologique généré par l'interaction entre le biorécepteur et la substance cible en un signal physique mesurable, généralement électrique.[1, 2]

Le fonctionnement des biocapteurs et basé sur l'exploitation de l'interactions sélective entre les biorécepteur et la substance cible. Un complexe biorécepteur/substance ce forme lorsque la substance cible est présente dans l'échantillon produisant ainsi une réponse biologique qui se traduit par un signal mesurable tel qu'un changement de courant, de couleur ou de fluorescence. Ce signal est converti par le transducteur, ensuite amplifié et quantifié par les composants électroniques du biocapteur. Le traitement de ce signal permet ainsi de déterminer la concentration ou confirmer la présence de la substance cible.

dans l'échantillon [3], enfin les résultats de la détection seront affichés d'une manière interprétable en utilisant des écrans et des logiciels adéquats (Figure 1).

Les biocapteurs ont un large éventail d'applications, du diagnostic médical à la détection de polluants environnementaux en passant par la surveillance et le contrôle des processus biotechnologiques. Leur capacité à fournir des résultats rapides et concrets en fait des outils précieux dans la recherche scientifique, la pratique clinique, l'industrie et l'agriculture.[4]

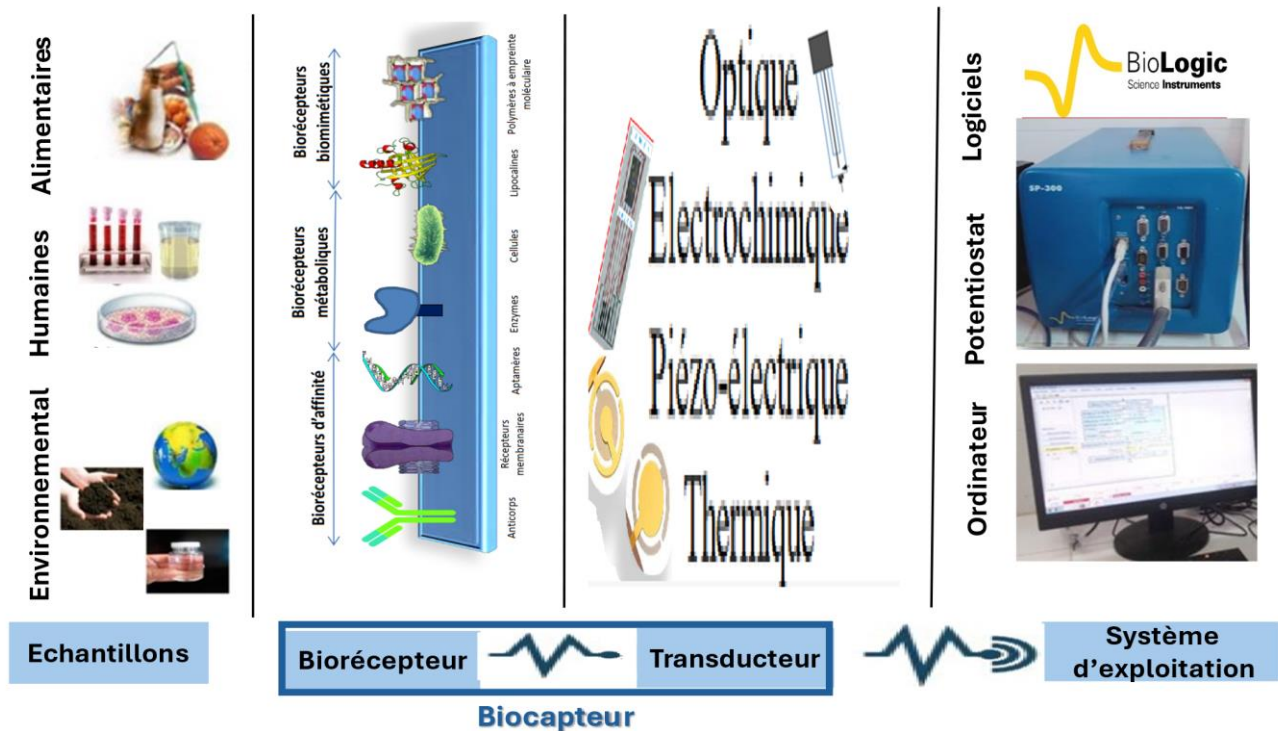


Figure 1 :Illustration schématique de la composition d'un biocapteur

3 Classification des biocapteurs

Comme nous l'avons vu, les biocapteurs permettent la détection et le dosage d'une substance cible grâce à la combinaison biorécepteur/transducteur, donc l'obtention d'une réponse fiable et précise dépend en grande partie du choix de biorécepteur et de transducteur.

Dans cette partie, nous allons présenter la classification des biocapteurs en fonction de biorécepteur et leurs types de réaction, et en fonction de type de transducteur.

3.1 Classification des biocapteurs en fonction de bio-récepteur

Le bio-récepteur est la partie fondamentale du biocapteur, il permet la reconnaissance d'une manière spécifique et sélective la substance cible[1]. Un bio-récepteur est un composant biologique, il peut prendre plusieurs formes[5], notamment des acides nucléiques (Aptacapteur)[6], des enzymes[7, 8], des anticorps (Ac) (immuncapteur)[9, 10], des cellules entières[11], des tissus et organites[12], ou d'autres molécules biologiques.

Selon le type de la réaction biologique (biochimique) de reconnaissance entre bio-récepteur et substance cible, les biocapteurs peuvent être classés en :

3.1.1 Biocapteurs d'affinité

Ces biocapteurs reposent sur des interactions fortes et spécifiques entre le bio-récepteurs et la substance cible, tout simplement la substance cible se lie au biorécepteur sans aucun changement dans sa structure, souvent un anticorps ou une protéine[13, 14].

3.1.2 Biocapteurs catalytiques

Comme le nom indique, ces biocapteurs catalysent des réactions chimiques spécifiques, c'est à dire le biorécepteur, généralement des enzymes, accélèrent la réaction biologique et modifient la substance cible, qui permet au finale de détecter soit la consommation de la substance cible (diminution de la concentration), soit la synthèse d'une nouvelle substance (augmentation de la concentration)[15].

3.1.3 Biocapteurs biomimétiques

Bio pour "Biologique" et mimétique pour "imiter", en s'inspirant des systèmes biologiques, les scientifiques ont réussi à imiter et reproduire les mêmes mécanismes de détection d'une façon artificielle[16].

Le principe de fonctionnement de biocapteur repose sur les interactions entre un bio-récepteur et une substance cible qui génèrent un signal de déférents formes selon le type de biorécepteur, le signal peut être sous forme d'un changement chimique, électrochimique, optique, enthalpique, ou d'autres propriétés physiques. Ce signal sera détecté par un transducteur approprié, cela nous amène à la classification des biocapteurs selon le type de transducteur.

3.2 Classification des biocapteurs en fonction de type de transducteur

Le transducteur est la partie qui transforme le signal généré par les interactions entre bio-récepteur et substance cible, en un signal mesurable[1], afin de faciliter la détection, selon le type de transducteur, on distingue déférents types de biocapteurs.

3.2.1 Biocapteur thermique

Les biocapteurs thermiques sont principalement axés sur la détection des changements de température et d'enthalpie qui se produisent lors d'interactions biomoléculaires spécifiques, Ces changements sont proportionnels à l'enthalpie molaire et au nombre total de molécules de produits produites lors de la formation du complexe biorécepteur/espèce cible.[17].

3.2.2 Biocapteur optique

Un biocapteur optique utilise les principes d'optique pour la détection des substances cibles, la formation de complexe biorécepteur/substance cible provoque des changements des propriétés optiques, tels que la fluorescence, l'absorbance, la réfraction ou la réflectance. Les signaux optiques seront utilisés pour la détection et le dosage des échantillons[18, 19].

3.2.2.1 Biocapteur optique à résonance de plasmons de surface (SPR)

Le principe de fonctionnement de ces biocapteurs repose sur la mesure des changements dans l'indice de réfraction de la lumière, ce phénomène se produit lorsque la lumière est réfractée a la surface d'un matériau conducteur (généralement de l'or ou de l'argent) en contact avec un milieu diélectrique, on parle de phénomène de résonance de plasmons de surface.[20]

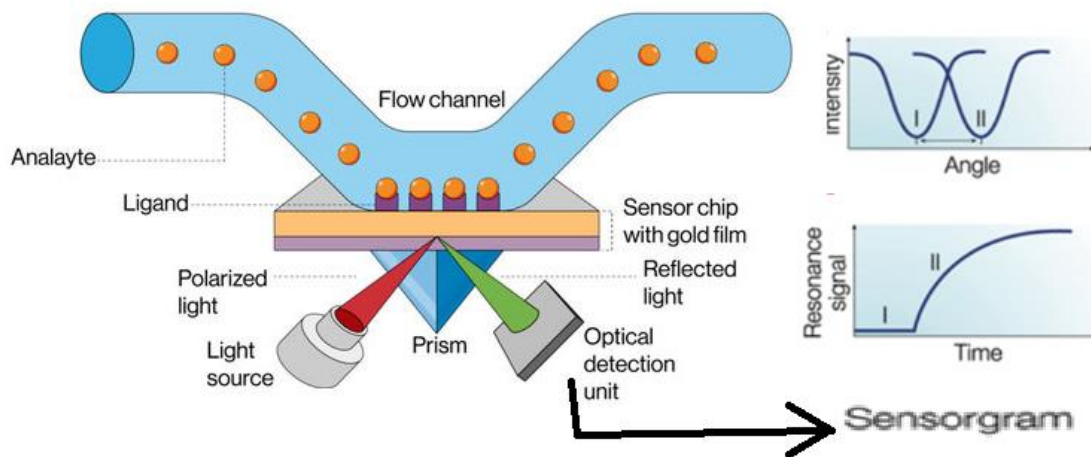


Figure 2:Principe de fonctionnement d'un biocapteur SPR

Lorsque une substance cible se lie avec le biorécepteur immobilisé sur le matériau conducteur, cela provoque un changement dans l'indice de réfraction de la surface métallique, et par conséquent provoque une modification de l'angle de réflexion (angle d'incidence) ou de

réfraction de la lumière (Figure 2). Ce changement d'angle est proportionnel à la concentration en temps réel de substance cible lié au biorécepteur (substance détectée)[21].

3.2.2.2 Biocapteur optique à base de fluorescence

Le principe de fonctionnement de ces biocapteurs repose sur l'utilisation du phénomène de fluorescence, qui est un processus optique dans lequel des molécules fluorescentes (fluorophore) absorbent la lumière d'une longueur d'onde spécifique puis émettent de la lumière d'une longueur d'onde différente[18]. L'exploitation de ce phénomène permet de bien choisir le fluorophore et la technique d'utilisation, par exemple être capable de se lier spécifiquement à la substance cible, ou être utilisé comme un marquage de la cible ou du bio-récepteur, de manière à générer un changement de fluorescence mesurable au moment de détection, la fluorescence émise est proportionnelle à la concentration détectée[22].

Dans cette partie nous avons cité les deux biocapteurs les plus courants, mais il existe d'autres biocapteurs optiques selon la propriété optique exploitée, tel que les biocapteurs à luminescence[23], biocapteurs à résonance plasmonique localisée[24],...etc.[18].

3.2.3 Biocapteur mécanique

Contrairement à d'autres types de biocapteurs qui détectent principalement des interactions chimiques ou optiques, les biocapteurs mécaniques se concentrent sur les changements physiques et mécaniques qui se produisent au moment de la formation du complexe biorécepteur/substances cible, tels que des changements de pression, de masse, des variations de fréquences, et ainsi de suite[25].

3.2.3.1 Biocapteur piézoélectrique

3.2.3.1.1 Biocapteur à base microbalance à quartz (QCM)

Ce type de biocapteur repose sur la mesure des très petites variations de masse en utilisant un cristal de quartz, ce dernier est un dispositif très sensible capable de vibrer à une fréquence de résonance très stable lorsqu'une tension électrique alternative est appliquée[26]. Le cœur de ces biocapteurs est un cristal de quartz couvert d'une couche métallique très fine fonctionnalisée avec des bio-récepteurs spécifiques, lorsque la substance cible se lie à ces bio-récepteurs, la fréquence de résonance du cristal change indiquant une variation de masse. Cette variation est proportionnelle à la concentration des molécules détectées[27], selon l'équation de Sauerbry (Equation 1.1).[28]

$$\Delta f_m = - \frac{2f_0^2 \Delta m}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad \text{Equation 1.1}$$

Où Δf_m est la variation de fréquence due au changement de la masse superficielle en Hertz (Hz), f_0 est la fréquence de résonance initiale du quartz (Hz), Δm est la variation de masse par unité de surface déposée sur le quartz (g.cm^2), ρ_q et μ_q sont respectivement la densité (g.cm^{-3}) et le module de cisaillement ($\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-2}$) du cristal de quartz.

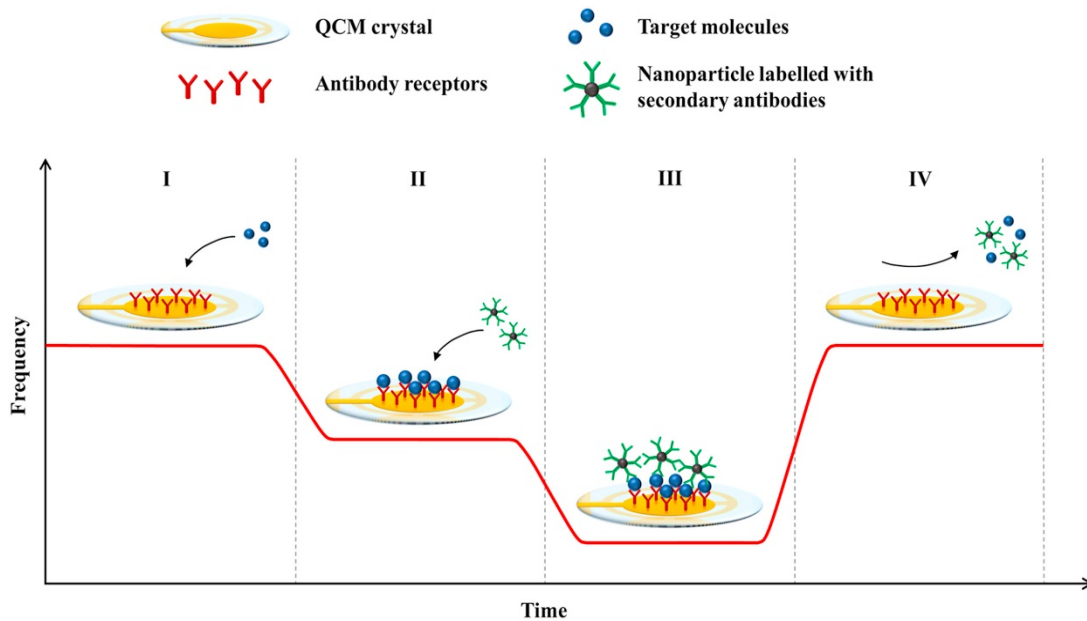


Figure 3: Principe de détection dans un immuncapteur basé sur QCM

La figure 3. Montre les réponses en fréquence du biocapteur à différentes étapes du test : (I) fréquence de base d'un cristal QCM avec des récepteurs d'anticorps immobilisés ; (II) liaison des molécules cibles aux récepteurs ; (III) liaison de nanoparticules marquées avec des anticorps secondaires ; (IV) régénération de la surface du capteur.[29]

3.2.3.1.2 Biocapteur à ondes acoustiques de surface (SAW)

Un autre biocapteur repose sur un mode de fonctionnement très proche au biocapteur QCM, en mesurant la vitesse de propagation des ondes acoustiques de surface générée par une tension électrique appliquée aux électrodes.[30] Lorsque une substance cible se fixe sur la surface fonctionnalisée avec des biorécepteurs spécifiques, cela provoque un changement de masse qui perturbe les ondes acoustiques de surface entraînant un changement dans la fréquence de résonance[31, 32].

Ce changement de fréquence de résonance des ondes acoustiques est proportionnel à la masse de substance lié aux biorécepteurs.

3.2.3.2 Biocapteurs à base de microcantilever

Comprendre et utiliser les changements physiques ou chimiques sont la base de détection dans les biocapteur a base de microcantilver. Ces biocapteurs sont utilisés dans de nombreuses domaines, notamment le diagnostique et le dépistage médical, la surveillance environnementale, l'hygiène et la qualité alimentaire, ainsi que la recherche biomédicale.[33, 34]

Le fonctionnement des biocapteurs microcantilever repose généralement sur le principe de détection de la flexion du cantilever en fonction d'une interaction spécifique entre une substance cible et une couche fonctionnelle immobilisée à sa surface. Les microcantilevers sont des poutres minces et flexibles fixées à un substrat constituées souvent des matériaux tels que silicium, nitrure de silicium ou oxyde de silicium, ou des polymères. [35, 36].

Lorsque la substance cible se lie à la couche fonctionnelle, la masse ou la charge exercée sur le cantilever change, ce dernier se déforme ou se plie, entraînant une déflexion mesurable grâce à diverses techniques de détection telles que la microscopie à force atomique et la spectroscopie Raman. En mesurant la déviation d'un microcantilever, la présence, la concentration et parfois les propriétés des molécules cibles dans un échantillon peuvent être déterminées [33, 36, 37] .

3.2.4 Biocapteurs électrochimiques

Le fonctionnement des biocapteurs électrochimiques repose sur la mesure du signal électrique provoqué par une modification des propriétés électrochimiques suite à une interaction entre le bio récepteur et la substance cible dans l'échantillon [38, 39], ces biocapteurs sont souvent classés en fonction du type de transduction électrochimique utilisé, tels que l'amperométrie[40], l'impédancemétrie [41], la voltampérométrie [42], la conductimétrie [43] ou la potentiométrie[44, 45]. En raison de leur spécificité, leur sensibilité élevée, et de leur facilité d'utilisation; ces dispositifs sont considérés comme des outils puissants dans de nombreux domaines de la recherche scientifique, de l'industrie, la santé, l'environnement et d'autres domaines [38, 46].

3.2.4.1 Biocapteurs ampérométriques

Les biocapteurs ampérométriques sont souvent utilisés pour la détection des espèces chimiques réactives produites lors d'une réaction oxydo-réduction spécifique [47]. Le principe de fonctionnement est basé sur la mesure du courant électrique généré par un transfert d'électrons à un potentiel fixe lors de l'interaction entre le biorécepteur fixé sur l'électrode et la substance

cible [40] ; qui peut être réduite ou oxydée. La mesure de ce courant permet de quantifier la concentration de la substance cible [40, 48] .

Une fois que l'analyte est identifié par le récepteur biologique, un signal électrique est généré suite à la production ou à la consommation d'éléments électroactifs[48, 49], tels que des électrons, des ions ou des composés tels que le peroxyde d'hydrogène [40, 47]. Le courant électrique produit par ces éléments est mesuré à l'aide d'un transducteur électrochimique. Ce dernier est constitué de trois électrodes, une électrode de travail, au sein de laquelle se déroule la réaction électrochimique ; une électrode de référence, pour maintenir un potentiel fixe ; et une contre-électrode (électrode auxiliaire), qui facilite la circulation du courant sans altérer le potentiel de l'électrode de travail [50, 51].

Le signal généré sous forme de courant doit ensuite être converti en tension, amplifié, puis traité afin de fournir une mesure exploitable de la concentration de l'analyte [52, 53]. La relation entre le signal mesuré et la concentration est régie par les principes de l'électrochimie, en particulier par la loi de Faraday, qui relate que la quantité de matière transformée qu'elle soit produite ou consommée ; à une électrode est proportionnelle à la charge électrique totale qui traverse le circuit[54].

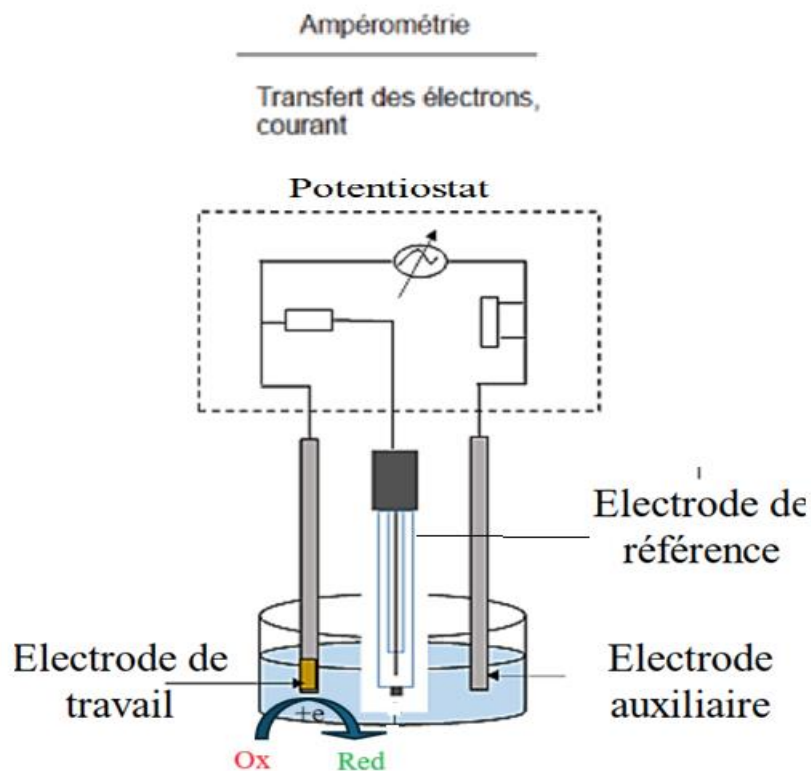


Figure 4: Principe de détection dans un biocapteur ampérométrique

Le premier biocapteur ampérométrique a été développé en 1962 par Leland C. Clark Jr., qui est considéré comme le père des biocapteurs[55]. Ce dispositif, élaboré pour mesurer la concentration d'oxygène dissous dans les liquides, utilise une électrode en platine revêtue d'une membrane semi-perméable dans le but de détecter la réduction de l'oxygène[56, 57]. Bien qu'initialement conçu pour quantifier l'oxygène, ce principe a établi les bases des biocapteurs modernes.

Clark et Lyons ont aussi développé, la même année, le premier biocapteur enzymatique en utilisant la glucose oxydase pour mesurer le taux de glycémie[58]. Ce biocapteur a marqué le début de l'ère des glucomètres, qui figurent aujourd'hui parmi les biocapteurs les plus couramment utilisés à l'échelle mondiale[57, 59].

3.2.4.2 Biocapteurs potentiométriques

Les biocapteurs potentiométriques sont des dispositifs analytiques permettent de déterminer la concentration d'un analyte en mesurant la différence de potentiel électrique entre deux électrodes [39, 60]; une électrode de travail et une électrode de référence. Selon l'équation de Nernst, cette variation de potentiel est liée au logarithme de la concentration de l'analyte (Equation 1.2)[61, 62].

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{Ox}}{a_{Red}} \right) \quad \text{Equation 1.2}$$

Ou : E est le potentiel mesuré de l'électrode. E° est le potentiel standard du couple redox. R est la constante des gaz parfaits (8,314 J.K⁻¹. mol⁻¹). T est la température en kelvins. n est le nombre d'électrons échangés dans la réaction redox. F est la constante de Faraday (96480 C.mol⁻¹). Et a_{Ox} et a_{Red} : Les activités des formes oxydée et réduite de l'analyte.

Ces biocapteurs fonctionnent en utilisant une électrode de travail fonctionnalisée avec un élément biologique immobilisé sur sa surface[39], tels qu'une enzyme, un anticorps ou un fragment d'ADN. La reconnaissance entre le biorécepteur et l'analyte induit une réaction biochimique qui change la concentration d'ions à la surface de l'électrode de travail.[55, 62] La

différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence est proportionnelle à cette variation de concentration)(Figure 5),

Ces biocapteurs potentiométriques sont des outils classiques, spécifiques et simples à utiliser grâce à leur concept simple avec un cout relativement bas.[63, 64] Des exemples emblématiques de ces biocapteurs, les électrodes sélectives aux ions (ISE, pour *Ion-Selective Electrodes*) tels que K^+ , Na^+ ou Ca^{2+} , ainsi que les biocapteurs utilisés pour des diagnostics médicaux, et dans les secteurs environnementales et industrielles[39, 65].

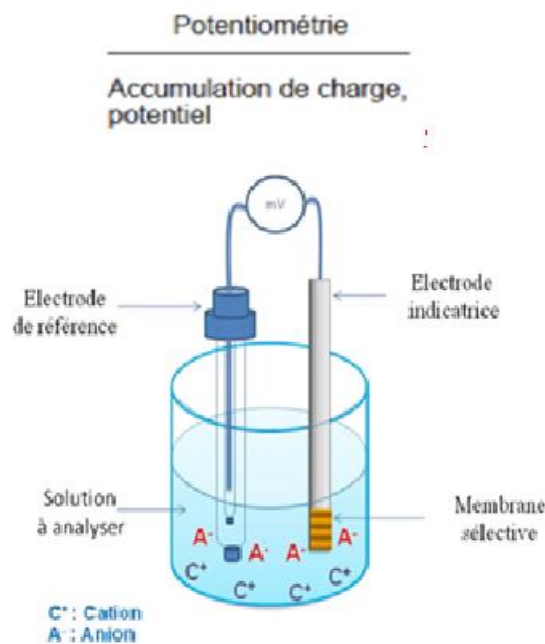


Figure 5 : Principe de détection dans un biocapteur potentiométrique

3.2.4.3 Biocapteurs conductimétriques.

Le principe de fonctionnement de ces biocapteurs est basé sur les mesures des variations de la conductivité électrique au sein d'une solution[43, 66]. Cette variation est due au changement de la concentration des ions chargés dans cette solution provoqué par une interaction spécifique entre le biorécepteur et l'analyte cible[43, 63].

Ces biocapteurs sont composés généralement de deux électrodes métalliques fonctionnalisés par des biorécepteurs)(Figure 6), ces électrodes servent d'un côté à appliquer une petite tension et de l'autre côté à mesurer la conductance de la solution afin de déterminer la concentration de

l'analyte en appliquant la loi d'Ohm (Equation 1.3)[66-68] ; et en utilisant les concepts dérivés de la conductivité électrique (Equation 1.4), et la conductance (Equation 1.5).

$$U = R \cdot I \quad \text{Equation 1.3}$$

Où U est la tension appliquée en Volts (V), R est la résistance de la solution en Ohms (Ω) et I, l'intensité en Ampères (A).

$$\sigma = G \frac{L}{S} \quad \text{Equation 1.4}$$

Où σ est la conductivité en $S \cdot m^{-1}$, G est la conductance en Siemens (S), L est la largeur entre les deux électrodes en m, et S est la surface de la cellule en m^2 .

$$G = \frac{1}{R} \quad \text{Equation 1.5}$$

Où G est la conductance en Siemens (S), et R est la résistance de la solution en Ohm (Ω).

La conductivité mesurée par ces biocapteurs est proportionnelle à la concentration des ions produites ou consommés durant la réaction biochimique, la relation est exprimée par l'équation 1.6.

$$\sigma = k \cdot C \quad \text{Equation 1.6}$$

Où σ est la conductivité ($S \cdot m^{-1}$), k est la constante qui dépend du biocapteur (géométrie des électrodes, milieu réactionnel), et C, est la concentration de l'analyte ($mol \cdot L^{-1}$).

Bien que ces biocapteurs sont avantageux pour leur simplicité, leur faible coût, leur sensibilité élevée. Cependant, leur utilisation est limitée par leur faible sélectivité, et leur sensibilité aux interférences ioniques et aux conditions environnementales.

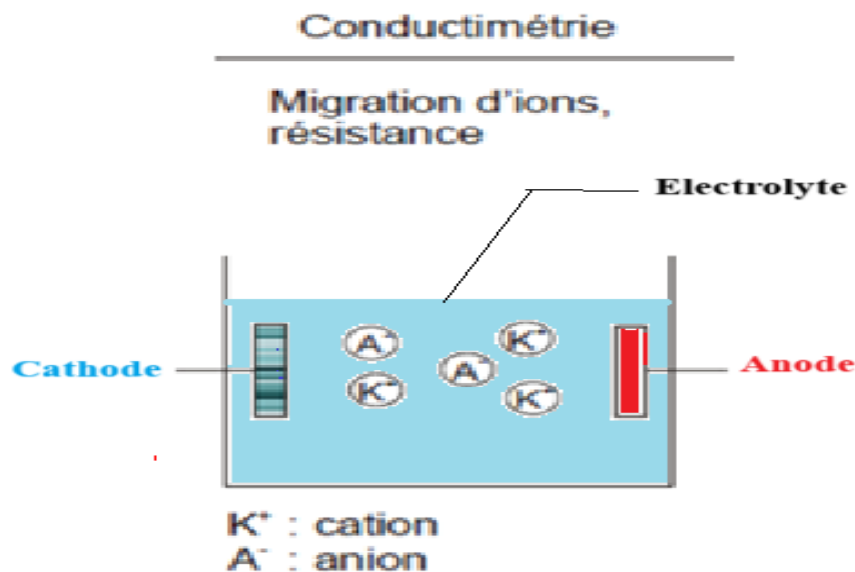


Figure 6: Principe de détection dans un biocapteur conductimétrique

3.2.4.4 Biocapteurs impédancemétriques

Les biocapteurs impédancemétrique, un autre type d'outils analytiques qui permettent la détection et la quantification des analytes cibles suite à des interactions biologiques spécifiques. Le principe de fonctionnement de ces biocapteurs est basé sur la mesure des variations de l'impédance électrique, autrement dit, les modifications de la résistance et de la réactance dans une cellule électrochimique (système électrochimique. Ces variations de l'impédance sont mesurées suite à des changements dans les propriétés électriques de l'interface de biocapteurs induits par la reconnaissance biorécepteur-analytes cibles dans le milieu réactionnel (système électrochimique)[69].

L'application d'un courant électrique alternatif de faible amplitude génère un champ électrique dans le système électrochimique)(Figure 7). L'interaction entre le biorécepteur et la molécule cible modifie les caractéristiques physico-chimiques de ce système. Ces derniers peuvent inclure une modification de la permittivité du milieu, une altération de la structure de la couche de surface ou une variation de la couche de double charge électrique; entraînant des variations dans l'impédance électrique qui est proportionnelle à la concentration de la molécule cible.[69, 70]

Une explication plus approfondie du fonctionnement de ce type de biocapteur sera fournie dans le troisième chapitre.

Comme nous avons vu, l'efficacité d'un biocapteur repose sur le choix adéquat d'un transducteur et d'un biorécepteur. [4, 62]. Cependant, cette étape n'est pas suffisante pour assurer le bon fonctionnement du biocapteur. Il est essentiel de considérer la biofonctionnalisation, qui correspond à l'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur [3, 25]. Cela nous conduit à aborder le quatrième point de ce chapitre.

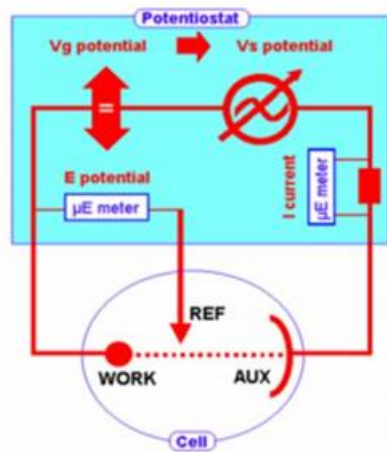


Figure 7 : Montage pour la mesure de l'impédance

4 Techniques de biofonctionnalisation des biocapteurs

La biofonctionnalisation d'un biocapteur signifie le processus utilisé pour l'immobilisation ou la fixation un biorécepteur comme une enzyme, un anticorps, un ADN.....etc. sur la surface du transducteur tout en préservant son activité biologique.[3, 5] Pour appliquer efficacement ce processus, il est essentiel de maîtriser les concepts fondamentaux de la physique et de la chimie[55].

L'ensemble des techniques utilisé pour la fonctionnalisations de ces dispositifs peut être classé en physiques et chimiques[25] (Figure 8).

4.1 Biofonctionnalisation par liaison covalente

La liaison covalente est une liaison forte qui implique le partage d'électrons entre deux atomes possédant une différence d'électronégativité limitée, [71]l'application de ce principe pour la biofonctionnalisation d'un biocapteur consiste à immobiliser des biorécepteurs sur la surface d'un transducteur par le biais d'une liaison covalente entre les groupes fonctionnels des

biorécepteurs et ceux présents ou introduits sur la surface du transducteur[72, 73], tels que les groupes amines (-NH₂), carboxyles (-COOH), thiols (-SH), hydroxyles (-OH) ou autres.[74]

Des étapes de préparations et d'activations préalables sont nécessaires pour établir une liaison covalente forte entre le transducteur et le biorécepteur. On cite comme exemple la silanisation pour ajouter des groupes aminés sur une surface[75], l'utilisation des agents de couplage tels que le N-Hydroxysuccinimide et 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (NHS/EDC) pour activer les groupes fonctionnels et faciliter la formation de la liaison covalente.[76] Glutaraldéhyde pour créer des liaisons entre deux groupes amines [77].....etc.

La biofonctionnalisation par la liaison covalente est une technique robuste et fiable qui assure une stabilité et une résistance élevées aux changements de pH, de température, et aux lavages répétés. Grâce à son irréversibilité elle assure une immobilisation durable des biorécepteurs, idéale pour des applications à long terme[55, 71]. Cependant, sa mise en œuvre est complexe et sollicite une expertise, car il y a des risques d'inactivation des biorécepteurs en raison des conditions chimiques utilisées, sans oublier le coût des agents de couplage et des réactifs.[55, 78]

4.2 Biofonctionnalisation par adsorption

Inversement à la technique précédente, l'adsorption est une technique non covalente simple ; le principe d'immobilisation repose sur des interactions physiques entre la surface d'un transducteur et le biorécepteur, [79]elle consiste à mettre ces deux derniers en contact directe pour une durée bien déterminée. Sans requérir de changements chimiques antérieurs, la liaison se fait par des forces non covalentes telles que des forces de Van der Waals, des interactions électrostatiques[80], , et des forces hydrophobes [79].

L'adsorption est une technique rapide, simple, et non coûteuse, néanmoins , elle présente des inconvénients , notamment une faible stabilité, une orientation non contrôlée des biorécepteurs et une fixation peu spécifique [78]. Pour améliorer son efficacité, la biofonctionnalisation par adsorption peut être combinée avec d'autres techniques, comme l'emprisonnement physique ou la réticulation.[81]

4.3 Biofonctionnalisation par réticulation

La réticulation est une autre technique de biofonctionnalisation du biocapteur, elle permet de produire un réseau tridimensionnel en formant des liaisons croisées entre les biorécepteurs elle

mêmes, ou/et avec la surface du transducteur grâce à l'utilisation d'un agent réticulant[78, 82] tel que le glutaraldéhyde[81, 82]. L'immobilisation durable et stable des biorécepteurs est assurée par l'agent réticulant suite à la création des ponts chimiques entre leurs groupes fonctionnels (thiols, carboxyles, amines)[83]. Lorsque cette technique est combinée avec une autre méthode, comme l'adsorption, on parle dans ce cas-là de la co-réticulation.

Comme toute autre technique, la réticulation présente des points forts et des points faibles. C'est une technique efficace pour l'immobilisation de biorécepteur. Elle offre une stabilité durable, haute sensibilité, une protection contre la dénaturation des biorécepteurs, et elle est adéquate à une large variété de biomolécules[78, 84, 85]. Toutefois, cette technique présente certaines contraintes, en raison des conditions chimiques ou d'une réticulation excessive une dégradation de l'activité biologique des biorécepteurs ou une réduction/inhibition de l'accessibilité à leur site actif peut survenir. Malgré ces limites, la réticulation reste un excellent choix pour garantir la stabilité et les performances des biocapteurs dans des environnements exigeants.[78]

4.4 Biofonctionnalisation par emprisonnement physique et encapsulation

Une technique de biofonctionnalisation non covalente, l'emprisonnement physique et/ou l'encapsulation consistent à maintenir en place les biorécepteurs soit par les enfermer dans une matrice polymérique ou par une barrière mécanique sans former de liaisons covalentes avec la surface du transducteur[78, 85].

Deux mécanismes différents sont utilisés pour l'emprisonnement de biorécepteurs, le premier, l'inclusion consiste à incorporer les biorécepteurs dans une matrice polymérique solide ou semi-solide comme, alginate,[86], sol-gel, et des polymères synthétiques[87]. L'interaction entre les biorécepteurs et les analytes est indirecte, elle se fait par diffusion de l'analyte dans la matrice[78, 87, 88]. Le deuxième est la rétention repose sur le maintien des biorécepteurs sur la surface de transducteur grâce à des barrières physiques qui empêchent leur désorption, et contrairement à l'inclusion, l'interaction entre le biorécepteur et l'analyte est directe[89, 90]. Bien que l'utilisation de cette technique soit limitée par plusieurs facteurs, comme une diffusion réduite des analytes ou une faible stabilité mécanique, elle demeure une méthode simple, compatible avec diverses biomolécules, et efficace pour de nombreuses applications.[78, 90].

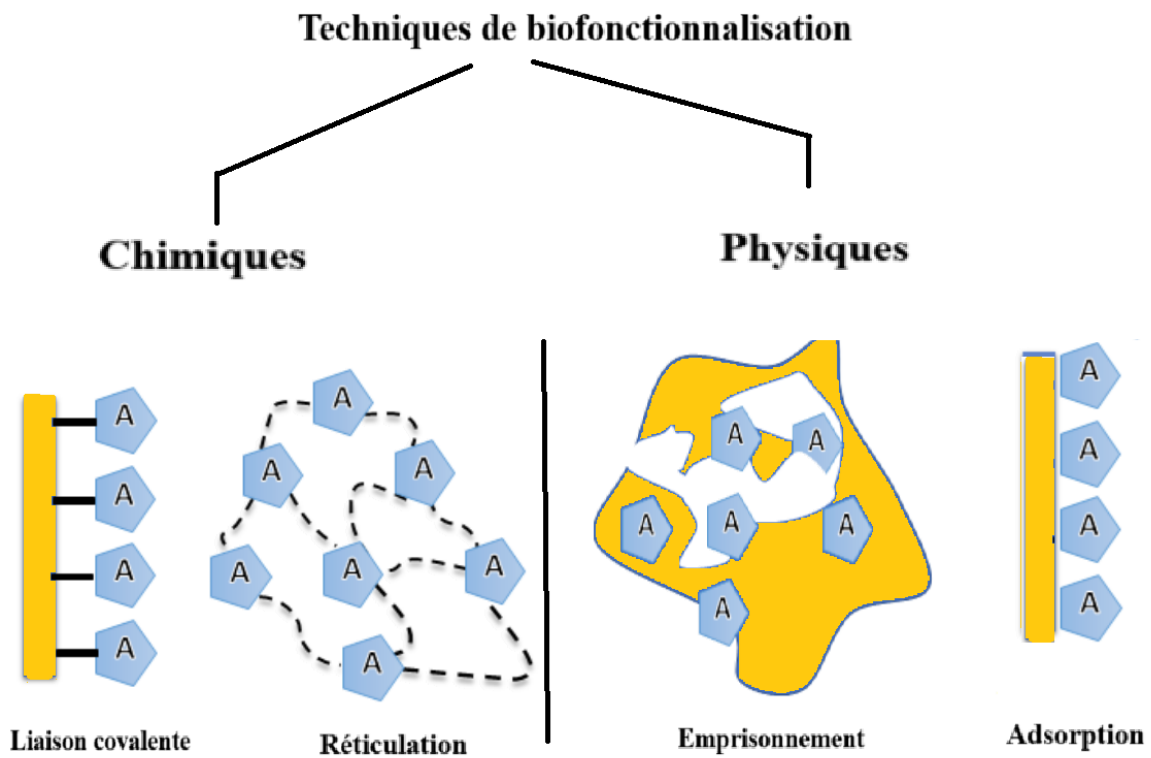


Figure 8 : Les différentes techniques de biofonctionnalisation des biocapteur

5 Les caractéristiques de performance d'un biocapteur

La performance d'un biocapteur dépend essentiellement du choix du transducteur, du biorécepteur et de la technique d'immobilisation pertinente pour les relier. Pour l'évaluation de cette performance plusieurs caractéristiques sont prises en considération[91] :

- **La sélectivité :** C'est l'aptitude d'un biocapteur à détecter l'analyte cible parmi plusieurs autre molécules.[91]
- **La sensibilité :** C'est la capacité d'un biocapteur à détecter différentes concentrations de l'analyte cible même à faible concentration.[91]
- **Plage de détection :** Correspond à l'intervalle des concentrations qu'un biocapteur peut détecter.

- **Temps de réponse :** C'est le temps requis pour qu'un biocapteur donne une réponse/signal mesurable.
- **Reproductibilité :** C'est la capacité d'un biocapteur de générer les mêmes résultats ou des résultats proches dans les conditions identiques.[91]
- **Limite de détection (LOD) :** Correspond à concentration la plus faible mesurable avec fiabilité par le biocapteur.[41]
- **Linéarité :** Correspond à la capacité déterminer une relation proportionnelle entre le signal produit par le biocapteur et le concentrations de l'analyte sur une plage bien déterminé.

D'autres caractéristiques sont à prendre en considération pour élaborer un biocapteur performant telle que la stabilité, la durée de vie, la portabilité et le coût de production.[91]

6 Conclusion

Les biocapteurs sont des outils de diagnostic et de surveillance très puissants, où leur capacité à fournir des mesures à temps réel, précises et spécifiques est particulièrement précieuse[64]. Ces dispositifs sont des outils révolutionnaires transforment les approches traditionnelles de diagnostic, contribuant ainsi à une amélioration de la qualité de vie sur tous les domaines médicales ; environnementales et industrielles,[38, 46] ce chapitre n'était qu'une introduction pour comprendre la définition d'un biocapteur, sa composition et les types de biocapteur, plusieurs autres points peuvent être étudiés pour mieux comprendre le fonctionnement de ces outils fascinants.

7 Références

- [1] F. Scheller and F. Schubert, *Biosensors*: Elsevier, 1991.
- [2] C. R. Lowe, "Biosensors," *Trends in biotechnology*, vol. 2, pp. 59-65, 1984.
- [3] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, and G. S. Wilson, "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification," *Analytical Letters*, vol. 34, pp. 635-659, 2001.
- [4] J. Ali, J. Najeeb, M. A. Ali, M. F. Aslam, and A. Raza, "Biosensors: their fundamentals, designs, types and most recent impactful applications: a review," *J. Biosens. Bioelectron*, vol. 8, pp. 1-9, 2017.
- [5] J. P. Chambers, B. P. Arulanandam, L. L. Matta, A. Weis, and J. J. Valdes, "Biosensor recognition elements," *Current issues in molecular biology*, vol. 10, pp. 1-12, 2008.
- [6] S. Zhong, L. Chen, X. Shi, G. Chen, D. Sun, and L. Zhang, "Recent advances in electrochemical aptasensors for detecting cardiac biomarkers: A review," *Microchemical Journal*, p. 109063, 2023.
- [7] T. Anjum, N. Hussain, M. Bilal, and H. M. Iqbal, "Enzymatic biosensors," in *Biocatalyst immobilization*, ed: Elsevier, 2023, pp. 341-363.
- [8] M. Delvaux and S. Demoustier-Champagne, "Immobilisation of glucose oxidase within metallic nanotubes arrays for application to enzyme biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 18, pp. 943-951, 2003.
- [9] E. Ghedir, A. Baraket, S. Kouchar, S. Rabai, M. Benounis, A. Alcacer, *et al.*, "Electrochemical Immunosensor for NT-proBNP Detection in Artificial Human Saliva: Heart Failure Biomedical Application," in *Proceedings*, 2018, p. 1085.
- [10] E. Gizeli and C. R. Lowe, "Immunosensors," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 7, pp. 66-71, 1996.
- [11] L. Bousse, "Whole cell biosensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 34, pp. 270-275, 1996.
- [12] C. A. Sanders, M. Rodriguez Jr, and E. Greenbaum, "Stand-off tissue-based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, pp. 439-446, 2001.
- [13] A. Bange, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Microfluidic immunosensor systems," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 2488-2503, 2005.
- [14] F. Ricci, G. Adornetto, and G. Palleschi, "A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors," *Electrochimica Acta*, vol. 84, pp. 74-83, 2012.
- [15] P. Mehrotra, "Biosensors and their applications—A review," *Journal of oral biology and craniofacial research*, vol. 6, pp. 153-159, 2016.
- [16] Y. Saylan, Ö. Erdem, F. Inci, and A. Denizli, "Advances in biomimetic systems for molecular recognition and biosensing," *Biomimetics*, vol. 5, p. 20, 2020.
- [17] K. Ramanathan and B. Danielsson, "Principles and applications of thermal biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, pp. 417-423, 2001.
- [18] P. Damborský, J. Švitel, and J. Katrlík, "Optical biosensors," *Essays in biochemistry*, vol. 60, pp. 91-100, 2016.
- [19] F. S. Ligler and C. R. Taitt, *Optical biosensors: present & future*: Gulf Professional Publishing, 2002.
- [20] R. L. Rich and D. G. Myszka, "Why you should be using more SPR biosensor technology," *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 1, pp. 301-308, 2004.
- [21] P. Singh, "SPR biosensors: historical perspectives and current challenges," *Sensors and actuators B: Chemical*, vol. 229, pp. 110-130, 2016.

- [22] M. Strianese, M. Staiano, G. Ruggiero, T. Labella, C. Pellecchia, and S. D'Auria, "Fluorescence-based biosensors," *Spectroscopic methods of analysis: methods and protocols*, pp. 193-216, 2012.
- [23] A. Roda, M. Mirasoli, E. Michelini, M. Di Fusco, M. Zangheri, L. Cevenini, *et al.*, "Progress in chemical luminescence-based biosensors: A critical review," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 76, pp. 164-179, 2016.
- [24] W. P. Hall, S. N. Ngatia, and R. P. Van Duyne, "LSPR biosensor signal enhancement using nanoparticle- antibody conjugates," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 115, pp. 1410-1414, 2011.
- [25] S. P. Mohanty and E. Kougiannos, "Biosensors: A tutorial review," *IEEE Potentials*, vol. 25, pp. 35-40, 2006.
- [26] T. Pauporté and D. Lincot, *Microbalance à cristal de quartz*: Ed. Techniques Ingénieur, 2006.
- [27] V. M. Mecea, "From quartz crystal microbalance to fundamental principles of mass measurements," *Analytical letters*, vol. 38, pp. 753-767, 2005.
- [28] R. L. Bunde, E. J. Jarvi, and J. J. Rosentreter, "Piezoelectric quartz crystal biosensors," *Talanta*, vol. 46, pp. 1223-1236, 1998.
- [29] H. J. Lim, T. Saha, B. T. Tey, W. S. Tan, and C. W. Ooi, "Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 168, p. 112513, 2020.
- [30] K. Länge, B. E. Rapp, and M. Rapp, "Surface acoustic wave biosensors: a review," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 391, pp. 1509-1519, 2008.
- [31] I. Voiculescu and A. N. Nordin, "Acoustic wave based MEMS devices for biosensing applications," *Biosensors and bioelectronics*, vol. 33, pp. 1-9, 2012.
- [32] J. Zhang, X. Zhang, X. Wei, Y. Xue, H. Wan, and P. Wang, "Recent advances in acoustic wave biosensors for the detection of disease-related biomarkers: A review," *Analytica chimica acta*, vol. 1164, p. 338321, 2021.
- [33] S. K. Vashist, "A review of microcantilevers for sensing applications," *J. of Nanotechnology*, vol. 3, pp. 1-18, 2007.
- [34] K. M. Goeders, J. S. Colton, and L. A. Bottomley, "Microcantilevers: sensing chemical interactions via mechanical motion," *Chemical reviews*, vol. 108, pp. 522-542, 2008.
- [35] T. Thundat, P. Oden, and R. Warmack, "Microcantilever sensors," *Microscale Thermophysical Engineering*, vol. 1, pp. 185-199, 1997.
- [36] K. M. Hansen and T. Thundat, "Microcantilever biosensors," *Methods*, vol. 37, pp. 57-64, 2005.
- [37] A. W. McFarland and J. S. Colton, "Role of material microstructure in plate stiffness with relevance to microcantilever sensors," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 15, p. 1060, 2005.
- [38] N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Electrochemical biosensors," *Chemical Society Reviews*, vol. 39, pp. 1747-1763, 2010.
- [39] M. Pohanka and P. Skládal, "Electrochemical biosensors--principles and applications," *Journal of applied biomedicine*, vol. 6, 2008.
- [40] S. Borgmann, A. Schulte, S. Neugebauer, and W. Schuhmann, "Amperometric biosensors," *Advances in electrochemical science and engineering: Bioelectrochemistry*, vol. 13, pp. 1-83, 2011.
- [41] E. B. Bahadır and M. K. Sezgintürk, "A review on impedimetric biosensors," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, vol. 44, pp. 248-262, 2016.
- [42] R. N. Goyal, V. K. Gupta, and S. Chatterjee, "Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 149, pp. 252-258, 2010.
- [43] S. Dzyadevych and N. Jaffrezic-Renault, "Conductometric biosensors," in *Biological Identification*, ed: Elsevier, 2014, pp. 153-193.
- [44] R. Koncki, "Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis," *Analytica chimica acta*, vol. 599, pp. 7-15, 2007.

- [45] H. Karimi-Maleh, Y. Orooji, F. Karimi, M. Alizadeh, M. Baghayeri, J. Rouhi, *et al.*, "A critical review on the use of potentiometric based biosensors for biomarkers detection," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 184, p. 113252, 2021.
- [46] J. E. Frew and H. A. O. Hill, "Electrochemical biosensors," *Analytical chemistry*, vol. 59, pp. 933A-944A, 1987.
- [47] G. Davis, "Electrochemical techniques for the development of amperometric biosensors," *Biosensors*, vol. 1, pp. 161-178, 1985.
- [48] J. Wang, "Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 19, pp. 47-53, 1999.
- [49] A. Heller, "Amperometric biosensors," *Current opinion in biotechnology*, vol. 7, pp. 50-54, 1996.
- [50] A. M. Baracu and L. A. D. Gugoasa, "Recent advances in microfabrication, design and applications of amperometric sensors and biosensors," *Journal of The Electrochemical Society*, vol. 168, p. 037503, 2021.
- [51] J. Davis, D. H. Vaughan, and M. F. Cardosi, "Elements of biosensor construction," *Enzyme and microbial technology*, vol. 17, pp. 1030-1035, 1995.
- [52] K. Habermüller, M. Mosbach, and W. Schuhmann, "Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors," *Fresenius' journal of analytical chemistry*, vol. 366, pp. 560-568, 2000.
- [53] V. Polohova and M. Šnejdárková, "Electron transfer in amperometric biosensors," *Chemické listy*, vol. 102, 2008.
- [54] J. Janata and J. Janata, "Amperometric sensors," *Principles of Chemical Sensors*, pp. 201-239, 2009.
- [55] C. G. Zoski, *Handbook of electrochemistry*: Elsevier, 2006.
- [56] L. C. Clark Jr, "[41] The hydrogen peroxide sensing platinum anode as an analytical enzyme electrode," in *Methods in enzymology*. vol. 56, ed: Elsevier, 1979, pp. 448-479.
- [57] L. C. Clark Jr and C. Lyons, "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New York Academy of sciences*, vol. 102, pp. 29-45, 1962.
- [58] M. S. Belluzo, M. É. Ribone, and C. M. Lagier, "Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics," *Sensors*, vol. 8, pp. 1366-1399, 2008.
- [59] B. A. Gregg and A. Heller, "Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications," *Analytical Chemistry*, vol. 62, pp. 258-263, 1990.
- [60] A. Pisoschi, "Potentiometric biosensors: concept and analytical applications-an editorial," *Biochem Anal Biochem*, vol. 5, pp. 19-20, 2016.
- [61] J. Janata and M. Josowicz, "Nernstian and non-nernstian potentiometry," *Solid State Ionics*, vol. 94, pp. 209-215, 1997.
- [62] S. Majeed, S. T. R. Naqvi, M. N. ul Haq, and M. N. Ashiq, "Electroanalytical techniques in biosciences: conductometry, coulometry, voltammetry, and electrochemical sensors," in *Analytical techniques in biosciences*, ed: Elsevier, 2022, pp. 157-178.
- [63] F. R. Simões and M. G. Xavier, "Electrochemical sensors," *Nanoscience and its Applications*, vol. 1, pp. 155-178, 2017.
- [64] D. W. Kimmel, G. LeBlanc, M. E. Meschievitz, and D. E. Cliffel, "Electrochemical sensors and biosensors," *Analytical chemistry*, vol. 84, pp. 685-707, 2012.
- [65] H. Alawieh, T. El Chemaly, S. Alam, and M. Khraiche, "Towards point-of-care heart failure diagnostic platforms: BNP and NT-proBNP biosensors," *Sensors*, vol. 19, p. 5003, 2019.
- [66] A. Koyun, E. Ahlatcolu, Y. Koca, and S. Kara, "Biosensors and their principles," *A roadmap of biomedical engineers and milestones*, vol. 5, pp. 42-117, 2012.
- [67] T. Amina, "Élaboration de nouveaux capteurs chimiques et biocapteurs sélectifs pour la détection du Zinc et de l'urée dans les milieux réels," UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA, 2017.
- [68] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, and E. Reimhult, "Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures," *Sensors*, vol. 8, pp. 1400-1458, 2008.

- [69] M. I. Prodromidis, "Impedimetric immunosensors—A review," *Electrochimica Acta*, vol. 55, pp. 4227-4233, 2010.
- [70] J.-G. Guan, Y.-Q. Miao, and Q.-J. Zhang, "Impedimetric biosensors," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 97, pp. 219-226, 2004.
- [71] F. Brochard-Wyart, C. D. Dandine, S. Griveau, R. Portier, F. Volatron, and A. Sevin, *Chimie générale*: Dunod, 2016.
- [72] U. Gupta, V. Gupta, R. K. Arun, and N. Chanda, "Recent advances in enzymatic biosensors for point-of-care detection of biomolecules," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 119, pp. 3393-3407, 2022.
- [73] O. Smutok and E. Katz, "Biosensors: electrochemical devices—general concepts and performance," *Biosensors*, vol. 13, p. 44, 2022.
- [74] A.-M. N. Hendji, "Etude de la fonctionnalisation de différents substrats (Si, Pt, C) en vue de la réalisation de biocapteurs électrochimiques," Ecully, Ecole centrale de Lyon, 1993.
- [75] D. Pijanowska and W. Torbicz, "Functionalisation of chemically sensitive surfaces for biosensors and microreactors fabrication," *IRBM*, vol. 29, pp. 128-132, 2008.
- [76] S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andres, P. Allongue, J.-N. Chazalviel, A. Gouget-Laemmel, *et al.*, "Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces," *Langmuir*, vol. 26, pp. 809-814, 2010.
- [77] S. Tembe, B. Kubal, M. Karve, and S. d'Souza, "Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus companulatus*: Application in construction of electrochemical biosensor for dopamine," *Analytica chimica acta*, vol. 612, pp. 212-217, 2008.
- [78] A. Sassolas, L. J. Blum, and B. D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnology advances*, vol. 30, pp. 489-511, 2012.
- [79] M. M. Choi, "Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers," *Microchimica Acta*, vol. 148, pp. 107-132, 2004.
- [80] G. Decher and J. D. Hong, "Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces," in *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, 1991, pp. 321-327.
- [81] M. Albareda-Sirvent, A. Merkoci, and S. Alegret, "Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 69, pp. 153-163, 2000.
- [82] R. A. Sheldon and S. van Pelt, "Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how," *Chemical society reviews*, vol. 42, pp. 6223-6235, 2013.
- [83] U. Hanefeld, L. Gardossi, and E. Magner, "Understanding enzyme immobilisation," *Chemical Society Reviews*, vol. 38, pp. 453-468, 2009.
- [84] A. S. Santos, A. C. Pereira, N. Durán, and L. T. Kubota, "Amperometric biosensor for ethanol based on co-immobilization of alcohol dehydrogenase and Meldola's Blue on multi-wall carbon nanotube," *Electrochimica acta*, vol. 52, pp. 215-220, 2006.
- [85] N. A. Mohidem, M. Mohamad, M. U. Rashid, M. N. Norizan, F. Hamzah, and H. b. Mat, "Recent advances in enzyme immobilisation strategies: An overview of techniques and composite carriers," *Journal of Composites Science*, vol. 7, p. 488, 2023.
- [86] T. Haider and Q. Husain, "Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β galactosidase: its stability and applications in the hydrolysis of lactose," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 41, pp. 72-80, 2007.
- [87] H. N. Choi, M. A. Kim, and W.-Y. Lee, "Amperometric glucose biosensor based on sol-gel-derived metal oxide/Nafion composite films," *Analytica Chimica Acta*, vol. 537, pp. 179-187, 2005.
- [88] I. Gill and A. Ballesteros, "Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals," *Trends in biotechnology*, vol. 18, pp. 282-296, 2000.
- [89] T. Bhardwaj, "A review on immobilization techniques of biosensors," *Int. J. Eng. Res*, vol. 3, pp. 294-298, 2014.

- [90] S. Saxena and S. Saxena, "Immobilisation and biosensors," *Applied Microbiology*, pp. 179-190, 2015.
- [91] M. A. Morales and J. M. Halpern, "Guide to selecting a biorecognition element for biosensors," *Bioconjugate chemistry*, vol. 29, pp. 3231-3239, 2018.

Chapitre 02 :
Insuffisance cardiaque et biomarqueurs :
de la physiopathologie aux marqueurs clés
NT-proBNP et Cortisol

Chapitre 02 : Insuffisance cardiaque et biomarqueurs : de la physiopathologie aux marqueurs clés NT-proBNP et Cortisol

1 Introduction

En 2019, 17,9 millions de personnes, soit 32 % des décès, étaient dus à une maladie cardiovasculaire (MCV). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les MCV représentent la principale cause de mortalité, en particulier dans les pays à revenu faible ou intermédiaire[1-3].

Les MCVs présentent l'ensemble des troubles qui affectent le fonctionnement physiologique normal de l'appareil cardiovasculaire[4, 5]. Ces maladies englobent quatre grands groupes. En tête de la liste on trouve, les cardiopathies ischémiques[6], les artériopathies périphériques[7], et les maladies cérébrovasculaires [8] touchant les vaisseaux sanguins qui alimentent le myocarde, les vaisseaux sanguins qui alimentent les bras et les jambes, et les vaisseaux sanguins qui alimentent le cerveau, respectivement [5] ; ensuite les malformations cardiaques congénitales[9] ; les cardiopathies rhumatismales causées par une infection bactérienne ; les thromboses veineuses profondes et les embolies pulmonaires[4, 10]. Toutes ces maladies MCVs peuvent conduire à la même voie commune : l'insuffisance cardiaque. Cette réalité impose une question essentielle, qu'est-ce que l'insuffisance cardiaque et comment peut-on la diagnostiquer ?

2 L'insuffisance cardiaque

L'inaptitude du cœur à délivrer suffisamment de sang pour assurer les besoins physiologiques de l'organisme se manifeste par l'évolution d'une pathologie chronique : L'insuffisance cardiaque (IC). Cette défaillance est provoquée principalement par des maladies cardiovasculaires telles que les maladies coronariennes, l'hypertension artérielle (HTA), cardiomyopathies, ETC., et des conditions sous-jacentes[11, 12]. Le bon fonctionnement des organes nécessite une irrigation sanguine oxygénée, riche en éléments nutritifs assurée par le cœur. Une diminution de pompage sanguin compromet ce fonctionnement, on parle donc d'une insuffisance cardiaque.[5, 13]

Lorsque le cœur perd une partie de sa capacité de contraction, en premier temps, il s'adapte pour compenser cette diminution en augmentant sa fréquence cardiaque ; puis il augmente le volume des cavités cardiaques. Finalement, cet ajustement ne fait qu'aggraver l'insuffisance cardiaque[4, 5]. Cette altération de la fonction cardiaque entraîne au fur et à mesure une série de symptômes : une fatigue persistante accompagnée d'un essoufflement dus à l'incapacité du cœur de pomper le sang oxygéné, et témoignant de l'accumulation de liquide dans les poumons, des palpitations et des douleurs thoraciques indiquant une surcharge du cœur, une apparition de gonflements et d'œdèmes au niveau des pieds, des jambes ou l'abdomen causés par la rétention hydrique dévoilant que la fonction des reins était touchée par l'insuffisance cardiaque[14, 15]. Une charge additionnelle exercée sur le cœur défaillant produite par ces symptômes, qui doit s'ajuster à ces changements physiopathologiques accrus. Par conséquent, la fonction cardiaque se détériore davantage, provoquant une amplification des symptômes et une aggravation de l'insuffisance cardiaque elle-même[16]. Ce processus d'aggravation autonome montre un diallèle, où chaque déséquilibre contribue à l'évolution de la maladie et à la détérioration de la qualité de vie du patient[15]. Aujourd'hui, en raison de sa prévalence croissante, l'IC représente un enjeu majeur en santé publique, notamment avec la progression des facteurs de risque[3]. Pour une prise en charge adaptée en vue d'une amélioration de la qualité de vie des patients, un diagnostic précoce est nécessaire.

Le diagnostic de l'IC repose sur une approche pluridisciplinaire incluant des examens physiques, l'électrocardiogramme (ECG), l'imagerie cardiaque (Echocardiographie, Radiographie thoraciques, ETC.), et des analyses biologiques (dosages des biomarqueurs cardiaques et autres)[17, 18]. Dans ce chapitre, nous nous concentrons particulièrement sur le diagnostic basé sur le dosage des biomarqueurs cardiaques notamment les peptides natriurétique NT-proBNP et Cortisol.[19-22].

3 Les biomarqueurs cardiaques

Un biomarqueur s'agit d'une substance ou d'un paramètre quantifiable qui permet de confirmer un état de santé normal ou pathologique. Les biomarqueurs sont des indicateurs biologiques présents dans les liquides biologiques (sang, plasma, urine, salive...ETC.), les tissus et d'autres fluides corporels, permettant de révéler un processus physiologique pathologique ou normal[23]. Ces indicateurs peuvent être utilisés dans des contextes différents en fonction de

leur utilité. On peut distinguer des biomarqueurs de diagnostics qui permettent d'identifier une maladie, des biomarqueurs pronostiques et prédictifs, qui évaluent les probabilités de progression d'une maladie et les possibilités de réponse à un traitement ou une intervention thérapeutique, et des biomarqueurs de suivi et de surveillance qui fournissent un suivi de l'évolution d'une maladie et/ou l'efficacité d'un traitement.[23, 24].

Le choix d'un biomarqueur doit répondre à une multitude de critères pour pouvoir l'utiliser comme un indicateur [25, 26] :

- **La spécificité** : un biomarqueur doit être spécifique et propre à une maladie ou un état physiologique constant, avec un minimum d'interférence. C'est-à-dire qu'il doit être lié directement avec le processus pathologique étudié.
- **La sensibilité** : un biomarqueur doit être capable de révéler ou de détecter un maximum de cas positifs (pathologie ciblée), même dans des stades précoces et à un dosage faible.
- **La stabilité** : un bon biomarqueur doit avoir une demi-vie biologique longue, c'est-à-dire qu'il ne doit pas être éliminé ou se dégrader rapidement pour garantir des résultats fiables.
- **L'accessibilité** : un bon biomarqueur doit être facile à extraire, présent essentiellement dans les fluides biologiques tels que le sang, les urines, la salive.[25, 26].

Dans le cas des MCVs plusieurs molécules et substances ont été étudiées en tant que biomarqueurs cardiaques. Ces derniers ont été classés selon leur spécificité [27-29] (Tableau 1). La liste des biomarqueurs est vaste, le tableau ne représente qu'une sélection des biomarqueurs les plus étudiés. En raison de la complexité physiopathologique des MCVs aucun biomarqueur unique ne peut être considéré comme un indicateur fiable et final. Pour améliorer le diagnostic et l'évaluation du risque d'une maladie cardiovasculaire, une approche multi-marqueurs (combinaison de plusieurs biomarqueurs) est essentielle.

Après avoir compris le concept des biomarqueurs et leur importance. Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous concentrer sur deux marqueurs spécifiques qui ont été au cœur de cette étude : le N-terminal prohormone of Brain Natriuretic peptide (NT-pro BNP) et le cortisol. Cette section examinera en détail leur physiologie en mettant en évidence leurs mécanismes de

réponse, leur relation avec les maladies cardiovasculaires, en particulier l'insuffisance cardiaque, ainsi que les diverses méthodes de détection utilisées pour leur analyse, spécifiquement les biocapteurs électrochimiques.

Tableau 1 : Classification des biomarqueurs cardiaques.

La maladie cardiaque	Le biomarqueur
Biomarqueurs des lésions myocardiques	Troponine cardiaque (cTn) [27]
	Myoglobine [28]
	Créatine Kinase-MB (CK-MB)[29, 30]
Biomarqueurs de stress myocardique et hémodynamique	Peptides natriurétiques (ANP, BNP, NT-pro BNP) [31, 32]
Biomarqueurs inflammatoires, pronostiques et neurohormonale	Protéine-C-réactive (CRP) [33]
	Cortisol[34]
	Interleukines [35]

4 La prohormone N-terminale du peptide natriurétique cérébral (NT-pro BNP)

4.1 Les peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques (NP) sont des hormones peptidiques sécrétées essentiellement par le cœur suite à des stimulations mécaniques, notamment l'étirement des parois myocardiques, ainsi que par des processus neuro-hormonaux et inflammatoires. Ils regroupent plusieurs types. Les trois principaux groupes sont :[30, 32, 36]

- **Les peptides natriurétiques atriaux (ANP - Atrial Natriuretic Peptide)** : Synthétisés et libérés par les cardiomyocytes atriaux en réponse à une augmentation du volume sanguin et de la pression atriale.[37]

- **Les peptides natriurétiques de type B (BNP - Brain Natriuretic Peptide)** : Bien qu'ils aient été isolés pour la première fois dans le cerveau de porc[38] , ils sont principalement produits par les ventricules cardiaques, en particulier en réponse à une surcharge de pression ou de volume.[39]
- **Les peptides natriurétiques de type C (CNP – C-type Natriuretic Peptide)**
Présente principalement dans le système nerveux central, ainsi que dans les cellules endothéliales vasculaires et les reins. Leur fonction est moins bien définie par rapport à l'ANP et au BNP.[39, 40]

Les trois peptides partagent une structure moléculaire similaire, une séquences d'acides aminés (AA), 28AAs pour les ANP , 32 AAs pour les BNP et 22 AAs pour les CNP, Dont 17 AAs forment une boucle par le biais d'une liaisons disulfurique (Ponts cystine). (Figure 9). Les crochets montrent l'emplacement des ponts cystine présents dans chaque peptide (Forme une boucle de 17 AAs), Les acides aminés identiques sont en jaune ,[39] cependant, ces peptides sont codés par des gènes différents localisé sur le même chromosome 1.

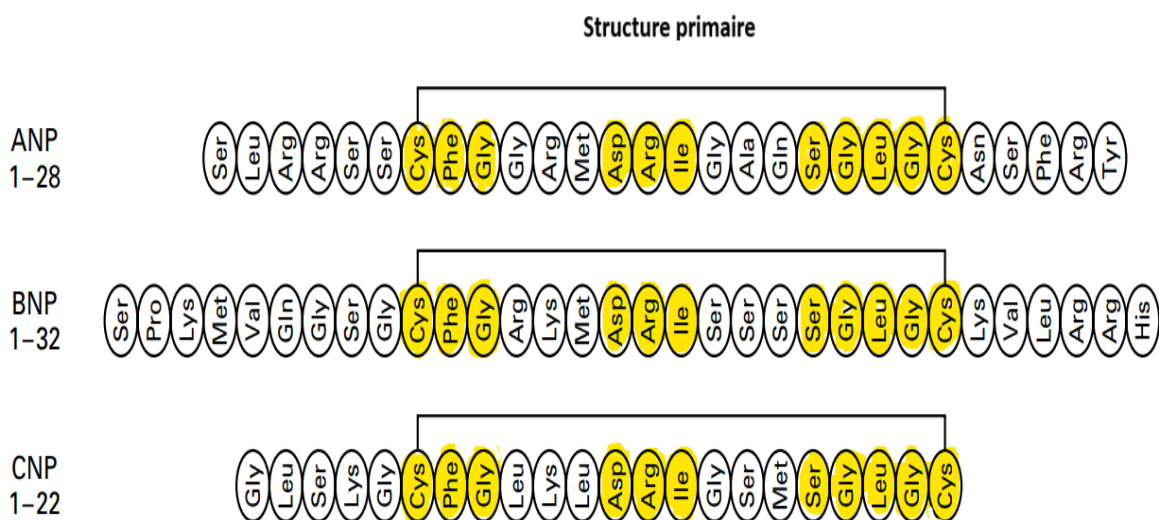


Figure 9: Structure primaire des trois peptides natriurétiques (ANP-28AAs, BNP-32AAs, CNP-22AAs.)

Les peptides natriurétiques contrôlent des rôles physiologique et physiopathologiques spécifiques en stimulant des récepteurs transmembranaires présentés sur les cellules cibles

appelés neuropeptides récepteurs (NPR). Trois groupes de NPR sont identifiés aujourd'hui, NPR-A et NPR-B sont liés à de nombreux effets cardiovasculaires et rénaux, l'activation de ces deux récepteurs par les NPs stimule la voie du GMP cyclique (cGMP), en convertissant le guanosine triphosphate (GTP) en guanosine monophosphate cyclique (cGMP) déclenchent ainsi des cascades de signalisation aux effets variés, tandis que le NPR-C est plutôt lié au processus d'élimination et de clearance des peptides natriurétiques [36] :

- Ils favorisent la vasodilatation induisant la réduction de la pression artérielle.
- Ils réduisent la précharge et la postcharge cardiaque par l'augmentation de la diurèse et de la natriurèse.[36, 41]
- Ils jouent un rôle clé dans l'adaptation du cœur aux conditions hémodynamiques, limitent les changements structuraux anormaux et le remodelage cardiaque par un effet antifibrotique et antihypertrophique.
- Ils inhibent le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) régulant ainsi l'homéostasie hydrosodée et la vasoconstriction artérielle.
- Ils inhibent le système nerveux sympathique diminuant ainsi la rétention d'eau et la pression artérielle en situation de stress.[42] [43]

4.2 Biosynthèse et physiologie de NT-proBNP

NT-proBNP est un polypeptide inactif issu d'un clivage de prohormoneBNP par une protéase. Le stress mécanique et l'étirement myocardique génèrent une pression artérielle et /ou de volume, stimulant d'un côté, la production des NPs par les cardiomyocytes. L'étirement active des barorécepteurs qui activent à leur tour une cascade de signalisation intracellulaire, notamment la voie de signalisation MAP kinase (MPAK), la protéine kinase C (PKC) et augmente la concentration intracellulaire de calcium (Stimulation par voie directe) . Et de l'autre côté, la libération des neurohormones qui renforcent l'activation des voies de signalisation précédentes MPAK/PKC (Stimulation par voie autocrine /paracrine).[44, 45]

Les signaux d'activation de ces cascades déclenchent la transcription du gène NPPB (Natriuretic Peptide Precursor B-type gene) localisé sur le chromosome 1, il est composé de trois exons (la partie codante-traduite en protéine) et deux introns (La partie non codante-éliminée à la fin de la transcription d'ADN). [46, 47]. L'expression génique de l'activation de gène NPPB se manifeste par la transcription de gène en ARN_m(ARN Messenger) qui sera ensuite

traduit au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux en pré-précurseur protéique, le pré-prohormoneBNP, composé de 134 AAs. Ce dernier sera immédiatement scindé en deux pour éliminer le peptide signal de 26 AAs, produisant ainsi le prohormoneBNP (proBNP) de 108 AAs qui entre dans la voie de sécrétion cellulaire.[48]

La proBNP subit des modifications post-traductionnelles pour obtenir à la fin deux fragments peptidiques, le BNP (fragment actif de 32 AAs) et le NT-proBNP (fragment inactif de 108 AAs). Une O-glycosylation de plusieurs acides aminés serine (Ser) et thréonine (Thr) de la chaîne peptidique de proBNP se déroule dans l'appareil de Golgi. Le clivage de la proBNP est effectué en premier temps par les enzymes furine et corine, donnant deux fragments le premier le NT-proBNP composé de 76 AAs (AA 1-76),[45] ce dernier est une fraction inerte jouant uniquement le rôle d'un biomarqueur de l'IC ; le deuxième fragment est la fraction active, le BNP de 32 AAs (AA 77-108), régi plusieurs rôles physiologique et physiopathologiques (Voir le point 4.1 Ci-dessus).[48] (Figure 10). Les deux peptides BNP et NT-proBNP sont sécrétés dans le milieu extra-cellulaire à des concentrations équimolaires chez les sujets sains, cependant plusieurs travaux ont montré que les concentrations de NT-proBNP est significativement très élevées par rapport celles du BNP chez les personnes souffrant de l'insuffisance cardiaque. Cette différence de concentrations est due probablement à plusieurs processus :

- Une hyperglycosylation peut inhiber l'action de furine et corine (Clivage incomplet) .
- le processus d'élimination des PN par les récepteurs NPR-C, la formation complexe BNP/NPR-C déminue la concentration de BNP de la circulation et neutralise son effet.
- La protéolyse de BNP par des enzymes endopeptidase neutre telle que la néprilysine.
- L'élimination de NT-proBNP est assurée par plusieurs organes principalement par les reins grâce à sa taille modérée (voie rénale), ensuite par le foie (clairance hépatique), et d'autres organes qui dégradent le NT-proBNP par des protéases locales.[42]

Ces processus justifient la concentration élevée de NT-proBNP comparé à celle du BNP, même que les deux sont sécrétés en quantités égales par les cardiomyocytes, et expliquent la demi vie longue de NT-proBNP. Ce dernier présente une demi vie d'environ 120 min soit une durée significativement supérieure à celle de BNP, qui ne dépasse pas 20 min.[49, 50].

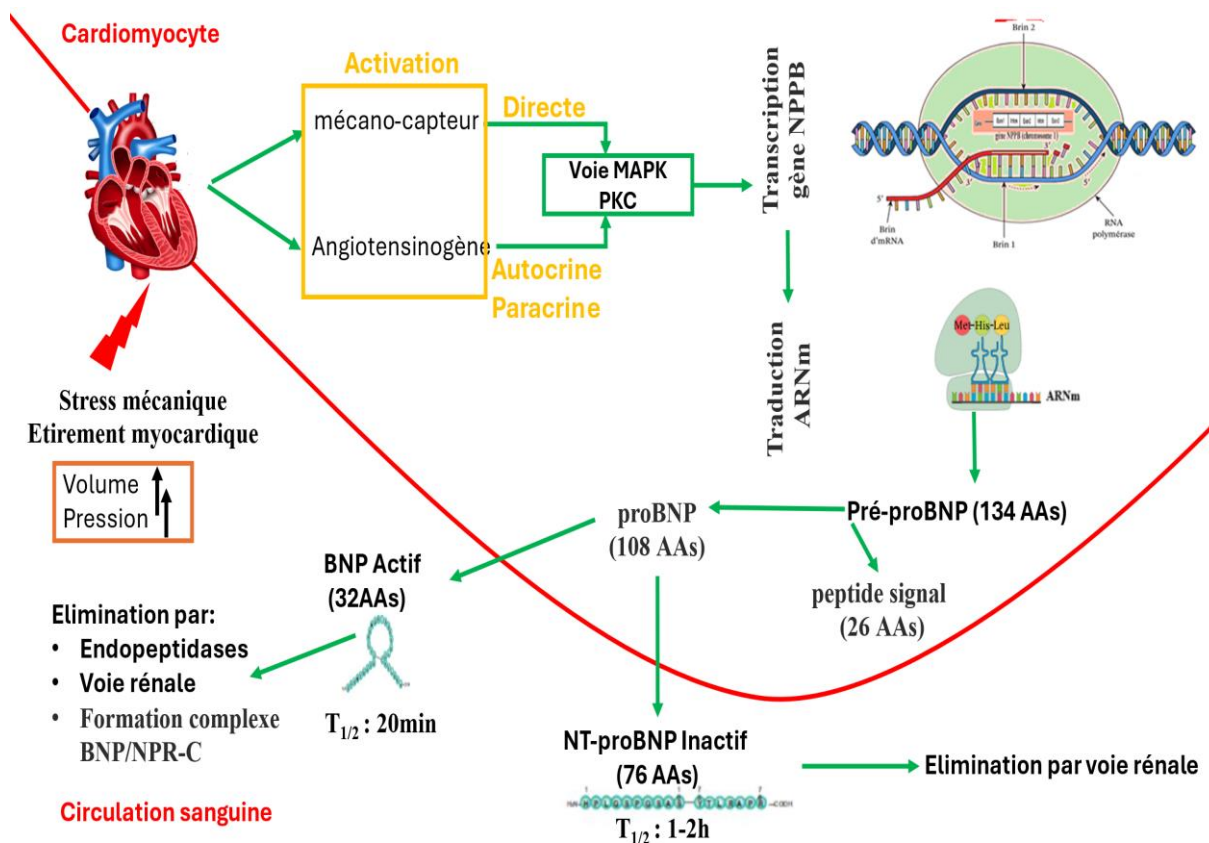


Figure 10 : Schéma illustrant la biosynthèse des peptides natriurétiques

4.3 Physiopathologie et dosage de NT-proBNP dans les liquides biologiques

Comme mentionné précédemment le NT proBNP est un fragment inactif qui ne présente aucun rôle physiologique dans l'organisme. Néanmoins sa structure caractérisée par une stabilité dans la circulation et sa demi-vie prolongée par rapport au BNP, lui confèrent le rôle d'un biomarqueur cardiaque fiable permettant le diagnostic précoce et la prédiction de l'évolution de l'IC.[31]

La concentration de NT-proBNP dans les liquides biologiques reflète fidèlement la sévérité de l'insuffisance cardiaque. Elle est associée directement à des risques accrus d'un événement cardiovasculaire majeur, notamment l'aggravation de la maladie et sa mortalité. En plus de son rôle dans le diagnostic et le suivi de l'IC. Le dosage de ce biomarqueur permet d'évaluer l'efficacité d'un traitement instauré. [49]Une diminution de concentration de NT-proBNP désigne une amélioration de la fonction cardiaque, indiquant ainsi l'efficacité d'un traitement,

et inversement les concentrations élevées de NT-proBNP, malgré la prise en charge médicale indiquent l'échec de traitement et orientent les cliniciens vers un ajustement de l'approche thérapeutiques pour anticiper les complications.[48]

Afin de garantir leur pertinence en pratique clinique, l'interprétation des concentrations de NT-ProBNP repose sur des valeurs seuils établies à la suite de plusieurs études cliniques réalisées auprès de populations diversifiées et à des contextes cliniques différentes en prenant en compte plus particulièrement l'âge des sujets car plusieurs études ont montré que le taux de NT-proBNP augmente physiologiquement avec le vieillissement en raison des altérations cardiaques subcliniques.[51, 52] En tenant en compte la voie d'élimination de NT-proBNP qui principalement la voie rénale, une insuffisance rénale chronique peut fausser les résultats en augmentant significativement le taux de NT-proBNP en raison d'une clairance rénale réduite, donc une prudence particulière dans l'interprétation est nécessaire[53].

Le tableau suivants (Tableau 2) présente les valeurs seuils de NT-proBNP en fonction de contexte clinique (IC aigue) et de type de liquide biologique dans lequel il est mesuré notamment, le sang, le plasma et la salive. Une valeur de 300pg/mL est retenus chez tout patient suspecté d'IC aigue selon les recommandations de la société européenne de cardiologie (ESC). Des seuils ajustés selon l'âge ont été recommandé pour confirmer une insuffisance cardiaque, tandis qu'une concentration inférieure à 300pg/mL permet d'exclure une IC aigue [22].L'interprétation des résultats de dosage de NT-proBNP nécessite une fine compréhension des facteurs influençant ses concentrations. Appliquer un seul seuil est une approche inadaptée face à la fluctuation des populations et des contextes cliniques, l'âge, le sexe, l'obésité, la fonction rénale et la fibrillation auriculaire modifient considérablement les taux de NT-proBNP et imposent par conséquent l'utilisation de seuils ajustés.[54]

A mesure que le dosage de NT-proBNP se développe au-delà du simple diagnostic de l'insuffisance cardiaque vers la prédiction globale du risque cardiovasculaire, des recherches complémentaires sont nécessaires pour assurer une interprétation appropriée et améliorer la prise en charge des patients.

Tableau 2 : Valeurs seuils de NT-proBNP en cas d'insuffisance cardiaque aigue

Liquides biologiques	Contexte clinique	Valeur seuil du NT-proBNP	Référence
Plasma	Insuffisance cardiaque aigue (tout âge)	> 300 pg/ML	[55]
	Insuffisance cardiaque aigue <50 ans	> 450 pg/ML	[56]
	Insuffisance cardiaque aigue 50-75ans	> 900pg/ML	
	Insuffisance cardiaque aigue > 75 ans	> 1800 pg/ML	
Sang total	Seuils équivalents au plasma après une calibration,		[44, 55]
Salive	Les seuils disponibles ne sont pas encore standardisés /Des recherches en cours de validation		[57, 58]

5 Cortisol

5.1 Cortisol : structure et caractéristiques biochimiques

Le cortisol : dérivée du cholestérol, une du principale hormones stéroïdiennes de la classe glucocorticoïde sécrétée par la zone fasciculée du cortex surrénal.[59] Il possède une structure moléculaire tétracycliques (noyau stérane) avec 21 carbones et une masse moléculaire de 362,46 g/mol (C₂₁H₃₀O₅) ; trois cycles (A,B,C) de 6 carbones et un cycle (D) de 5 carbones , caractérisés par la présence des groupements dans des position bien précise [60]:

- En position 11 β du cycle C, en position 17 α de cycle D et en position 21 sur la chaîne latérale du cycle D, on repère des groupements hydroxyles (-OH).
- En position 3 du cycle A et en position 20 sur la chaîne latérale du cycle D, on distingue la présence du groupement cétone (=O).
- Entre le C4 et C5 du cycle A, on trouve une double liaison.[61]

Cette configuration moléculaire précise confère au cortisol des propriétés lipophiles lui permettant de traverser les membranes cellulaires facilement (Figure 11), et une complémentarité spécifique a des récepteurs nucléaires spécifiques.

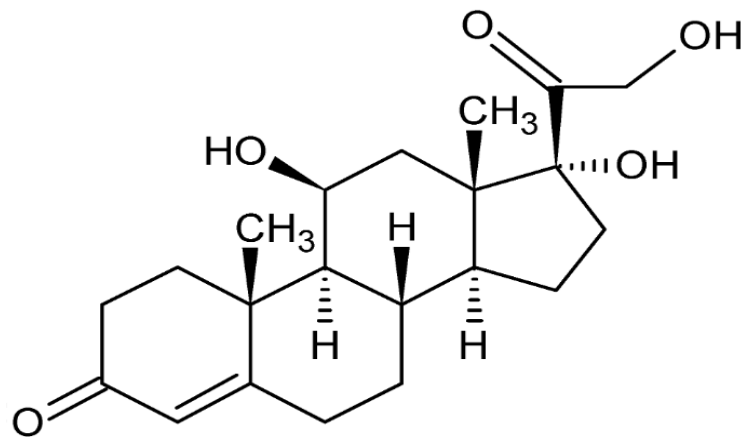


Figure 11 : Structure moléculaire du Cortisol

5.2 Biosynthèse et physiologie du Cortisol

La production du cortisol est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien (HHS), une organisation structurée en quatre niveaux [62]:

1. L'hypothalamus secrète des corticolibérine(corticotropin releasing hormone CRH) suite a une stimulation par un stress physique ou psychologique (Contrôle positif).
2. Le CRH a son tour stimule l'hypophyse antérieure a sécréter l'hormone corticotrope (AdrenoCorticoTropic Hormone ACTH).[63]
3. L'ACTH provoque la sécrétion du cortisol au niveau du pole supérieur des reins par les cellules de la zone fasciculée de la zone corticale, de la glande surrénale. Sous l'action de l'ACTH en déclenchant une chaine de réactions enzymatiques (enzymes stéroïdogéniques) qui transformes le cholestérol LDL , précurseur commun des hormones corticosurrénales, en cortisol.[64]
4. Le cortisol produit exerce un rétrocontrôle négatif pour maintenir l'homéostasie de l'axe HHS en inhibant la production du CRH et ACTH par l'hypothalamus et l'hypophyse respectivement.(Figure 12).[65]

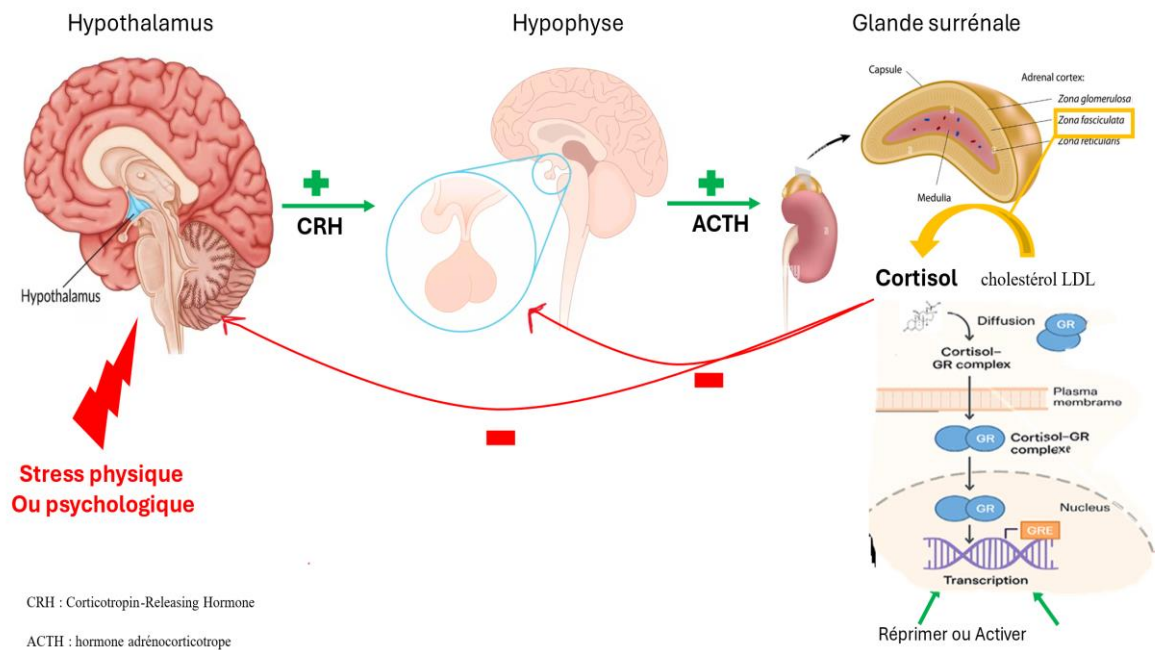


Figure 12 : Schéma représentant l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (HHS) et l'effet du complexe cortisol-GR sur la transcription. CRH : Corticotropin-Releasing Hormone, ACTH : hormone adrénocorticotrope.

On trouve le cortisol dans la circulation sanguine sous forme de deux fractions :

- Une fraction liée à des protéines dites transcortine (corticostéroïde binding globulin CBG) et à l'albumine formant ainsi une macromolécule inactive biologiquement, incapable de diffuser dans les cellules cibles et n'étant pas dégradée. Environ 80%-90% du cortisol est stocké sous cette forme.
- La deuxième fraction de cortisol présente environ 5 à 10%. C'est la partie libre du cortisol, active biologiquement avec une demi-vie de 60 à 90 minutes. [66]

L'action du cortisol s'exerce suite à la formation d'un complexe Cortisol-Récepteur Glucocorticoïdes (GR). Après la diffusion du complexe formé dans la cellule cible, il module la transcription de l'ADN, par des actions génomiques au niveau du noyau de la cellule. Le complexe se fixe sur la partie promotrice du génome induisant ainsi une transactivation ou une transrépression de l'expression génique [67]. Cette propriété moléculaire de ce complexe confère au cortisol un rôle polyvalent dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme et sa survie. Ce rôle se résume en quatre axes :

1. Rôles anti-inflammatoires , et immunitaires grâce à ces effets immunosuppresseurs[68]
2. Rôles métaboliques notamment le métabolisme énergétique.[69]
3. Adaptation au stress (hormone de stress)[70]
4. Régulation du rythme circadien (Cycle veille-sommeil)[71]

La compréhension de la biosynthèse et la physiologie du cortisol mène naturellement a s'intéresser a son dosage ainsi qu'a sa physiopathologie.

5.3 Physiopathologie et dosage du cortisol dans les liquides biologiques

Dans une situation typique (personne saine, conditions de sommeil normales, et absence de stress) la production du cortisol est régie par un rythme nyctéméral circadien, la glande surrénale commence a produire le cortisol quelques heures avant le réveil, pour que la production atteint son pic maximum entre 7h et 8h du matin, ensuite elle diminue progressivement pour atteindre sa valeur minimale entre 2h et 4h du matin. Cette particularité de production influence directement les stratégies de dépistage et impose une vigilance particulière selon les contextes cliniques. En plus de ça, il faut prendre en considération le sexe et l'âge de la personne, l'états de santé physique, psychologique et physiopathologique de la personne ainsi la méthodes de dosages. Le dosage du cortisol est possible à partir de plusieurs liquides biologiques tels que : le sang, l'urine, et la salive.[72] Le tableau 3 mentionne à titre indicatif quelques valeurs de cortisol chez un adulte.

Tableau 3 : Concentrations usuelles du cortisol dans différents liquides biologiques (valeurs indicatives)

Liquides biologiques	Valeurs	Reference
Sang	250 a 750 nmol/L (De 8h a10h)	[73, 74]
	50 a 350 nmol/L (De 16h à 24h)	
Urine	De 30 a 200 nmol/L/24h	
Salive	10.5 a 27nmol/L (à 8h)	
	6.6 a 13nmol/L (à 12h)	
	5.2 a 9.2 nmol/L (à 16h)	
	1.2 a 6 nmol/L (à 20h)	

Quel que soit la cause d'un déséquilibre de niveau du cortisol dans l'organisme (hypercortisolisme ou hypocortisolisme), cela peut engendrer des tableaux cliniques variés complexes de mortalité accrues et morbidité multiviscérale :

- Syndromes de Cushing due a un excès chronique de cortisol.[75]
- Perturbation de métabolisme (Diabète, système cardiovasculaire, système immunitaire...etc.).[76]
- Maladie d'Addison due à un déficit primaire en production du cortisol.[77]

Dans le cas de l'insuffisance cardiaque , le cortisol s'impose comme un biomarqueur important reflétant l'état de stress de l'organisme. L'IC sévère stimule l'axe HHS, induisant ainsi une hypercortisolémie. Cette augmentation de cortisol favorise un profil inflammatoire, une dysrégulation métabolique, et une hypertrophie myocardique contribuant à son tour au remodelage cardiaque et par conséquence l'aggravation de l'IC.[78-80].

6 Méthodes de détection de NT-proBNP et du Cortisol dans l'insuffisance cardiaque

Plusieurs méthodes analytiques incluant nombreuses techniques multidisciplinaires ont été développées pour le dosage de NT-proBNP et de Cortisol dans différents liquides biologiques. Chaque méthode présente une particularité précieuse en fonction du contexte et les obstacles cliniques.[81] Le tableau suivant (Tableau 4) présente un récapitulatif des principales méthodes validées ou en cours de validations utilisées jusqu'à aujourd'hui pour la détection de NT-proBNP et du Cortisol. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), CLIA (Chimioluminescent immunoassay), RIA (Radioimmunoassay) et LC-MS/MS (Chromatographie liquide-spectrométrie de masse) demeurent les techniques classiques les plus robustes (Standard hospitalier), l'ensemble de ces techniques partage des points en commun : une haute spécificité et sensibilité et un cout non négligeable. Néanmoins, la nouvelle technologies et les biocapteurs ouvrent la voie à une détection non invasive, en temps réel, simple et non couteux.[82, 83]. Selon l'objectif de diagnostic , la sang, l'urine ou la salive ont été utilisées comme milieux biologiques d'analyses. Certains de ces approches analytiques ont déjà fait l'objet des validations cliniques telles que ELISA et CLIA. En revanche d'autres méthodes innovantes sont encore en phase de recherche et développement en vue d'intégration dans la pratique clinique notamment les biocapteurs électrochimiques.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des principales méthodes validées ou en cours de validations utilisées pour la détection de NT-proBNP et du Cortisol

Méthodes analytiques	Techniques	référence	
		NT-proBNP	Cortisol
Immunologique	ELISA	[84]	[85]
	CLIA/ECLIA	[86]	[87]
	RIA	[88]	[89]
Spectroscopie de masse et chromatographie	LC-MS/MS	[90]	[91]
	HPLC	[92]	[93]
Electrochimique	biocapteurs	[94]	[95]
Optique	SPR	[96]	[97]
	Fluorescence/SERS	[98]	[99]

7 Les fluides biologiques

La partie liquide du corps humain est connue sous le nom -Fluides biologiques ou liquide corporels, elle englobe l'ensemble des liquides extra et intracellulaire, son rôle principale consiste a assurer la transports des éléments nutritifs dans la totalité de l'organisme , et l'évacuation des déchets. Parmi ces fluides biologiques : le sang, l'urine et la salive sont les liquides les plus communs. Chacun de ces derniers possède des caractéristiques spécifiques exploitables dans le domaine de diagnostic médicale. Le choix de la matrice dépend souvent de la nature de biomarqueurs recherches et sa disponibilité dans la matrice Dans cette partie nous allons définir uniquement trois fluides (sang, urine et salive) en mettant l'accent sur la salive et son utilisation comme matrice cellulaire pour la détection des biomarqueurs.

7.1 Sang

Le sang est le fluide biologique le plus important du corps humain. C'est un tissu conjonctif liquide (Environ 5 litres chez un adulte soit 7 à 8% de la masse corporels), il est composé de :

- Plasma : c'est la phase liquide du sang de couleur jaunâtre présente environ de 55% du volume total, il contient une multitude d'électrolytes, des éléments nutritifs, des protéines plasmatiques, des lipides et des hormones circulantes.

- Éléments figurés : présentés par les globules rouge (assure le transport de l'oxygène), les globules blancs (joue un rôle immunitaire), et les plaquettes (Interviennent dans la coagulation sanguine).

Le rôle du sang est d'assurer l'apport des nutriments et de l'oxygène dans tout l'organisme ainsi d'évacuer les déchets de métabolisme cellulaires, en circulant constamment dans le système vasculaire . Du fait de sa circulation le sang est la matrice cellulaire standard en pratique clinique, car il fournit une image globale de la physiologie du corps, grâce a sa richesse en biomarqueurs circulantes [100].

7.2 Urine

L'urine est le moyen principal d'élimination des déchets par excellence, c'est le produit d'une filtration du sang au niveau des néphrons rénaux. C'est un liquide biologique jaune composé d'environ 95% d'eau, a pH légèrement acide de 6 , le reste est un mélange de composés organiques et inorganiques hydrosolubles (l'urée, des ions, créatinine,...etc.). La présence des composants anormaux dans les urines tels que le glucose, des protéines, sang,...etc. indique forcément la présence d'une pathologie sous-jacente. L'avantage majeur de l'utilisation de l'urine comme matrice de détection biologique est la facilité de collecte en quantité abondante et d'une façon non invasive.[101]

7.3 Salive

La salive est un liquide clair, incolore et visqueux avec un pH neutre , composés de 99% d'eau, le 1% restant est un mélange d'une large varités de composants, On y retrouve notamment des ions, des composés organique, de l'urée , des protéines, du glucose, des hormones, des mucines...etc. Elle est produite a raison d'environ ½ litre a 1 ,5litre par jour, dans la cavité buccale par les glandes salivaires (glande parotide, glande submandibulaire, et glande sublinguale).[102]

Pendant longtemps elle est resté considérée principalement pour son rôle digestif et buccal malgré ses multiples fonctions biologiques sont multiples, Aujourd'hui la salive suscite désormais un intérêt accru comme matrice de détection facilement accessible et non invasive

Des corrélations significatives ont été établies entre les concentrations sanguine et salivaire de plusieurs analytes, car vaste gamme de substances peut passer dans la salive par diffusion reflétant ainsi l'état de santé d'un individu. L'utilisation de la salive comme matrice de

détection alternative offre une méthode non invasive adaptée au dépistage de masse ou de suivi à long terme en contrepartie les faibles concentrations en biomarqueurs, sa composition influençables par des facteurs locaux (hygiène, stimulation de la sécrétion...etc.) présentent un défis.[103]

8 Conclusion

Ce chapitre a permis de mettre en lumière les deux biomarqueurs Nt-proBNP clé standard de l'insuffisance cardiaque et le cortisol indicateur majeur de stress systémique. Et d'établir le lien avec l'insuffisance cardiaque en détaillant leur physiologie et physiopathologie. Ces deux biomarqueurs permettant non seulement le diagnostic précoce et le suivi de la progression de l'IC , mais ouvrent également la voie a des approches plus personnalisées et innovantes de la prise en charge des patients. En plus de choix des biomarqueurs , le choix de fluide biologique joue un rôle fondamentale dans la stratégie de diagnostic. Parmi ces matrices on trouve la salive qui suscite actuellement un intérêt croissant en raison de sa nature non invasive, sa facilité de collecte et sa capacité de refléter avec fidélité des altérations physiopathologiques.

9 Références

- [1] E. J. Benjamin, P. Muntner, A. Alonso, M. S. Bittencourt, C. W. Callaway, A. P. Carson, *et al.*, "Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American Heart Association," *Circulation*, vol. 139, pp. e56-e528, 2019.
- [2] A. Kimmoun, K. Takagi, E. Gall, S. Ishihara, P. Hammoum, N. El Bèze, *et al.*, "Temporal trends in mortality and readmission after acute heart failure: a systematic review and meta-regression in the past four decades," *European Journal of Heart Failure*, vol. 23, pp. 420-431, 2021.
- [3] S. Emmons-Bell, C. Johnson, and G. Roth, "Prevalence, incidence and survival of heart failure: a systematic review," *Heart*, vol. 108, pp. 1351-1360, 2022.
- [4] E. G. Nabel, "Cardiovascular disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 349, pp. 60-72, 2003.
- [5] K.-J. Ho, "Cardiovascular diseases," in *Nutritional Aspects of Aging*, ed: CRC Press, 2018, pp. 75-100.
- [6] R. V. Jensen, M. V. Hjortbak, and H. E. Bøtker, "Ischemic heart disease: an update," in *Seminars in nuclear medicine*, 2020, pp. 195-207.
- [7] K. Ouriel, "Peripheral arterial disease," *The lancet*, vol. 358, pp. 1257-1264, 2001.
- [8] F. Levi, L. Chatenoud, P. Bertuccio, F. Lucchini, E. Negri, and C. La Vecchia, "Mortality from cardiovascular and cerebrovascular diseases in Europe and other areas of the world: an update," *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, vol. 16, pp. 333-350, 2009.
- [9] P. S. Rao, "Congenital heart defects—A review," *Congenital heart disease—Selected aspects*, pp. 1-44, 2012.
- [10] L. S. Passos, M. C. P. Nunes, and E. Aikawa, "Rheumatic heart valve disease pathophysiology and underlying mechanisms," *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, vol. 7, p. 612716, 2021.
- [11] H. Denolin, H. Kuhn, H. Krayenbuehl, F. Loogen, and A. Reale, "The definition of heart failure," *European heart journal*, vol. 4, pp. 445-448, 1983.
- [12] A. Groenewegen, F. H. Rutten, A. Mosterd, and A. W. Hoes, "Epidemiology of heart failure," *European journal of heart failure*, vol. 22, pp. 1342-1356, 2020.
- [13] A. P. Farrell and D. R. Jones, "The heart," in *Fish physiology*. vol. 40, ed: Elsevier, 2023, pp. 91-172.
- [14] A. L. Clark, "Origin of symptoms in chronic heart failure," *Heart*, vol. 92, pp. 12-16, 2006.
- [15] A. J. Coats, A. L. Clark, M. Piepoli, M. Volterrani, and P. A. Poole-Wilson, "Symptoms and quality of life in heart failure: the muscle hypothesis," *British heart journal*, vol. 72, p. S36, 1994.
- [16] I. Ekman, J. G. Cleland, B. Andersson, and K. Swedberg, "Exploring symptoms in chronic heart failure," vol. 7, ed: Wiley Online Library, 2005, pp. 699-703.
- [17] M. King, J. Kingery, and B. Casey, "Diagnosis and evaluation of heart failure," *American family physician*, vol. 85, pp. 1161-1168, 2012.
- [18] A. A. Inamdar and A. C. Inamdar, "Heart failure: diagnosis, management and utilization," *Journal of clinical medicine*, vol. 5, p. 62, 2016.
- [19] V. Castiglione, A. Aimò, G. Vergaro, L. Saccaro, C. Passino, and M. Emdin, "Biomarkers for the diagnosis and management of heart failure," *Heart failure reviews*, pp. 1-19, 2022.
- [20] G. Tzani, S. Dimopoulos, V. Agapitou, and S. Nanas, "Exercise intolerance in chronic heart failure: the role of cortisol and the catabolic state," *Current heart failure reports*, vol. 11, pp. 70-79, 2014.
- [21] C. Connolly and M. Wills, "Plasma cortisol levels in heart failure," *British medical journal*, vol. 2, p. 25, 1967.

- [22] J. L. Januzzi, R. van Kimmenade, J. Lainchbury, A. Bayes-Genis, J. Ordonez-Llanos, M. Santalo-Bel, *et al.*, "NT-proBNP testing for diagnosis and short-term prognosis in acute destabilized heart failure: an international pooled analysis of 1256 patients: the International Collaborative of NT-proBNP Study," *European heart journal*, vol. 27, pp. 330-337, 2006.
- [23] R. M. Califf, "Biomarker definitions and their applications," *Experimental biology and medicine*, vol. 243, pp. 213-221, 2018.
- [24] J. K. Aronson and R. E. Ferner, "Biomarkers—a general review," *Current protocols in pharmacology*, vol. 76, pp. 9.23. 1-9.23. 17, 2017.
- [25] V. Puntmann, "How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease," *Postgraduate medical journal*, vol. 85, pp. 538-545, 2009.
- [26] K. Strimbu and J. A. Tavel, "What are biomarkers?," *Current Opinion in HIV and AIDS*, vol. 5, pp. 463-466, 2010.
- [27] J. Adams 3rd, G. S. Bodor, V. G. Davila-Roman, J. A. Delmez, F. S. Apple, J. H. Ladenson, *et al.*, "Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury," *circulation*, vol. 88, pp. 101-106, 1993.
- [28] M. Plebani and M. Zaninotto, "Diagnostic strategies in myocardial infarction using myoglobin measurement," *European heart journal*, vol. 19, pp. N12-5, 1998.
- [29] E. Bignami, G. Landoni, G. Crescenzi, M. Gonfalini, G. Bruno, F. Pappalardo, *et al.*, "Role of cardiac biomarkers (troponin I and CK-MB) as predictors of quality of life and long-term outcome after cardiac surgery," *Annals of cardiac anaesthesia*, vol. 12, pp. 22-26, 2009.
- [30] M. E. Liquori, R. H. Christenson, P. O. Collinson, and C. R. Defilippi, "Cardiac biomarkers in heart failure," *Clinical biochemistry*, vol. 47, pp. 327-337, 2014.
- [31] P. M. McKie and J. C. Burnett, "NT-proBNP: the gold standard biomarker in heart failure," vol. 68, ed: American College of Cardiology Foundation Washington, DC, 2016, pp. 2437-2439.
- [32] A. Palazzuoli, M. Gallotta, I. Quatrini, and R. Nuti, "Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure," *Vascular health and risk management*, pp. 411-418, 2010.
- [33] C. deFilippi, S. Wasserman, S. Rosanio, E. Tiblier, H. Sperger, M. Tocchi, *et al.*, "Intérêt de la troponine cardiaque T et de la protéine C-réactive pour prédire le pronostic, l'athérosclérose coronaire et la myocardiopathie chez les hémodialysés chroniques," *JAMA*, vol. 290, pp. 353-359, 2003.
- [34] C. A. Nebiker, S. Staubli, J. Schäfer, R. Bingisser, M. Christ-Crain, S. Dell-Kuster, *et al.*, "Cortisol outperforms novel cardiovascular, inflammatory, and neurohumoral biomarkers in the prediction of outcome in acute pancreatitis," *Pancreas*, vol. 47, pp. 55-64, 2018.
- [35] C. Held, H. D. White, R. A. Stewart, A. Budaj, C. P. Cannon, J. S. Hochman, *et al.*, "Inflammatory biomarkers interleukin-6 and C-reactive protein and outcomes in stable coronary heart disease: experiences from the STABILITY (stabilization of atherosclerotic plaque by initiation of darapladib therapy) trial," *Journal of the American Heart Association*, vol. 6, p. e005077, 2017.
- [36] L. B. Daniels and A. S. Maisel, "Natriuretic peptides," *Journal of the American college of cardiology*, vol. 50, pp. 2357-2368, 2007.
- [37] A. De Bold, H. B. Borenstein, A. T. Veress, and H. Sonnenberg, "A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats," *Life sciences*, vol. 28, pp. 89-94, 1981.
- [38] T. Sudoh, K. Kangawa, N. Minamino, and H. Matsuo, "A new natriuretic peptide in porcine brain," *Nature*, vol. 332, pp. 78-81, 1988.
- [39] E. R. Levin, D. G. Gardner, and W. K. Samson, "Natriuretic peptides," *New England Journal of Medicine*, vol. 339, pp. 321-328, 1998.

- [40] T. Sudoh, N. Minamino, K. Kangawa, and H. Matsuo, "C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 168, pp. 863-870, 1990.
- [41] T. Suzuki, T. Yamazaki, and Y. Yazaki, "The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system," *Cardiovascular research*, vol. 51, pp. 489-494, 2001.
- [42] C. Hall, "Essential biochemistry and physiology of (NT-pro) BNP," *European journal of heart failure*, vol. 6, pp. 257-260, 2004.
- [43] T. Nishikimi, N. Maeda, and H. Matsuoka, "The role of natriuretic peptides in cardioprotection," *Cardiovascular research*, vol. 69, pp. 318-328, 2006.
- [44] Z. Cao, Y. Jia, and B. Zhu, "BNP and NT-proBNP as diagnostic biomarkers for cardiac dysfunction in both clinical and forensic medicine," *International journal of molecular sciences*, vol. 20, p. 1820, 2019.
- [45] J. P. Goetze, "Biosynthesis of cardiac natriuretic peptides," *Cellular Peptide Hormone Synthesis and Secretory Pathways*, pp. 21-44, 2010.
- [46] T. L. Yang-Feng, G. Floyd-Smith, M. Nemer, J. Drouin, and U. Francke, "The pronatriodilatin gene is located on the distal short arm of human chromosome 1 and on mouse chromosome 4," *American journal of human genetics*, vol. 37, p. 1117, 1985.
- [47] K. C. Arden, C. S. Viars, S. Weiss, S. Argentin, and M. Nemer, "Localization of the human B-type natriuretic peptide precursor (NPPB) gene to chromosome 1p36," *Genomics*, vol. 26, pp. 385-389, 1995.
- [48] P. Jourdain, G. Lefèvre, C. Oddeze, V. Sapin, F. Dievart, G. Jondeau, *et al.*, "NT-proBNP en pratique «De la biologie à la clinique»,» in *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 2009, pp. 165-179.
- [49] H. Tsutsui, N. M. Albert, A. J. Coats, S. D. Anker, A. Bayes-Genis, J. Butler, *et al.*, "Natriuretic peptides: role in the diagnosis and management of heart failure: a scientific statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Heart Failure Society of America and Japanese Heart Failure Society," *Journal of Cardiac Failure*, vol. 29, pp. 787-804, 2023.
- [50] N. Javed, M. El-Far, and T. J. Vittorio, "Clinical markers in heart failure: a narrative review," *Journal of International Medical Research*, vol. 52, p. 03000605241254330, 2024.
- [51] S. Mu, J. B. Echouffo-Tcheugui, C. E. Ndumele, J. Coresh, S. Juraschek, T. Brady, *et al.*, "NT-proBNP reference intervals in healthy US children, adolescents, and adults," *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, vol. 8, pp. 700-712, 2023.
- [52] S. Hendricks, I. Dykun, B. Balcer, M. Totzeck, T. Rassaf, and A. A. Mahabadi, "Higher BNP/NT-pro BNP levels stratify prognosis equally well in patients with and without heart failure: a meta-analysis," *ESC heart failure*, vol. 9, pp. 3198-3209, 2022.
- [53] B. L. Neuen, M. Vaduganathan, B. L. Claggett, I. Beldhuis, P. Myhre, A. S. Desai, *et al.*, "Natriuretic peptides, kidney function, and clinical outcomes in heart failure with preserved ejection fraction," *Heart Failure*, vol. 13, pp. 28-39, 2025.
- [54] R. Rørth, P. S. Jhund, M. B. Yilmaz, S. L. Kristensen, P. Welsh, A. S. Desai, *et al.*, "Comparison of BNP and NT-proBNP in patients with heart failure and reduced ejection fraction," *Circulation: Heart Failure*, vol. 13, p. e006541, 2020.
- [55] C. Mueller, K. McDonald, R. A. de Boer, A. Maisel, J. G. Cleland, N. Kozhuharov, *et al.*, "Heart Failure Association of the European Society of Cardiology practical guidance on the use of natriuretic peptide concentrations," *European journal of heart failure*, vol. 21, pp. 715-731, 2019.
- [56] E. Berthelot, M. T. Bailly, X. C. Lehova, M. E. B. Rahmani, R. Bounab, N. Mewton, *et al.*, "Setting the optimal threshold of NT-proBNP and BNP for the diagnosis of heart failure in patients over 75 years," *ESC Heart Failure*, vol. 11, pp. 3232-3241, 2024.

- [57] A. Rammos, A. Bechlioulis, P. Kalogeras, C. J. Watson, P. Salvo, T. Lomonaco, *et al.*, "The Potential Role of Salivary NT-proBNP in Heart Failure," *Life*, vol. 13, p. 1818, 2023.
- [58] A. Rammos, A. Bechlioulis, P. Kalogeras, E. E. Tripoliti, Y. Goletsis, A. Kalivi, *et al.*, "Salivary biomarkers for diagnosis and therapy monitoring in patients with heart failure. a systematic review," *Diagnostics*, vol. 11, p. 824, 2021.
- [59] C.-E. Karachaliou, G. Koukouvinos, D. Goustouridis, I. Raptis, S. Kakabakos, P. Petrou, *et al.*, "Cortisol Immunosensors: a literature review," *Biosensors*, vol. 13, p. 285, 2023.
- [60] N. C. f. B. Information, "PubChem compound summary," ed: National Center for Biotechnology Information Bethesda, MD, USA, 2021.
- [61] C. M. Weeks, W. L. Duax, and M. E. Wolff, "Comparison of the molecular structures of six corticosteroids," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 95, pp. 2865-2868, 1973.
- [62] W. Arlt and P. M. Stewart, "Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action," *Endocrinology and Metabolism Clinics*, vol. 34, pp. 293-313, 2005.
- [63] R. Sirianni, K. S. Rehman, B. R. Carr, C. R. Parker Jr, and W. E. Rainey, "Corticotropin-releasing hormone directly stimulates cortisol and the cortisol biosynthetic pathway in human fetal adrenal cells," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 90, pp. 279-285, 2005.
- [64] T. J. McKenna, D. P. Island, W. E. Nicholson, R. B. Miller, A. Lacroix, and G. W. Liddle, "ACTH stimulates late steps in cortisol biosynthesis," *European Journal of Endocrinology*, vol. 90, pp. 122-132, 1979.
- [65] Y. Fulla, L. Guignat, M.-A. Dugué, G. Assié, and X. Bertagna, "Exploration biologique de la fonction corticotrope," *Revue Francophone des Laboratoires*, vol. 2009, pp. 35-48, 2009.
- [66] J.-L. Coolens, H. Van Baelen, and W. Heyns, "Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin," *Journal of steroid biochemistry*, vol. 26, pp. 197-202, 1987.
- [67] C. Dejean and D. Richard, "Mécanismes d'action des glucocorticoïdes," *La Revue de medecine interne*, vol. 34, pp. 264-268, 2013.
- [68] W. M. Jefferies, "Cortisol and immunity," *Medical hypotheses*, vol. 34, pp. 198-208, 1991.
- [69] S. Khani and J. A. TAYEK, "Cortisol increases gluconeogenesis in humans: its role in the metabolic syndrome," *Clinical Science*, vol. 101, pp. 739-747, 2001.
- [70] M. M. Vijayan, N. Aluru, and J. F. Leatherland, "Stress response and the role of cortisol," in *Fish diseases and disorders, Volume 2*, ed: CABI Wallingford UK, 2010, pp. 182-201.
- [71] D. N. ORTH, D. P. ISLAND, and G. W. LIDDLE, "Experimental alteration of the circadian rhythm in plasma cortisol (17-OHCS) concentration in man," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 27, pp. 549-555, 1967.
- [72] J. Guechot, J. Fiet, P. Passa, J. Villette, B. Gourmel, F. Tabuteau, *et al.*, "Physiological and pathological variations in saliva cortisol," *Hormone Research in Paediatrics*, vol. 16, pp. 357-364, 1982.
- [73] X. Bertagna, "Corticothérapie et insuffisance corticotrope," *Revue française d'endocrinologie clinique, nutrition et métabolisme*, vol. 40, pp. 279-290, 1999.
- [74] U. Turpeinen and E. Hämäläinen, "Determination of cortisol in serum, saliva and urine," *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 27, pp. 795-801, 2013.
- [75] V. Favero, A. Cremaschi, C. Parazzoli, A. Falchetti, A. Gaudio, L. Gennari, *et al.*, "Pathophysiology of mild hypercortisolism: from the bench to the bedside," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, p. 673, 2022.
- [76] C. Asensio, P. Muzzin, and F. Rohner-Jeanrenaud, "Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance," *International Journal of Obesity*, vol. 28, pp. S45-S52, 2004.
- [77] L. D. Edwards, A. H. Heyman, and S. Swidan, "Hypocortisolism: An evidence-based review," *Integrative Medicine*, vol. 10, p. 30, 2011.

- [78] D. Pereg, J. Chan, E. Russell, T. Berlin, M. Mosseri, J. A. Seabrook, *et al.*, "Cortisol and testosterone in hair as biological markers of systolic heart failure," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 38, pp. 2875-2882, 2013/12/01/ 2013.
- [79] K. M. Kayes-Wandover and P. C. White, "Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 85, pp. 2519-2525, 2000.
- [80] E. Iob and A. Steptoe, "Cardiovascular disease and hair cortisol: a novel biomarker of chronic stress," *Current cardiology reports*, vol. 21, pp. 1-11, 2019.
- [81] S. Y. Kim, J.-P. Lee, W.-R. Shin, I.-H. Oh, J.-Y. Ahn, and Y.-H. Kim, "Cardiac biomarkers and detection methods for myocardial infarction," *Molecular & Cellular Toxicology*, vol. 18, pp. 443-455, 2022.
- [82] M. Oremus, R. McKelvie, A. Don-Wauchope, P. L. Santaguida, U. Ali, C. Balion, *et al.*, "A systematic review of BNP and NT-proBNP in the management of heart failure: overview and methods," *Heart failure reviews*, vol. 19, pp. 413-419, 2014.
- [83] A. Qureshi, Y. Gurbuz, and J. H. Niazi, "Biosensors for cardiac biomarkers detection: A review," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 171, pp. 62-76, 2012.
- [84] G. Colom, J.-P. Salvador, G. Acosta, F. Albericio, M. Royo, and M.-P. Marco, "Competitive ELISA for N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) determination in human plasma," *Analyst*, vol. 145, pp. 6719-6727, 2020.
- [85] S. Saiyudthong, P. Suwannarat, T. Trongwongsa, and S. Srisurapanon, "Comparison between ECL and ELISA for the detection of salivary cortisol and determination of the relationship between cortisol in saliva and serum measured by ECL," *Science Asia*, vol. 36, pp. 169-171, 2010.
- [86] Y.-Y. Chen, S.-L. Li, H.-L. Lin, W.-D. Li, X.-Z. Zhu, and H.-L. Zhang, "A chemiluminescence immunoassay for the detection of NT-proBNP," *Analytical Biochemistry*, vol. 611, p. 113950, 2020.
- [87] E. M. Repetto, D. Gonzalez, D. Jacobsen, F. Smithuis, J. Jamardo, M. Cano, *et al.*, "Evaluation of an automated chemiluminescent immunoassay for salivary cortisol measurement. Utility in the diagnosis of Cushing's syndrome," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, vol. 55, pp. e65-e68, 2017.
- [88] K. Togashi, K. Ando, T. Kameya, and M. Kawakami, "A specific and highly sensitive radioimmunoassay of human brain natriuretic peptide," *Rinsho byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, vol. 39, pp. 283-288, 1991.
- [89] H. Raff, P. J. Homar, and E. A. Burns, "Comparison of two methods for measuring salivary cortisol," *Clinical Chemistry*, vol. 48, pp. 207-208, 2002.
- [90] M. Berna, L. Ott, S. Engle, D. Watson, P. Solter, and B. Ackermann, "Quantification of NTproBNP in rat serum using immunoprecipitation and LC/MS/MS: a biomarker of drug-induced cardiac hypertrophy," *Analytical chemistry*, vol. 80, pp. 561-566, 2008.
- [91] K. Mészáros, G. Karvaly, Z. Márta, B. Magda, J. Tóke, N. Szücs, *et al.*, "Diagnostic performance of a newly developed salivary cortisol and cortisone measurement using an LC-MS/MS method with simple and rapid sample preparation," *Journal of endocrinological investigation*, vol. 41, pp. 315-323, 2018.
- [92] H. Shimizu, K. Masuta, K. Aono, H. Asada, K. Sasakura, M. Tamaki, *et al.*, "Molecular forms of human brain natriuretic peptide in plasma," *Clinica chimica acta*, vol. 316, pp. 129-135, 2002.
- [93] L. Zheng, X. Luo, L. Zhu, W. Xie, S. Liu, and Z. Cheng, "Simultaneous determination of cortisol, cortisone, 6 β -hydroxycortisol and 6 β -hydroxycortisone by HPLC," *Journal of chromatographic science*, vol. 53, pp. 451-455, 2015.
- [94] A. Baraket, E. K. Ghedir, N. Zine, N. Jaffrezic-Renault, A. Aarfane, H. Nasrellah, *et al.*, "Electrochemical Immunosensor Prototype for N-Terminal Natriuretic Peptide Detection in Human Saliva: Heart Failure Biomedical Application," *Chemosensors*, vol. 13, p. 66, 2025.

- [95] G. Karuppaiah, M.-H. Lee, S. Bhansali, and P. Manickam, "Electrochemical sensors for cortisol detection: principles, designs, fabrication, and characterisation," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 239, p. 115600, 2023.
- [96] S. H. Lee, J. H. Back, H. J. Joo, D.-S. Lim, J. E. Lee, and H. J. Lee, "Simultaneous detection method for two cardiac disease protein biomarkers on a single chip modified with mixed aptamers using surface plasmon resonance," *Talanta*, vol. 267, p. 125232, 2024.
- [97] Y. Tahara, Z. Huang, T. Kiritoshi, T. Onodera, and K. Toko, "Development of indirect competitive immuno-assay method using SPR detection for rapid and highly sensitive measurement of salivary cortisol levels," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 2, p. 15, 2014.
- [98] D. Zheng, Z. Wang, J. Wu, S. Li, W. Li, H. Zhang, *et al.*, "A Raman immunosensor based on SERS and microfluidic chip for all-fiber detection of brain natriuretic peptide," *Infrared Physics & Technology*, vol. 125, p. 104252, 2022.
- [99] J. E. Villa, I. Garcia, D. J. de Aberasturi, V. Pavlov, M. D. Sotomayor, and L. M. Liz-Marzán, "SERS-based immunoassay for monitoring cortisol-related disorders," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 165, p. 112418, 2020.
- [100] C. G. Atkins, K. Buckley, M. W. Blades, and R. F. Turner, "Raman spectroscopy of blood and blood components," *Applied spectroscopy*, vol. 71, pp. 767-793, 2017.
- [101] G. J. Tortora and B. Derrickson, *Anatomie et physiologie: De Boeck supérieur*, 2018.
- [102] F. de Paula, T. H. N. Teshima, R. Hsieh, M. M. Souza, M. M. S. Nico, and S. V. Lourenco, "Overview of human salivary glands: highlights of morphology and developing processes," *The Anatomical Record*, vol. 300, pp. 1180-1188, 2017.
- [103] S. Williamson, C. Munro, R. Pickler, M. J. Grap, and R. Elswick Jr, "Comparison of biomarkers in blood and saliva in healthy adults," *Nursing research and practice*, vol. 2012, p. 246178, 2012.

Chapitre 03 :

**Conception expérimentale et mise en œuvre
du biocapteur électrochimique salivaire
pour la détection simultanée de NT-proBNP
et de cortisol : approche méthodologique**

Chapitre 03 : Conception expérimentale et mise en œuvre du biocapteur électrochimique salivaire pour la détection simultanée de NT-proBNP et de cortisol : approche méthodologique

1 Introduction

Dans l'optique d'un dépistage anticipé et un diagnostic précoce de l'insuffisance cardiaque, une surveillance rapide, non coûteuses et accessible en dehors d'un cadre hospitalier. Des biocapteurs ont été développer comme une alternative prometteuse pour améliorer la santé publique[1]. Ce chapitre a pour but de présenter l'approche méthodologique utiliser pour le développement d'un biocapteur électrochimique salivaire destiné à la détection simultanée de NT-proBNP et le cortisol. Nous y présentons les techniques employées, ainsi que les étapes clés de la conception et la biofonctionnalisation de sa surface pour aboutir un système analytique fiable et adapté à une application dans un milieu biologique salivaire. Dans ce contexte des molécules de 4-Aminophénylacétique acide ont été utilisées pour la fonctionnalisation de notre biocapteur dans le but d'immobiliser des anticorps ciblant la détection de NT-proBNP et de Cortisol.

2 Le choix de biomarqueurs

Comme évoqué précédemment dans le deuxième chapitre, le choix de ces deux biomarqueurs (NT-proBNP et Cortisol) repose sur leur pertinence clinique dans le contexte de l'insuffisance cardiaque prouvée par plusieurs études de recherche scientifique et clinique (Voire le chapitre 02). Le NT-proBNP est considéré comme le biomarqueur standard de l'insuffisance cardiaque, c'est un indicateur direct de dysfonctionnement du cœur[2], tandis que le cortisol reflète l'état inflammatoire, métabolique et le stress systématique observé, souvent exacerbé dans cette pathologie[3]. Leur détection simultanée pourra offrir une vision globale de l'évolution de la maladie et de l'état du patient. De plus, leur détection dans la salive offre une alternative simple, non invasive, accessible à domicile[4].

3 Matériaux et réactifs

3.1 Produits utilisés

Le tableau5 récapitule l'ensemble des produits utilisés pour la conception de notre biocapteur ainsi leur fournisseur et leur rôle dans les différentes étapes expérimentales. Ces produits ont été préparé et conservé en respectant les conditions spécifiques indiquer dont les fiches techniques ou les notices d'utilisation conformément aux recommandations des fournisseurs.

Tableau 5 : Inventaire des produits impliqués dans le protocole expérimental

Produit	Rôle	Fournisseur
4-Aminophénylacétique (4-APA)	précurseur du sel de diazonium	Acros Organics (France)
Nitrite de sodium (NaNO_2)	Source de NO_2^- pour la diazotation	Sigma-Aldrich (France)
Acide chlorhydrique (HCL) 37%	Acide fort pour générer HNO_2	Sigma-Aldrich (France)
N-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthyl carbodiimide hydrochloride (EDC)	Activation chimiques des groupes -COOH	Sigma-Aldrich (France)
N-hydroxysuccinimide (NHS)	Activation chimiques des groupes -COOH	Sigma-Aldrich (France)
Ethanol pur	Solvant/Rinçage	Sigma-Aldrich (France)
PBS (Phosphate buffer saline)	Tampon physiologique	Sigma-Aldrich (France)
Phosphate disodique (Na_2HPO_4)	Préparation de la salive artificielle	Pharmagrade (France)
Chlorure de sodium (NaCl)	Préparation de la salive artificielle	Sigma-Aldrich (France)
Bicarbonate de sodium (NaHCO_3)	Préparation de la salive artificielle	Sigma-Aldrich (France)
Chlorure de calcium anhydre (CaCl_2)	Préparation de la salive artificielle	Sigma-Aldrich (France)
Mucine	Composant de la salive artificielle	Sigma-Aldrich (France)
Urée	Composant de la salive artificielle	Sigma-Aldrich (France)
Hexacyanoferrate (III) de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	Couple Redox	Sigma-Aldrich (France)
Hexacyanoferrate (II) trihydrate ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	Couple Redox	Sigma-Aldrich (France)
Eau ultrapure Milli-Q	Solvant ultrapure	Millipore system (France)

Ethanolamine	Blocage des site non-spécifique	Sigma-Aldrich (France)
Antigène NT-pro BNP	Molécule cible	Hy-Test (Finlande)
Anticorps monoclonal anti-NT-proBNP	Biorécepteur	Hy-Test (Finlande)
Hydrocortisone	Molécule cible	Abcam (Royaume-Uni)
Anticorps monoclonal anti-Cortisol	Biorécepteur	Abcam (Royaume-Uni)
Interleukine-10 (IL-10)	Molécule interférente	R&D Systems (France)
TNF- α (Facteur de nécrose tumorale alpha)	Molécule interférente	R&D Systems (France)

3.2 Appareils et dispositifs de mesures

Pour garantir la reproductibilité et la fiabilité des résultats toutes les mesures électrochimiques ont été réalisées au sein d'une boîte de Faraday pour minimiser les interférences électromagnétiques, les Champs électrostatiques et les fluctuations environnementales indirectes susceptibles d'altérer les signaux électriques mesurés.

Les mesures ont été effectués à l'aide d'un potentiostat VMP 3 multicanal, fabriqué par la société BioLogic Science Instruments, France. Le contrôle du potentiostat ainsi que l'acquisition des données et leur traitement ont été assurés par le logiciel EC-Lab développé par la même société (Figure 13).



Figure 13 : Le système de mesure électrochimique (Boîte de Faraday et le potentiostat VMP3)

Le transducteur de notre biocapteur a été fabriqué au Centre National de Microélectronique (CNM) à Barcelone, Espagne. Ce dispositif est composé de quatre microélectrodes de travail (WE) en or d'une surface de $0,64\text{mm}^2$ chacune, deux électrodes de référence Ag/AgCl (RE) d'une surface de $0,13\text{mm}^2$ chacune, et une contre électrode (CE) en platine, d'une surface de $1,37\text{mm}^2$ (Figure 14).

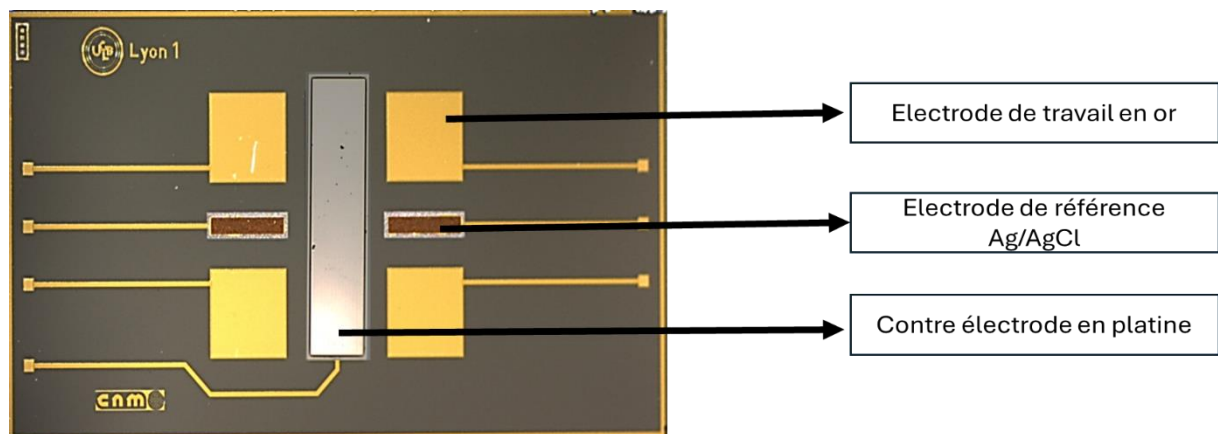


Figure 14 : Le transducteur électrochimique

En complément de ces dispositifs électrochimiques, d'autres équipements ont été nécessaires pour garantir la préparation optimale des surfaces et des solutions : un pH-mètre, un bain ultrason, et UV/Ozone Procleaner.

4 Préparation des solutions

Chaque préparation a été réalisée dans le strict respect des recommandations des fournisseurs et des notices techniques notamment en ce qui concerne les conditions de préparation et de conservation des réactifs. Toutes les solutions ont été préparées par pesée à l'aide d'une balance analytique afin de garantir la précision des concentrations et la reproductibilité des résultats.

4.1 Préparation des anticorps Anti-NT-proBNP et Anti-Cortisol

La reconstitution, la dilution, et la conservation sont des étapes cruciales dans la préparation des solutions d'anticorps monoclonaux (mAc) du NT-proBNP et du cortisol. Elles assurent non

Seulement la stabilité des biomolécules et leur structure moléculaire , mais également préservent leurs efficacité fonctionnelle analytique.

Les anticorps anti-NT-proBNP ont été fourni sous forme d'une solution mère à une concentration de 6,1 mg/mL.. et elle a été conservée à 4°C dans des conditions réfrigérées jusqu'à utilisation conformément au spécification du fournisseur.

Quant aux anticorps anti-cortisol , ceux-ci ont été initialement reconstitués selon les recommandations du fournisseur . Chaque aliquote contenant un volume de 10µL à une concentration de 2mg/mL a été conservé à -20 °C. Ce mode conservation permet d'éviter la décongélation/ congélation répétées qui peut causer la dégradation des anticorps.

Pour chaque série d'analyses, une aliquote de 10µg/mL a été préparée par dilution pour chacun des anticorps monoclonaux. Les dilution ont été réalisées dans un tampon phosphate salin (PBS) contenant 0,09% d'azide de sodium comme agent conservateur, inhibiteur de la croissance microbienne sans compromettre l'activité biologique des anticorps.

Ces dilutions sont nécessaire pour atteindre une concentration optimale pour la fonctionnalisation de la surface du biocapteur, limitant ainsi les risques de surcharge de la surface de biocapteur ou d'adsorption aléatoire qui pourraient affecter la spécificité et la sensibilité de la détection.

4.2 Préparation des solutions standards des biomarqueurs

Dès la réception de la protéine (NT-proBNP) des aliquotes de 10µL à une concentration de 1,2mg/mL ont été préparées et conservées immédiatement à -80° C jusqu'à utilisation.

Concernant le cortisol à cause de sa nature hydrophobe la préparation de solution mère a été réalisée en premier temps par solubilisation dans l'éthanol à une concentration de 1mg/mL, permettant ainsi la dissolution complète du cortisol, par la suite des solutions standards ont été préparées par dilution de la solution mère dans un tampon salin (PBS) .

Les solutions standards a différentes concentrations ont été préparées en mélangeant les deux biomarqueurs (NT-proBNP et Cortisol) dans le tampon salin (PBS) simulant ainsi des conditions proches d'un échantillon biologique complexe pour une détection simultanée.

En parallèle, des solutions standards de potentiels interférents (IL-10 et TNF- α)(Voir l'annexe 1 et 2) ont été préparées dans les mêmes conditions, contenant des molécules souvent présent dans les fluides biologiques. Ces solutions sont utilisées pour évaluer la sélectivité et la spécificité du biocapteur.(Tableau 6).

Tableau 6 : Concentrations des solutions standards de biomarqueurs et des solutions d'interférences

	Biomarqueurs		Interférents	
	NT-proBNP (pg/mL)	Cortisol (ng/mL)	IL-10 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
Concentrations	0.03	0.02	0.03	0.03
	0.06	0.04	0.06	0.06
	0.1	0.1	0.1	0.1
	0.3	0.2	0.3	0.3
	0.6	0.4	0.6	0.6
	0.9	0.6	0.9	0.9

4.3 Préparation de la salive artificielle

Afin d'imiter la composition chimique, la fonction biologique, et reproduire un fluide biologique buccal similaire à la salive humaine naturelle. Une salive artificielle a été élaborée selon des protocoles établis dans la littérature scientifique [5-7], en mélangeant :

- 0,6g/L chlorure de calcium anhydre.
- 0,6g/L phosphate disodique.
- 0,4g/L chlorure de potassium .
- 0,4g/L chlorure de sodium.
- 4 g/L mucin
- 4 g/L urée

L'ensemble des composants a été dissout dans de l'eau désionisée l'aide d'une sonication pour assurer l'homogénéisation de la solution. Ensuite le pH de cette dernière a été ajusté a 7,2 en ajoutant une solution de 1M d'hydroxyde de sodium (NaOH). Et enfin, une stérilisation par

autoclave a été effectuée afin d'inhiber toute croissance microbienne susceptible d'interférer avec les résultats de détection ou altérer les composants. La salive artificielle a été conservée à - 4 °C jusqu'à utilisation.

4.4 Préparation des solutions standards pour la méthode des ajouts dosés

4.4.1 Principe général de la méthode des ajouts dosés

Standard addition method (SAM) en anglais, est une technique de dosage utilisée pour améliorer la précision de la détection électrochimique dans une matrice complexe comme les liquides biologiques. Le principe consiste à utiliser l'échantillon comme base de comparaison en ajoutant des quantités connues d'un analyte directement dans l'échantillon à analyser permettant ainsi de rectifier les effets de matrice et de déterminer une concentrations inconnue d'un échantillons[8, 9] .

4.4.2 Préparation des solution (SAM)

Dans le cadre de validation de notre biocapteur, des solutions de 100pg/mL de NT-proBNP et 100ng/mL de cortisol ont été préparées dans la salive artificielle pour simuler un échantillon réel . Des aliquotes de ces solutions ont été utilisées pour établir quatre niveaux de concentration. Le tableau 7 présente les concentrations finales C0,C1,C2 et C3 correspondant respectivement aux niveaux d'ajout 0,1,2,3 obtenus en appliquant ce protocole.

Tableau 7 : Niveaux de concentrations en NT-proBNP et de cortisol utilisés pour la méthodes des ajouts dosés

Niveau	Volume ajoutés (µL)			Concentrations finales	
	Echantillon Simulé	NT-proBNP (100pg/mL)	Cortisol (100ng/mL)	NT-proBNP (pg/mL)	Cortisol (ng/mL)
0	50µL	0	0	0	0
1	50µL	50	50	5	5
2	50µL	100	100	10	10
3	50µL	150	150	15	15

Un volume de 50µL de chaque solution, simulant l'échantillon inconnu a été transféré dans quatre eppendorfs de 1 mL . Le premier eppendorf est considéré comme le niveau 0 constituant ainsi le témoin, les trois autres eppendorfs présentent les niveaux 1,2, et 3, en rajoutant respectivement des volumes croissantes 50µL, 100µL, 150µL, du même solutions précédentes

Chapitre 03 : Conception expérimentale et mise en œuvre du biocapteur électrochimique salivaire pour la détection simultanée de NT-proBNP et de cortisol : approche méthodologique

de NT-proBNP et de cortisol. Le volume final a été ajusté à 1 mL par ajout de PBS. La figure 15 illustre le principe de la méthode des ajouts dosés appliqué dans cette étude.

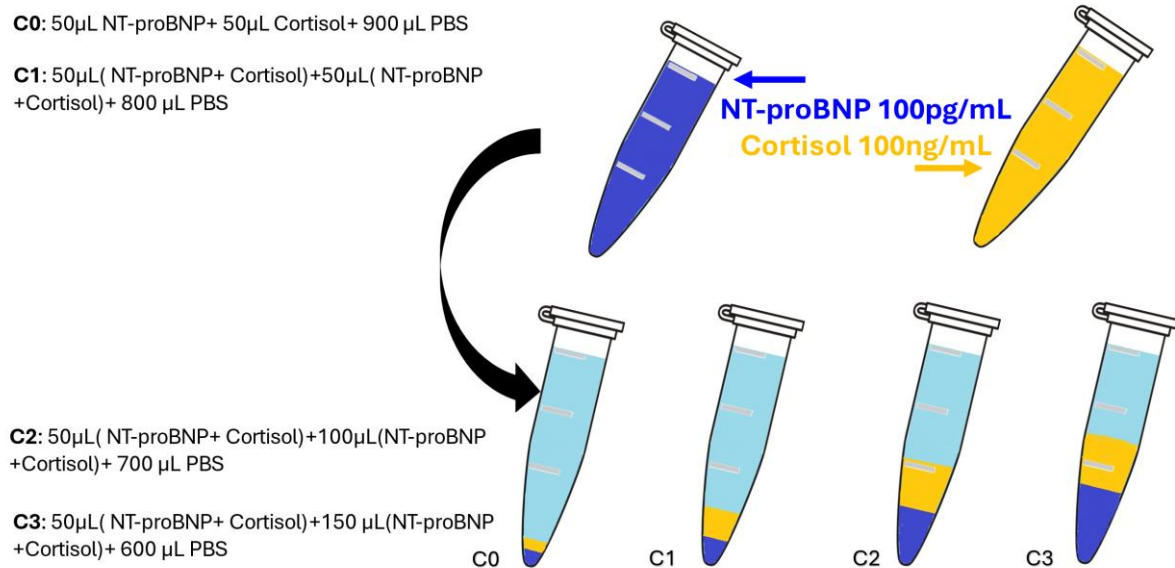


Figure 15 : Illustration du principe de la méthode des ajouts dosés appliquée à la détection de NT-proBNP et de cortisol dans la salive artificielle.

5 Biofonctionnalisation de la surface du biocapteur

5.1 Nettoyage de la surface du capteur

Préalablement à toute manipulation de biocapteur, une procédure de nettoyage rigoureuse a été effectuée, afin d'éliminer les impuretés organique et inorganiques, pour assurer une surface électrochimique propre et réactive, selon les étapes suivantes :

- Une sonication dans l'acétone pendant 10 minutes pour dissoudre les résidus organique tenaces.
- Rinçage successifs à l'éthanol puis à l'eau ultrapure, pour éliminer les solvants résiduels.
- Séchage a l'aide d'un flux d'azote.
- Nettoyage UV-ozone pendant 30 minutes pour une décontamination complète de la surface des électrodes.

5.2 Fonctionnalisation de la surface du capteur

La fonctionnalisation de la surface des électrodes constitue une étape essentielle dans la conception de biocapteurs pour assurer la stabilité et la bonne immobilisation des biorécepteurs. Parmi les techniques de fonctionnalisation et de greffage, l'utilisation de sels de diazonium présente une approche simple, rapide, et très puissante à large spectre d'utilisation[10]. Plusieurs avantages justifient son emploi dans la conception des biocapteurs électrochimiques :

- Une excellente stabilité chimique et mécanique grâce au greffage covalent fort avec la surface de l'électrode.
- Une compatibilité large avec divers substrats conducteur (Or, carbone, platine...etc.).
- Une polyvalence fonctionnelle grâce aux présences de plusieurs groupements portés par le cycle aromatique.
- Une densité de surface contrôlée, en ajustant les conditions électrochimique de déposition.
- résistance aux variations des conditions physique ou chimique[11]

5.2.1 Préparation du sel de diazonium (4-APA)-Principe

Le principe de formation de sel de diazonium à partir de 4-Aminophénylacétique Acide (4-APA) (Figure 16) repose sur la réaction chimique de diazotation. Le 4-APA est composé d'un cycle benzénique qui porte un groupe amine (-NH₂) en position para par rapport au groupe acétique. [12]

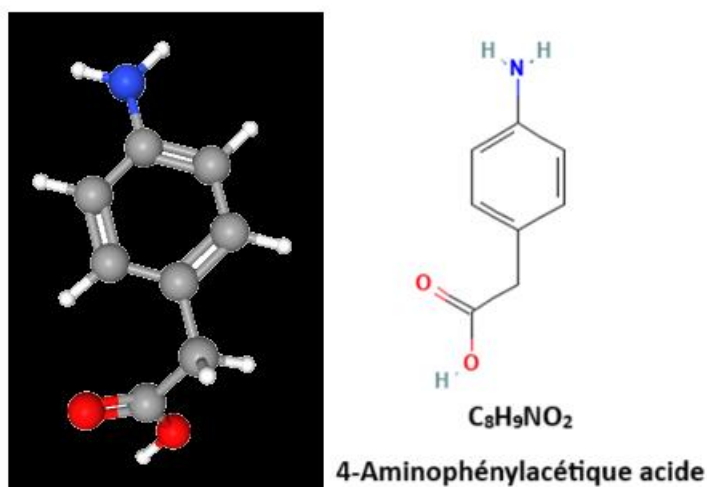


Figure 16 : Structure chimique de 4-Aminophénylacétique Acide (4-APA)

L'amine aromatique de 4-APA (4-APA-NH₂) est le précurseur de cette réaction. A basse température (généralement 0 et 4°C) et dans un milieu enrichi de HCl et de NaNO₂ deux réaction se produisent successivement

- Réaction acido-basique (En premier) : le nitrite de sodium (NaNO₂) réagit avec l'acide chlorhydrique (HCl) libérant l'acide nitreux (HNO₂) et du chlorure de sodium (NaCl) puis formant l'ion nitrosyle.
- Réaction oxydoréduction (En deuxième) : pour former le sel de diazonium, le 4-APA-NH₂ réagit avec le HCl formant ainsi un ion ammonium aromatique 4-APA-NH₃⁺, ensuite ce dernier réagit avec l'ion nitrosyle pour produire le sel de diazonium 4-APA-NH₂⁺Cl⁻ en libérant de l'eau. Le sel de diazonium formé est très réactif et instable a température ambiante, il doit être immédiatement réduit électrochimiquement a la surface de l'électrode.[13]

Brièvement, dans une réaction de diazotation, l'amine primaire aromatique est un nucléophile qui réagit avec un ion nitrosyle pour former le N-nitrosamine, qui par la suite sera transformé en sel de diazonium.

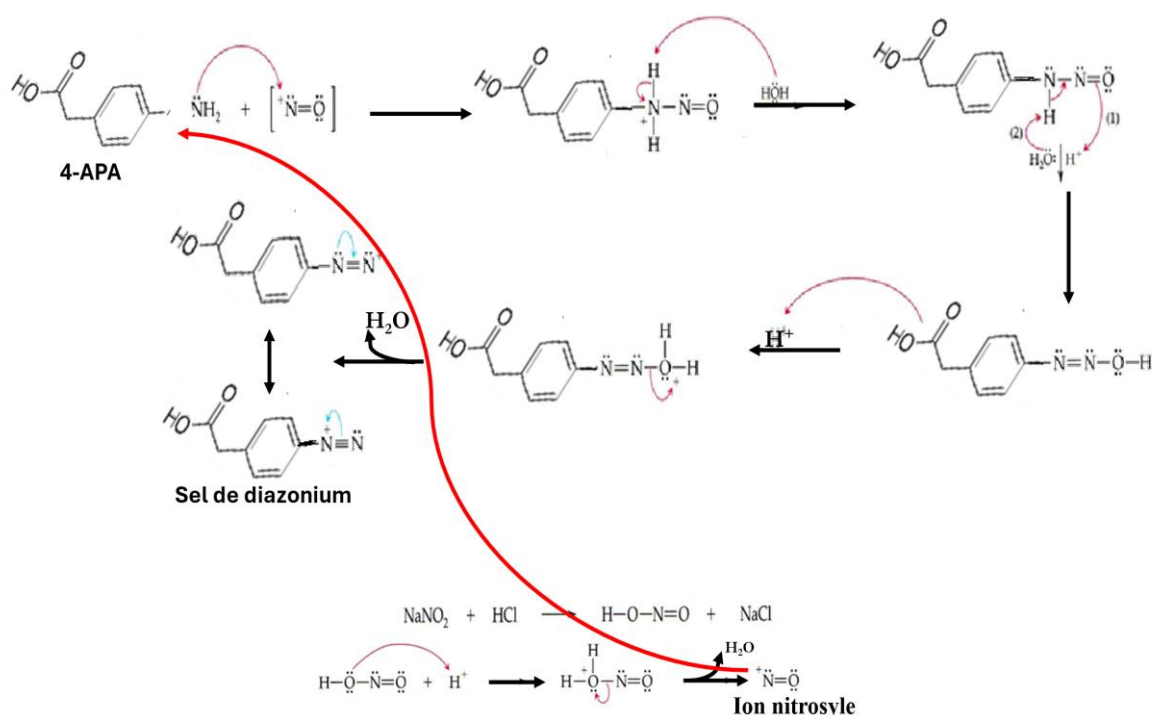


Figure 17 : Illustration des étapes de formation du sel de diazonium

Dans cette étude, une solution de 3 mM de 4-APA a été préparé par sonication pendant 10 minutes dans de l'eau déionisée afin d'assurer une dissolution complète, la solution ainsi obtenue a ensuite été refroidie pour stabiliser les réactifs. Pour générer le sel de diazonium et assurer une diazotation complète de 4-APA, un mélange de HCl et de NaNO₂ de 10 mM a été rajouté à la préparation précédente. Ensuite la solution a été incubée pendant 10min à 4°C. L'apparition d'une coloration rosée indique la réussite de la diazotation. La figure 17 illustre les étapes de formation du sel de diazonium.

5.2.2 Electrodeposition de 4-APA

L'électrodeposition (électrodeposition) sélective de la solution 4-APA préparée précédemment a été réalisé par la technique Voltampérométrie cyclique (CV). Quinze cycles de CV ont été appliquée on immergeant le biocapteur dans une solution de 4-APA, dans une fenêtre de potentiel comprise entre 0V et -1,1V , avec une vitesse de balayage de 80mV/s, induisant ainsi la formation progressive d'une couche organique isolante de 4-APA, greffée d'une manière covalente a la surface de l'électrode de travail. Seules deux électrodes de travail ont été connectées à la fois au potentiostat afin de pouvoir contrôler sélectivement leur biofonctionnalisation. Deux électrodes de travail (WE) ont été modifié pour l'immobilisation ultérieure des anticorps anti-NR-proBNP, puis les deux autres pour des anticorps anti-Cortisol

Pendant toute la durée de l'électrodeposition, la solution était maintenue dans un bain glacé, 4°C au maximum afin de garantir la stabilité de sel de diazonium. Plusieurs paramètres de cette procédure ont été optimisés pour assurer un dépôt homogène et contrôlé . Le tableau 8 présente un récapitulatif des paramètres de l'électrodeposition. La validation de la réussite et la qualité de l'électrodeposition de 4-APA seront discutées dans le chapitre 04 .

Tableau 8 : Récapitulatif des paramètres de l'électrodeposition de 4-APA

Concentration de 4-APA	3mM
Nombre de cycles CV	15
Fenêtre de potentiel	De 0V à -1,1V vs Ag /AgCl
Vitesse de balayage	80mV/s
Température	Entre 0°C et 4°C
Nombre d'électrodes connectées	2 WE par sérié

5.2.3 Activation de 4-APA par EDC/NHS-Principe

Comme on a vu précédemment que le choix de sel de diazonium 4-APA pour la fonctionnalisation de notre biocapteur est une étape clé dans notre approche. Grâce à sa structure bifonctionnelle, le 4-APA prêt à former un radical aryle hautement labile, qui va se stabiliser en formant une liaison covalente avec la surface en or de l'électrode, la création de cette liaison induit l'exposition du groupe fonctionnel carboxylique -COOH en position para vers l'extérieur, qui servira par la suite d'un point d'ancrage chimique pour les anticorps. L'activation de ces groupes carboxyliques se fait généralement par l'utilisation du couple EDC/NHS (Activation chimique classique). Dans ce contexte les groupements carboxyliques de notre biocapteur ont été activés par immersion pendant une heure (1h), dans une solution de 0,4M EDC / 0,1M NHS préparée préalablement dans l'éthanol à température ambiante. L'activation se déroulera selon les étapes suivantes (Figure 18) :

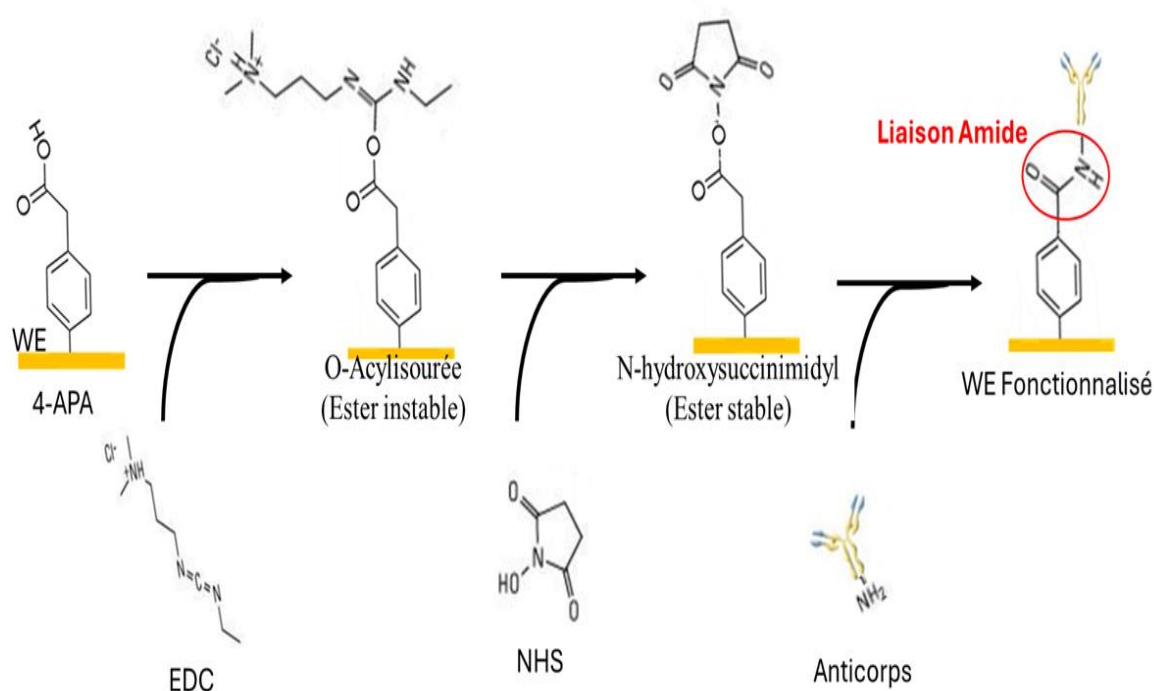


Figure 18 : Illustration du mécanisme d'activation des groupements -COOH de 4-APA avec l'EDC/NHS

- Formation d'un ester d'isourée (O-acylisourée) suite à l'interaction entre le groupement -COOH et EDC (Intermédiaire très réactif mais instable).

- Formation d'un ester NHS (N-hydroxysuccinimidyl) un ester plus stable, en substituant de O-acylisourée, fournissant ainsi la stabilisation nécessaire pour l'immobilisation des anticorps .
- Formation de la liaison covalente amide (CO-NH) entre le groupement phényl de sel de diazonium et le groupement amine (-NH₂) des acides aminés des anticorps. En libérant le NHS[14].

5.2.4 Immobilisation des anticorps Anti-NT-proBNP et Anti-Cortisol

Une fois les groupements -COOH activés, on peut immobiliser des anticorps (Ac) anti-NT-proBNP et anti-Cortisol, d'une manière covalente par le biais de la liaison amide (CO-NH) établi entre l'Ac et le groupement -COOH activé . Après activation, le biocapteur a été ricé par 0.1M de HCL, et immédiatement incubé a 4°C pendant 1h dans une solution contenant les anticorps (30µL). Les anticorps immobilisés conservent leur site de reconnaissance intacte, permettant ainsi la détection des biomarqueurs spécifiques NT-proBNP et Cortisol.

5.2.5 Blocages des groupes -COOH résiduels

Après l'immobilisation des anticorps, tous les groupement -COOH non liées (Résiduels) ont été désactivés par l'ajout 0,1% d'éthanolamine (amine primaire) pendant 20min , pour inhiber toute réaction ultérieurs non spécifique.

L'application de cette approche de biofonctionnalisation a été rendu possible grâce a l'utilisation d'un capteur avec 4 microélectrodes de travail (4WEs), permettant ainsi la biofonctionnalisation sélective et indépendante de deux WEs avec les Ac- anti-NT-proBNP, puis les deux autres avec Ac-anti-Cortisol en appliquant la même approche.

6 Techniques électrochimiques

Dans ce travail l'évaluation de la réussite de la biofonctionnalisation et la performance analytique de notre biocapteur sera validée par deux techniques électrochimiques : la voltampérométrie cyclique (CV) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE).

6.1 Voltampérométrie cyclique (CV)

6.1.1 Principe de CV

Pour étudier les propriétés oxydoréduction d'un système électrochimique et sa cinétique de transfert d'électrons a l'interface électrode /électrolyte, la voltampérométrie cyclique présente une technique incontournable grâce à sa simplicité . Son fonctionnement repose sur l'application d'un potentiel variable en forme de rampe triangulaire a une électrode de travail (Figure 19-a).

Pour cela un système électrochimique de trois électrodes est nécessaire (Electrode de travail, électrode de référence et une électrode auxiliaire-contre électrode). Le courant mesuré en fonction de potentiel appliqué produit une courbe appelé voltammogramme cyclique, une caractéristique du comportement électrochimique d'un système (Figure 19-b).

Le potentiel appliqué est balayé linéairement (Aller-Retour) de E_i à E_f a une vitesse constante (V/s), puis inversé pour revenir à E_i d'où le nom cyclique[15]. Une réaction d'oxydation ou/et de réduction se produit lorsque le potentiel redox est atteint, le courant généré par ces réactions dépend principalement a :

- Plage de potentiel E_i - E_f
- Vitesse de balayage
- Direction de balayage.
- Amplitude de balayage.
- Concentrations de l'analyte (Espèce Redox).
- Température.

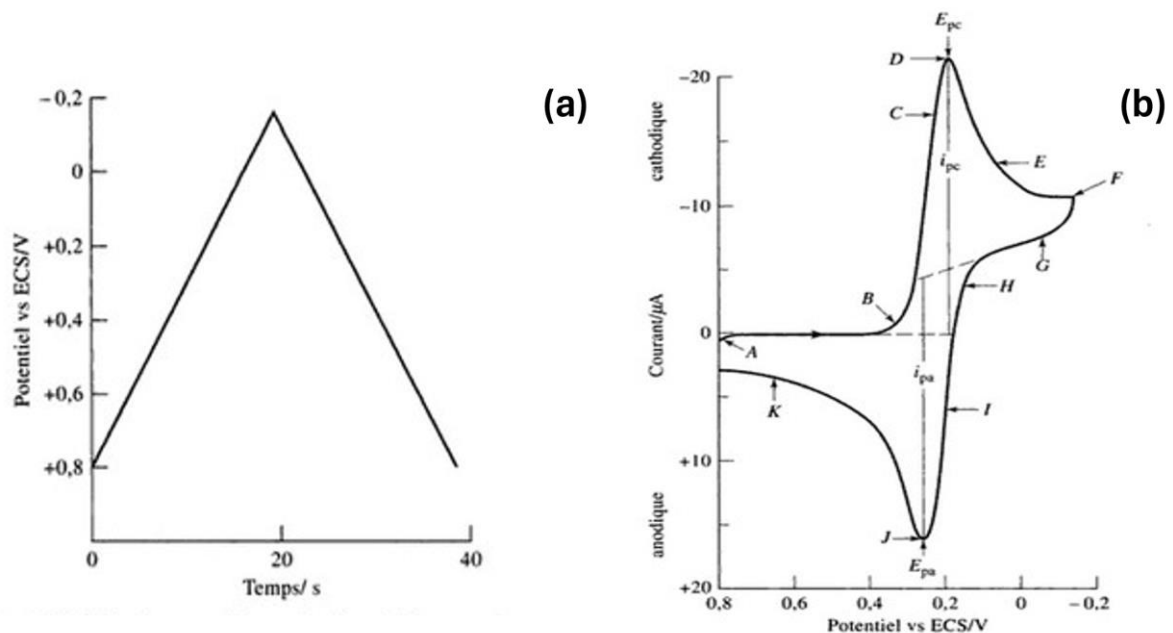


Figure 19 : (a) rampe triangulaire d'un potentiel utilisé en voltampérométrie cyclique pour obtenir le voltammogramme (b)

6.1.2 Les grandeurs d'un voltammogramme cyclique

Plusieurs informations peuvent être extraites d'un voltammogramme (Figure 20), permettant ainsi de mieux comprendre le processus de la réaction électrochimique observée.

- Potentiels de redox : E_{pa} et E_{pc} pour le potentiel de pic anodique correspond à l'oxydation, et cathodique, correspond à la réduction respectivement.
- Courant de pic I_{pa} et I_{pc} : l'intensité des pics est proportionnelle à la concentration de l'analyte, ou à la racine carré de la vitesse de balayage dans un système diffusif. I_{pa} correspond au maximum de courant positif mesuré lors de l'oxydation de l'espèce électroactive pendant le balayage vers des potentiels (E) plus positifs. I_{pc} correspond au maximum de courant négatif mesuré lors de la réduction de l'espèce électroactive pendant le balayage de retour vers des potentiels (E) plus négatifs.
- Séparation des pics ΔE_P : $E_{pa} - E_{pc}$: Un paramètre clé permet de déterminer la réversibilité de la réaction. Théoriquement dans un système rapide et réversible ΔE_P doit être proche 59mV à température ambiante.
- Forme de la courbe : permet de juger la nature du processus (Diffusif, adsorptif, irréversible,...).Tableau 09.

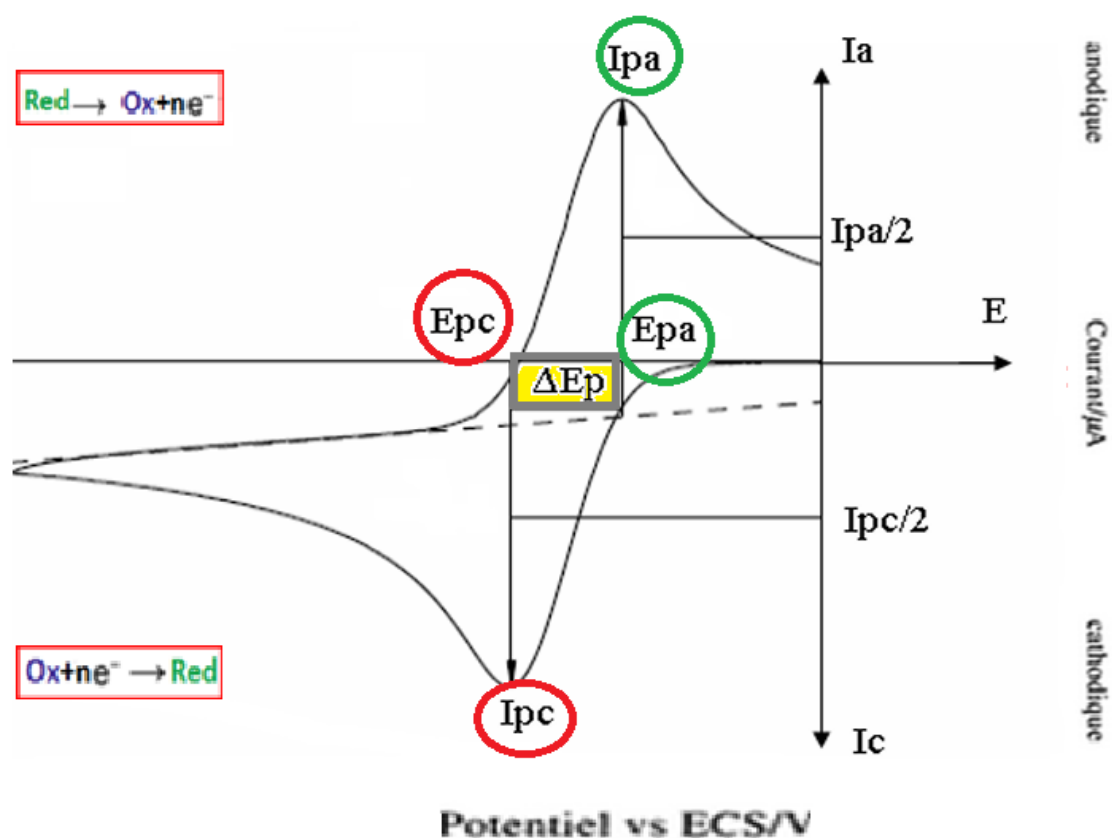


Figure 20 : Allure typique d'un voltammogramme cyclique

Tableau 9 : Correspondance entre la forme du voltammogramme et la nature de processus

Forme de voltammogramme	Nature de processus	Explication
Deux pics nets, symétriques et proches	Réversible contrôlé par diffusion	Transfert d'électrons rapides diffusion sans blocage
Deux pics nets, asymétriques et fortement écartés	Irréversible ou cinétique lente	transferts d'électrons limités Ralentissement de la réaction
Pics larges peu intenses	Diffusion contrôlée	Processus dépendant du transport de la matière dans la solution
Pics étroits très intenses, séparation ΔE_p faible.	Adsorption contrôlée	Espèces fixés à la surface un Courant élevé pour une petite quantité de matière
Courbe sans pics (Rectangulaire ou droite)	Comportement capacitif	absence de la réaction redox chargement/ déchargement de la double couche électrique

Une compréhension profonde de ces paramètres permet d'approfondir la connaissance des réactions électrochimique se déroulant à l'interface (électrode /solution). Ce qui est important non seulement pour interpréter correctement le processus oxydoréduction, mais aussi pour optimiser l'application pratique de la voltampérométrie cyclique que ce soit pour la modification contrôler des surfaces électrochimique ou pour l'évaluation de la réactivité des matériaux.

6.1.3 Application de CV

La CV est une technique rigoureuse dans le domaine de l'élaboration et la conception des capteurs et biocapteurs grâce a sa simplicité de mise en œuvre, associée a sa richesse en information. Elle permet d'explorer et caractériser le comportement électrochimique des matériaux conducteur (électrode nue ou modifiée), elle est utilisée également dans l'étude de comportement électrochimique d'un couple redox, dans la fonctionnalisation des surfaces, dans le suivi et l'évaluation de la stabilité des surfaces modifiées, et aussi utilisées comme technique d'évaluation (Détection) de la sensibilité de l'interface pendant la conception des biocapteurs. Bien que la CV est une technique très puissante, elle présente quelques limitations, une faible sensibilité pour des concentrations faibles en comparaison avec d'autres techniques, résolution temporelle limités, et l'intervention de plusieurs processus pouvant compliqué l'interprétation[16].

Dans ce travail cette technique a été utilisée pour l'électrodéposition de 4-APA sur une électrode en or, et pour l'évaluation de la réussite de cette modification comme mentionnée dans la partie

5.2.2 de ce chapitre. Les résultats expérimentaux obtenus feront l'objet d'une discussion détaillée dans le chapitre suivant.

6.2 Spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

6.2.1 Principe de SIE

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est l'une des techniques les plus utilisées malgré sa complexité. SIE permet d'étudier les propriétés électrochimiques interfaciales d'un système composés de trois électrodes prenant en compte plusieurs phénomènes tels que : La diffusion, la capacité de double couche, la contribution de la résistance de transfert d'électrons...etc.

Son principe de fonctionnement repose sur l'application d'un signal alternatif sinusoïdal de faible amplitude (Potentiel E) superposé a un signal de repos, un courant (I) sinusoïdal déphasé par rapport au signal appliqué sera généré par le système électrochimique. [17](Figure 21).

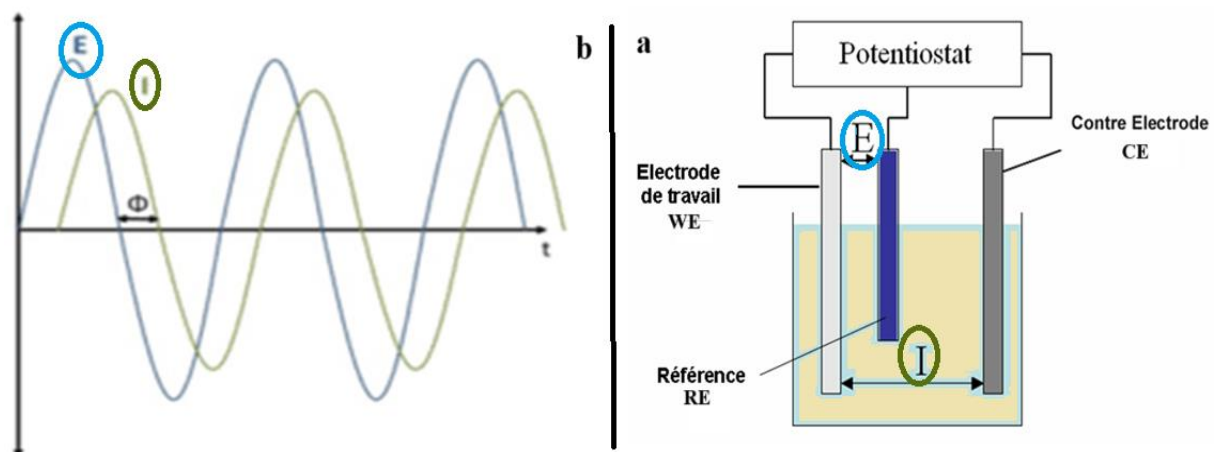


Figure 21 : (a) Système électrochimique à 3électrodes, (b) Représentation schématique de déphasage entre le potentiel appliqué (E) et le courant résultant (I)

Théoriquement dans un système électrochimique idéal , les deux grandeurs potentiel appliqué (E) et courant résultant sont proportionnels, selon la loi d'Ohm, ou la résistance $R = \frac{E}{I}$ [18]. Cependant en réalité dans une expérience d'impédance , le courant résultant suite à l'application du potentiel alternatif dépends a plusieurs processus physicochimiques interfaciales :

- Le transfert d'électrons.
- la diffusion des espèces analytiques.
- les charges de double-couche.

- les barrières de surface (films, couches greffées, membranes,...etc.).

Donc la notion de résistance (R) sera remplacé par l'impédance $Z(\omega)$, un paramètre globale et plus complexe incluant des résistances et des inductances produites lors du passage d'un courant alternatif à travers d'un circuit électrique. Théoriquement l'impédance est l'analogie de la résistance, repose sur le principe que les systèmes étudiés sont linéaires, bien que en réalité le comportement d'un système électrochimique n'est pas totalement linéaire en raison des processus physicochimique qu'on a vu précédemment. Pour résoudre ce problème une approche consiste à créer un domaine pseudo-linéaire en appliquant un signal sinusoïdal perturbateur de faible amplitude potentiostatique (Potentiel) ou galvanostatique (Courant), générant ainsi une réponse proportionnelle au signal imposé, et gardant les superpositions fréquentielles valides [18](Figure 22). L'impédance est alors définie comme le rapport entre les variations de potentiel et la réponse en courant, en fonction de la fréquence, cette approche permet de caractériser le processus électrochimique sur une large gamme de fréquences en séparant les contributions résistive capacitive et diffusives [17, 19].

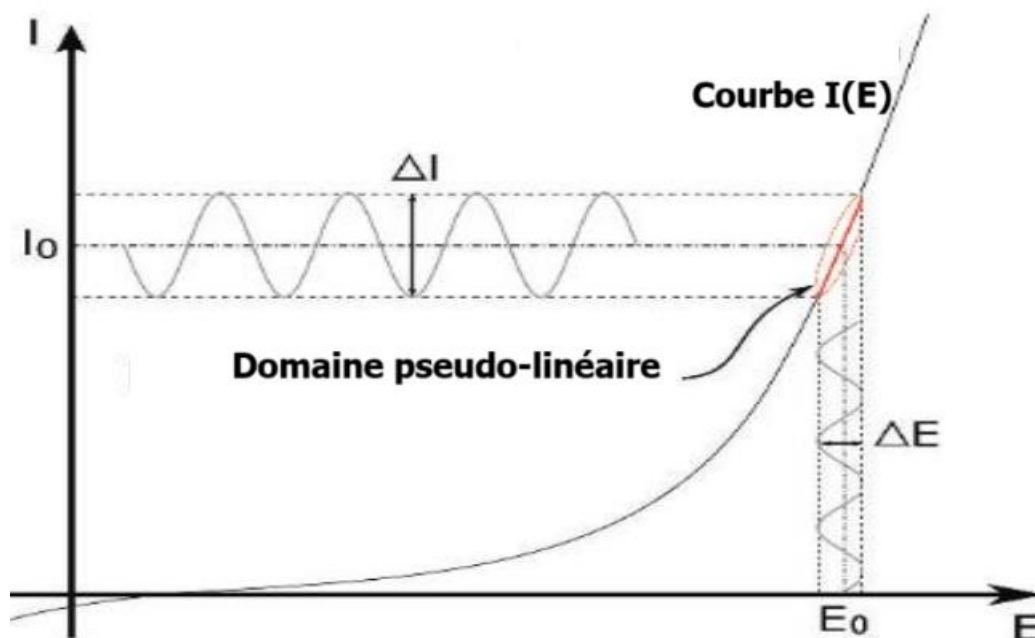


Figure 22 : Système électrochimique non linéaire soumis à un potentiel sinusoïdal

En prenant en compte ces éléments, on mesure alors l'impédance par la loi analogue de la loi d'Ohm :

$$z(\omega) = \frac{E(\omega)}{I(\omega)} = |z|e^{j\Phi} \quad \text{En Ohms } (\Omega) \quad \text{Equation 3.1}$$

Ou:

$z(\omega)$: l'impédance

$E(\omega)$: est le potentiel appliqué

$I(\omega)$: est le courant mesuré

$|z|$: est le module de l'impédance

J : est l'unité imaginaire $j^2 = -1$ (En électrochimie on utilise j plutôt que I réservé au courant électrique)

Φ : est le déphasage entre potentiel et courant

$\omega = 2\pi f$: est la pulsation (fréquence du signal)

Cette relation (Equation 3.1) prend tout son sens lorsque on exprime les grandeurs en notation complexe ce qui permet d'intégrer l'amplitude et le déphasage entre les signaux. Mathématiquement ces deux informations sont traduites par une grandeur complexe Z que l'on décompose en deux parties une partie réelle Z' correspond au phénomène de résistance et une partie imaginaire Z'' correspond au phénomène capacitifs et diffusifs. L'impédance peut être représenté sur la forme polaire ou cartésienne, en notation cartésienne on note :

$$Z(\omega) = Z' + jZ'' \quad \text{En Ohms } (\Omega) \quad \text{Equation 3.2}$$

Ou:

$z(\omega)$: l'impédance

Z' : Résistance réelle $\text{Re}(Z)$ (résistive)

Z'' : Résistance imaginaire $\text{Im}(Z)$ (réactive)

J : est l'unité imaginaire $j^2 = -1$

Cette présentation (Equation 3.2) permet de tracer diagrammes de Naquist (Z'' en fonction de Z'), ou des diagrammes de Bode (l'amplitude de Z ($|Z|$) et sa phase (Φ) en fonction de la fréquence). Ainsi, on peut définir l'impédance comme une grandeur complexe qui représente la réponse fréquentielle d'un système soumis à une perturbation sinusoïdale en prenant en compte l'amplitude entre la tension et courant, le déphasage entre les deux, et leur variations selon la fréquence.[18, 20]

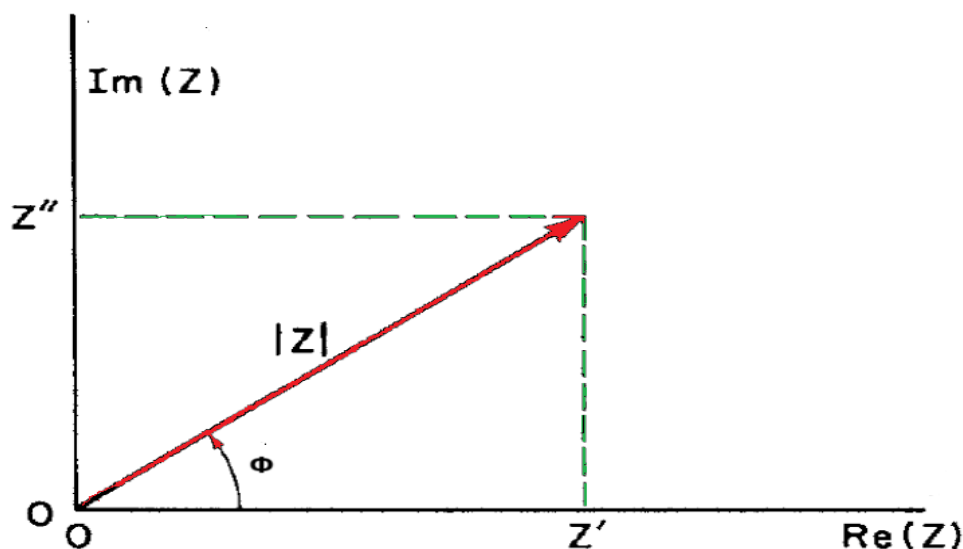


Figure 23 : Représentation d'un vecteur impédancemétrique : $\text{Im}(Z)$ en fonction de $\text{Re}(Z)$

6.2.2 Représentations graphiques de SIE

Diagramme de Nyquist et diagramme de Bode, deux représentations graphiques utilisées pour visualiser les interpréter les résultats fréquentiels d'un système électrochimique soumis à un signal d'excitation sinusoïdal. Ces deux diagrammes offrent des informations complémentaires et non concurrentes permettant ainsi de comprendre des aspects différents du comportement électrochimique du système étudié.

6.2.2.1 Diagramme de Nyquist

Le diagramme de Nyquist est la représentation la plus utilisée, il permet de visualiser les propriétés physicochimiques globales d'un système. C'est un outil privilégié pour ajuster des circuits équivalents simple pour mieux comprendre le processus électrochimique.

La représentation est obtenue en traçant la résistance imaginaire $\text{Im}(Z)$ en fonction de la résistance réelle $\text{Re}(Z)$ pour chaque fréquence appliquée. Donc chaque point du diagramme correspond à une fréquence différente même si celle-ci n'apparaît pas distinctement

sur le graphique. L'allure typique d'un diagramme de Nyquist est un demi-cercle suivi d'une droite inclinée [20, 21](Figure 24).

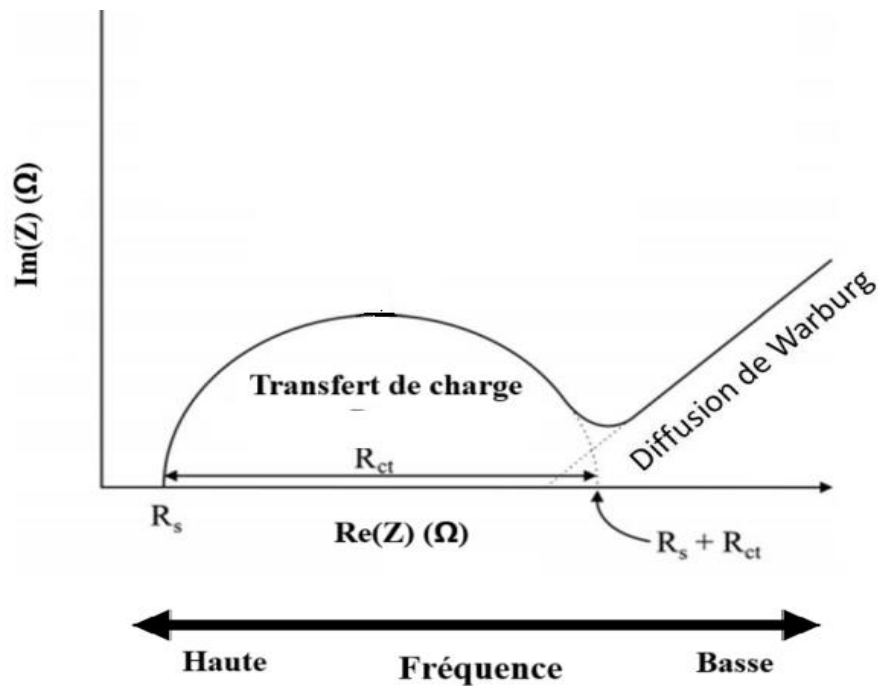


Figure 24 : Diagramme de Nyquist typique des phénomènes électrochimiques en fonction de la fréquence appliquée

La figure 24 présente un diagramme de Nyquist :

- L'axe des ordonnées correspond à la résistance imaginaire $Im(Z)$.
- L'axe des abscisses correspond à la résistance réelle $Re(Z)$.
- Le demi-cercle correspond à la résistance de transfert de charge (R_{ct}) et à la capacité double couche (C_{dl})
- la droite inclinée (45°) reflète une diffusion de type Warburg (Z_w).

En complément de diagramme présenté par la figure 24, le tableau 10 résume la correspondance entre les différents phénomènes dominants et leurs zones correspondantes sur le diagramme de Nyquist en fonction des différentes plages de fréquences. À haute fréquence, le courant alternatif change trop rapidement pour que les interfaces d'un système électrochimique puissent réagir, donc le seul composant mesurable dans ce système est la résistance de la solution (R_s). À des fréquences moyennes, le système a le temps de répondre aux oscillations de signal alternatif perturbateur, dans cette plage de fréquences, on peut observer deux processus : l'accumulation

de charge à l'interface électrode/électrolyte, qui correspond à la capacité de la double couche (C_{dl}), et la résistance de transfert de charge (R_{CT}) qui reflète le transfert d'électrons entre les espèces redox et l'électrode indiquant la présence d'une interaction entre les l'électrode (Biocapteur) et les analytes. A basse fréquence le Courant alternatif varie très lentement , ce qui laisse suffisamment de temps aux espèces chimiques pour diffuser depuis et/ou vers l'électrode. Ce comportement diffusif et souvent modélisé par l'impédance Warburg.[22]

Tableau 10 : Corrélation entre les phénomènes électrochimiques et le digramme de Nyquist en fonction des plages de fréquences appliquées dans un système étudié par SIE

Fréquence	Phénomène dominant	Élément de circuit	Zone sur Nyquist
Haute (kHz-MHz)	Résistance de solution R_s	R_s	Début de demi-cercle
Moyenne (Hz-kHz)	Transfert de charge et double couche	R_{ct} et C_{dl}	Sommet et flanc de demi-cercle
Basse (mHz-Hz)	Diffusion	Z_w	La droite de 45°

6.2.2.2 Digramme de Bode

Le diagramme de Bode (Figure 25) consiste à présenter les variations de l'amplitude (module $|z|$) et de la phase de l'impédance en fonction de la fréquence séparément, généralement sur une échelle logarithmique. Les principales caractéristiques de ce diagramme sont :

- A basse fréquence l'impédance reflète les comportements résistifs et capacitifs .
- Un haute fréquence le module $|z|$ est souvent dominé par la résistance de la solution
- L'observation d'un pic de phase indique souvent la présence d'un élément capacitif.
- La pente de la courbe du module $|z|$ Peut révéler un comportement capacitif ou diffusif typique de l'impédance de Warburg.[22, 23]

Le diagramme de Bode offre une représentation directe de l'évolution de l'impédance en fonction de la fréquence, permettant ainsi une analyse fréquentielle détaillée précieuse notamment lorsque plusieurs processus sont superposés.

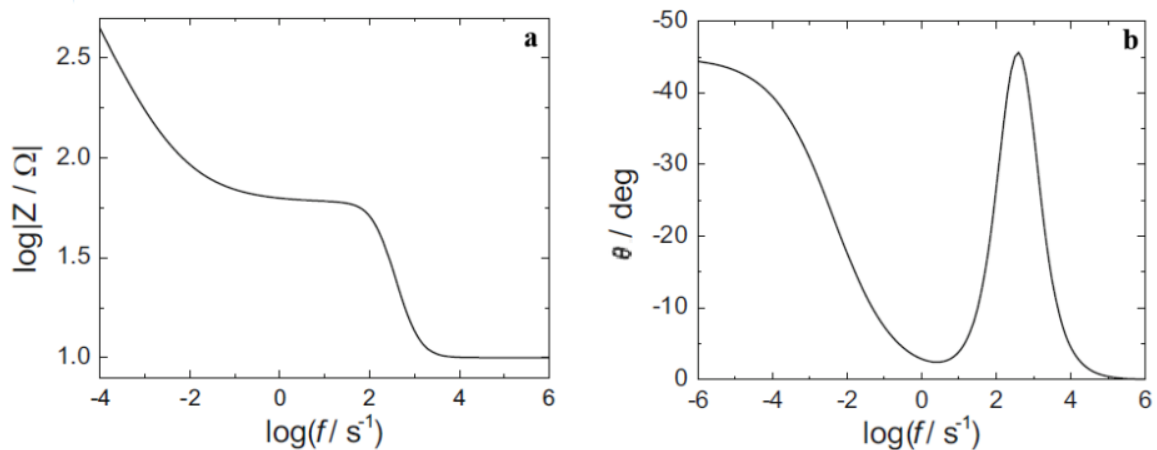


Figure 25 : Digramme de Bode du module $|z|$ (a) et la phase de l'impédance en fonction des fréquences appliquées

6.2.3 Modèles de circuits électriques équivalents

La pertinence des résultats obtenus par SIE et La validité des mesures arborent une double exigence. D'une part , elles exigent des conditions expérimentales stables afin d'assurer la cohérence et la reproductibilité pour refléter fidèlement les propriétés physicochimiques interfaciales d'un système. De l'autre part, elle requiert un choix pertinent d'un circuit électrique équivalant pour modéliser et interpréter ces résultats.

Le choix de circuit équivalent conditionne la capacité à traduire les réponses fréquentielles du système en paramètres physicochimiques interprétables, fiable et en cohérence avec le contexte expérimentale. Or, ce choix ne peut être pertinent sans une compréhension approfondie des processus électrochimiques sous-jacents et les propriétés interfaciales impliquée

Un circuit électrique est un ensemble de composants électriques standards disposés selon une architecture précise, de manière de reproduire fidèlement le comportement électrochimique d'un système, Donc tout simplement un circuit électrique équivalent est une modélisation simplifiée d'un système électrochimique réel.[24]

6.2.3.1 Circuits de Randles

En SIE le modèle le plus utilisé est le circuit de Randles, c'est un modèle classique et fondamental en électrochimie(Figure26). Il permet de modéliser les phénomènes interfaciales dominantes entre une électrode et une solution notamment les processus de transfert d'électrons

Chapitre 03 : Conception expérimentale et mise en œuvre du biocapteur électrochimique salivaire pour la détection simultanée de NT-proBNP et de cortisol : approche méthodologique

et la capacité de la double couche combinés. Ces principaux composants sont présentés par le tableau 11. Avec l'interprétation possible correspondante à chaque élément.

Le tableau présente le modèle basique de Randles , Mais il peut être ajusté selon la complexité de processus physique ou chimique de la réaction étudié notamment dans le cas des biocapteurs, la C_{dl} (Capacité de la double couche idéale) est remplacée par la CPE (Élément de phase constante) pour représenter les couches ajoutées suite à la biofonctionnalisation, afin de tenir en compte la rugosité de surface et la non idéalité de la double couche. Pour mieux comprendre le circuit de Randles il est primordial d'établir le lien direct avec le diagramme de Nyquist présenter dans la partie 6.2.2.1. de chapitre 03. L'interprétation de circuit ne peut être dissocié de l'analyse de diagramme car celui-ci permet de visualiser expérimentalement le processus électrochimique que le circuit vise à modéliser.[25]

Tableau 11 : les composants du circuit de Randles et leur interprétation dans un système électrochimique

Composant	Position dans le circuit	Interprétation physicochimique et analytique
Résistance de la solution (R_s)	Au débute de circuit, en série	Résistance ohmique de la solution, des fils...etc , indiquant là je chute de tension non liée a l'interface de l'électrode.
Capacité de double couche (C_{dl} ou CPE)	En parallèle avec la R_{ct}	Accumulation de charge à l'interface électrode/solution, reflétant l'état de la surface la polarisation et la surface active de l'électrode
Résistance de transfert de charge (R_{ct})	En parallèle avec la C_{dl} ou CPE	Barrière au transfert d'électrons lors d'une réaction redox, montrons la signalétique de la réaction électrochimique en fonction de la bio fonctionnalisation
Impédance de warburg (Z_w)	En série avec la R_{ct}	Diffusion des espèces réactives indiquant une limitation par transport de matière

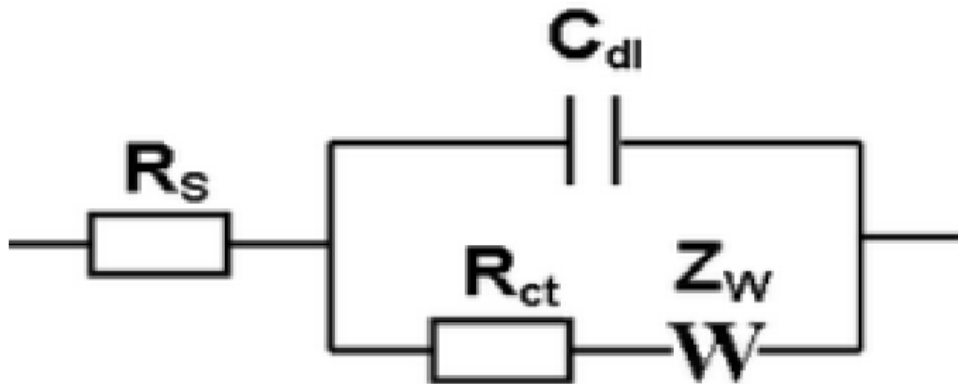


Figure 26 : Circuit de Randles équivalent au diagramme de Nyquist (figure 24)

6.2.3.2 Le fitting (Ajustement des données)

Une fois le diagramme de Nyquist est obtenu et le circuit équivalent est sélectionné, une étape cruciale s'impose : Le fitting « Appellation courante ». Cette étape consiste à ajuster mathématiquement les données expérimentales au modèle de circuit électrique équivalent afin d'extraire les paramètres caractéristiques de système électrochimique étudié. Un logiciel de calcul est utilisé (Ex. : EC-Lab, ZView, NOVA....etc) pour ajuster ce modèle (R_s , R_{ct} , C_{dl} , Z_w) aux données (Figure 27). Le logiciel fait varier les valeurs des composants du modèle jusqu'à ce que d'accord la courbe simulée corresponde au mieux à la courbe expérimentale. Généralement évaluer par 3 points :

- l'analyse visuelle : des chevauchements entre la courbe ajustée et les points expérimentaux.
- Le coefficient de corrélation R^2 proche a 1.
- L'erreur relative sur les paramètres souvent exprimés en pourcentage.

Il faut bien noter qu'un bon fitting ne suffit pas, il faut que le modèle choisi soit cohérent avec le système électrochimique, car un modèle peut être bien coller mathématiquement aux données, mais inapproprié sur le plan expérimental.[26]

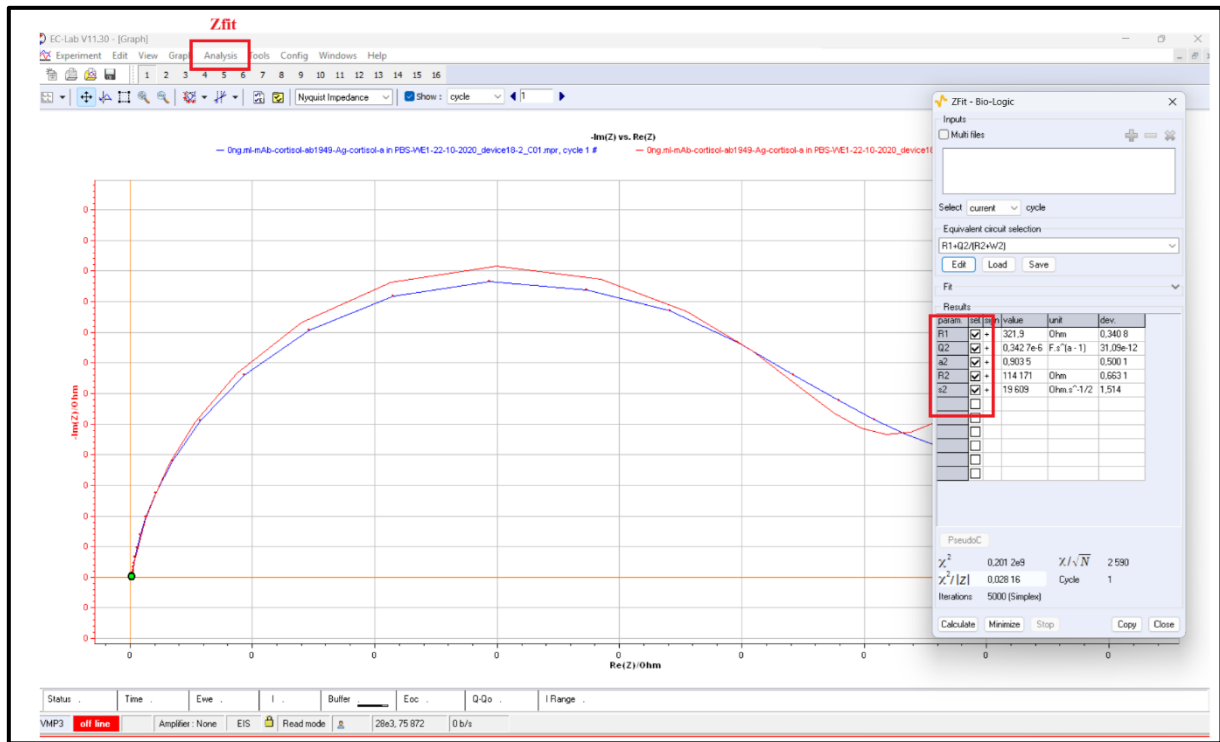


Figure 27 : Exemple d'une modélisation d'un diagramme de Nyquist utilisant le Zfit, la courbe bleue correspond aux données expérimentales, et la courbe rouge au fitting. Les valeurs extraites de modélisation sont présentés dans le tableau à droite

6.2.4 Application de SIE

La SIE est une technique robuste adaptée pour suivre les étapes de fonctionnalisation des électrodes (état nu et après modification), chaque modification de surface génère une variation de l'impédance mesurable ce qui en fait une méthode de détection et de caractérisation non destructive, sans marquage sensible et sélective.[18, 23]. Elle est largement utilisée pour l'étude et le suivi des phénomènes de corrosion, les batteries et les piles combustibles.[27]

6.3 Paramètres expérimentaux appliqués en CV et SIE

Le travail avait été mené à température ambiante $22 \pm 2^\circ\text{C}$, dans une solution redox contenant 5mM de ferricyanure ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) et ferrocyanure ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) à l'aide d'une cage de Faraday en utilisant un potentiostat VMP 3 piloté par un logiciel EC-Lab(BioLogic). Deux techniques électrochimiques ont été exploitées :

Chapitre 03 : Conception expérimentale et mise en œuvre du biocapteur électrochimique salivaire pour la détection simultanée de NT-proBNP et de cortisol : approche méthodologique

1. CV : Utilisée pour la caractérisation des électrodes avant et après fonctionnalisation .
 - Vitesse de balayage 80 mV/s
 - Fenêtre de potentiel -0,2 a +0,6 V
 - Nombre de cycles :3
2. SIE : Utilisée pour la détection simultanée des biomarqueurs NT-proBNP et Cortisol.
 - Potentiel fixe 0,228 V(vs Ag/AgCl)
 - Plage fréquentielle de 100mHz a10kHz
 - Nombre de répétition :10

La détection simultanée de NT-proBNP et de Cortisol a été effectuée dans des solutions standards (PBS), ainsi que dans la salive artificielle. La modélisation des résultats a été effectuée avec le circuit de Randles et le fitting a l'aide de Zfit de EC-Lab (BioLogic).

7 Conclusion

Dans ce chapitre on a posé les fondements méthodologiques essentiels de la conception et de la mise en œuvre d'un biocapteur électrochimique salivaire pour une détection simultanée des biomarqueurs cardiaques, le NT-pro BNP et le cortisol. L'approche méthodologique a été détaillé avec rigueur depuis la préparation des solutions jusqu'à la biofonctionnalisation de la surface de capteurs, les réactions chimiques impliqués ont été méticuleusement décrite afin de garantir la fiabilité et la reproductibilité du biocapteur développé. Enfin les deux techniques électrochimiques utilisées ont été expliquées et intégrées de manière cohérente au protocole global démontrant leur pertinence pour le suivi analytique. Cette approche méthodique constitue une base essentielle pour la conception et l'optimisation future des biocapteurs appliquer dans des contextes médicaux. La validation de notre approche expérimentale c'est l'évaluation d'où la performance analytique seront discutées en détail dans le chapitre suivant.

8 Références

- [1] P. Mehrotra, "Biosensors and their applications—A review," *Journal of oral biology and craniofacial research*, vol. 6, pp. 153-159, 2016.
- [2] P. M. McKie and J. C. Burnett, "NT-proBNP: the gold standard biomarker in heart failure," vol. 68, ed: American College of Cardiology Foundation Washington, DC, 2016, pp. 2437-2439.
- [3] G. I. Güder, J. Bauersachs, S. Frantz, D. Weismann, B. Allolio, G. Ertl, *et al.*, "Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure," *Circulation*, vol. 115, pp. 1754-1761, 2007.
- [4] F. Omran, I. Kyrou, F. Osman, V. G. Lim, H. S. Randeva, and K. Chatha, "Cardiovascular biomarkers: lessons of the past and prospects for the future," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, p. 5680, 2022.
- [5] J. Pytko-Polonczyk, A. Jakubik, A. Przeklasa-Bierowiec, and B. Muszynska, "Artificial saliva and its use in biological experiments," *J. Physiol. Pharmacol*, vol. 68, pp. 807-813, 2017.
- [6] M. Levine, A. Aguirre, M. Hatton, and L. Tabak, "Artificial salivas: present and future," *Journal of dental research*, vol. 66, pp. 693-698, 1987.
- [7] C. Tlili, N. V. Myung, V. Shetty, and A. Mulchandani, "Label-free, chemiresistor immunosensor for stress biomarker cortisol in saliva," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 4382-4386, 2011.
- [8] B. E. Saxberg and B. Kowalski, "Generalized standard addition method," *Analytical Chemistry*, vol. 51, pp. 1031-1038, 1979.
- [9] M. Conrad, P. Fechner, G. Proll, and G. Gauglitz, "(R) evolution of the Standard Addition Procedure for Immunoassays," *Biosensors*, vol. 13, p. 849, 2023.
- [10] D. Hetemi, V. Noël, and J. Pinson, "Grafting of diazonium salts on surfaces: Application to biosensors," *Biosensors*, vol. 10, p. 4, 2020.
- [11] J. Billon, "Formation, par réduction de sels de diazonium, de couches organiques mixtes contrôlées en épaisseur et en composition," Université d'Angers, 2023.
- [12] N. C. f. B. Information, "PubChem compound summary," ed: National Center for Biotechnology Information Bethesda, MD, USA, 2021.
- [13] M. M. Chehimi, *Aryl diazonium salts: new coupling agents in polymer and surface science*: John Wiley & Sons, 2012.
- [14] M. J. Fischer, "Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach," in *Surface plasmon resonance: methods and protocols*, ed: Springer, 2010, pp. 55-73.
- [15] H. Yamada, K. Yoshii, M. Asahi, M. Chiku, and Y. Kitazumi, "Cyclic voltammetry part 1: fundamentals," *Electrochemistry*, vol. 90, pp. 102005-102005, 2022.
- [16] P. Chooto and P. Chooto, "Cyclic voltammetry and its applications," *Voltammetry. IntechOpen*, p. 1, 2019.
- [17] A. C. Lazanas and M. I. Prodromidis, "Electrochemical impedance spectroscopy— a tutorial," *ACS measurement science au*, vol. 3, pp. 162-193, 2023.
- [18] B.-Y. Chang and S.-M. Park, "Electrochemical impedance spectroscopy," *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 3, pp. 207-229, 2010.
- [19] G. Instruments, "Basics of electrochemical impedance spectroscopy," *G. instruments, complex impedance in corrosion*, vol. 1, pp. 1-30, 2007.
- [20] C. G. Zoski, *Handbook of electrochemistry*: Elsevier, 2006.
- [21] J. Huang, Z. Li, B. Y. Liaw, and J. Zhang, "Graphical analysis of electrochemical impedance spectroscopy data in Bode and Nyquist representations," *Journal of Power Sources*, vol. 309, pp. 82-98, 2016.
- [22] G. Walter, "A review of impedance plot methods used for corrosion performance analysis of painted metals," *Corrosion science*, vol. 26, pp. 681-703, 1986.
- [23] A. Lasia, "Electrochemical impedance spectroscopy and its applications," in *Modern aspects of electrochemistry*, ed: Springer, 2002, pp. 143-248.

- [24] X.-Z. Yuan, C. Song, H. Wang, and J. Zhang, "EIS equivalent circuits," *Electrochemical Impedance Spectroscopy in PEM Fuel Cells: Fundamentals and Applications*, pp. 139-192, 2010.
- [25] S. M. M. Alavi, A. Mahdi, S. J. Payne, and D. A. Howey, "Identifiability of generalized randles circuit models," *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, vol. 25, pp. 2112-2120, 2016.
- [26] A. Schwake, H. Geuking, and K. Cammann, "Application of a new graphical fitting approach for data analysis in electrochemical impedance spectroscopy," *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, vol. 10, pp. 1026-1029, 1998.
- [27] I. Obot, I. B. Onyeachu, A. Zeino, and S. Umoren, "Electrochemical noise (EN) technique: review of recent practical applications to corrosion electrochemistry research," *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 33, pp. 1453-1496, 2019.

Chapitre 04 :

**Evaluation de la performance analytique
des biocapteurs élaborés pour la détection
de NT pro BNP et Cortisol dans la salive**

Chapitre 4 : Evaluation de la performance analytique des biocapteurs élaborés pour la détection de NT pro BNP et Cortisol dans la salive

1 Introduction

Après avoir détaillé dans le chapitre précédent l'ensemble des étapes et l'approche expérimentales ayant permis la biofonctionnalisation et la mise en œuvre de notre biocapteur salivaire. Ce chapitre se concentre sur l'analyse approfondie des résultats obtenus afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité de notre biocapteur développé. L'objectif est d'évaluer et démontrer la validité de notre approche de fonctionnalisation d'un côté, et le fonctionnement de ce biocapteur et son performance pour une détection simultanée de NT-proBNP et Cortisol dans un fluide complexe tel que la salive de l'autre côté. Et ce, on mimant au plus près l'environnement clinique réel, afin de répondre aux exigences biomédicales actuelles et des standards analytiques. La validation de notre approche a été effectuée dans un premier temps dans une solution tampon PBS, ensuite, en second temps dans la salive artificielle.

2 Synthèse globale de l'approche méthodologique de biofonctionnalisation du biocapteur

Comme mentionné dans la section 3.2. de chapitre 3, notre plateforme de détection élaboré sur un substrat en silicium de dimensions 7 mm × 4 mm comprennent quatre électrodes de travail (WE) en or, deux électrodes de référence (RE) et une électrode auxiliaire (CE) en platine située au centre du dispositif. Pour assurer sa fixation mécanique stable sur la carte électronique (PCB), elle a été fixé solidement à l'aide d'une résine époxy bi-composant (Epo-Tek H70E-2LC, Epoxy Technology), les zones de connexions et les pistes conductrices ont été connectées en or de la carte par câblage ultrasonique avec un fil d'aluminium de 25 µm de diamètre, à l'aide d'un système de wire-bonding automatisé (Kulicke & Soffa 4523A).et enfin pour une bonne isolation de notre plateforme, une encapsulation avec la même résine était mis en place.(Figure 28).

La biofonctionnalisation du biocapteur a été effectuée selon le protocole détaillé dans le chapitre précédant et résumé avec le schéma de la figure 29. les principales étapes de biofonctionnalisation sont :

1. Formation sel de diazonium 4-APA
2. Electrodeposition du sel de diazonium.

Chapitre 04 : Evaluation de la performance analytique des biocapteurs élaborés pour la détection de NT pro BNP et Cortisol dans la salive

3. Activation EDC/NHS des groupements carboxyliques(-COOH).
4. Immobilisation des anticorps
5. Blocage des sites actifs (groupements carboxyliques résiduels).

Tous les paramètres appliqués durant ce travail ont été rigoureusement optimisés afin d'assurer la fiabilité et la sensibilité de notre approche. Les résultats de l'optimisation feront l'objet d'une prochaine publication.

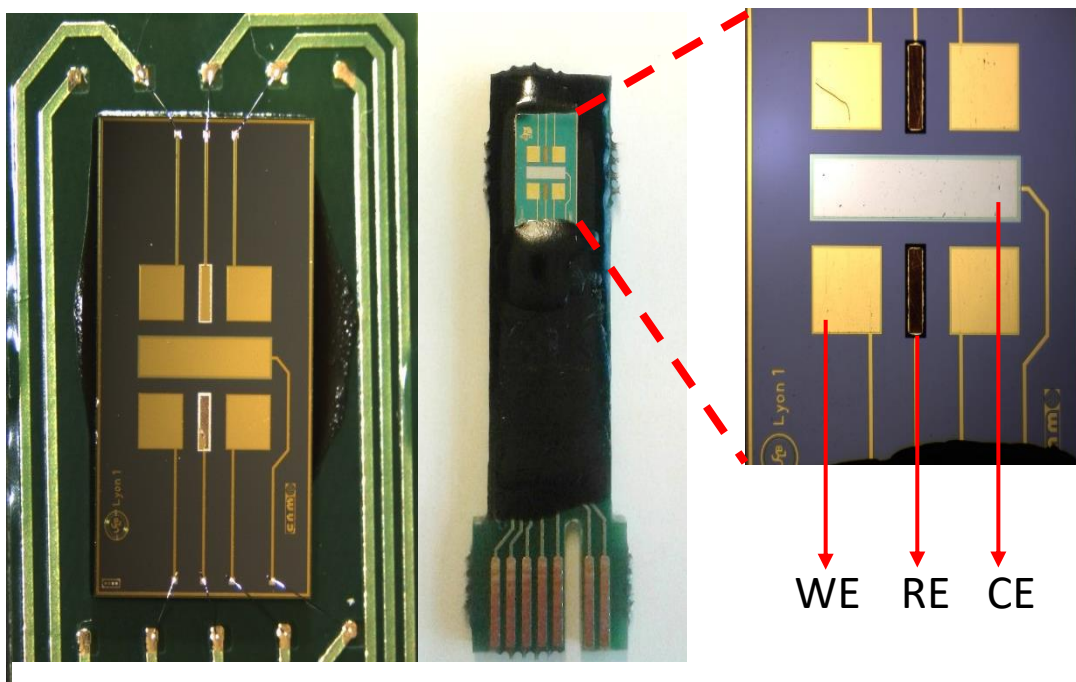


Figure 28 : Plateforme électrochimique de biocapteur

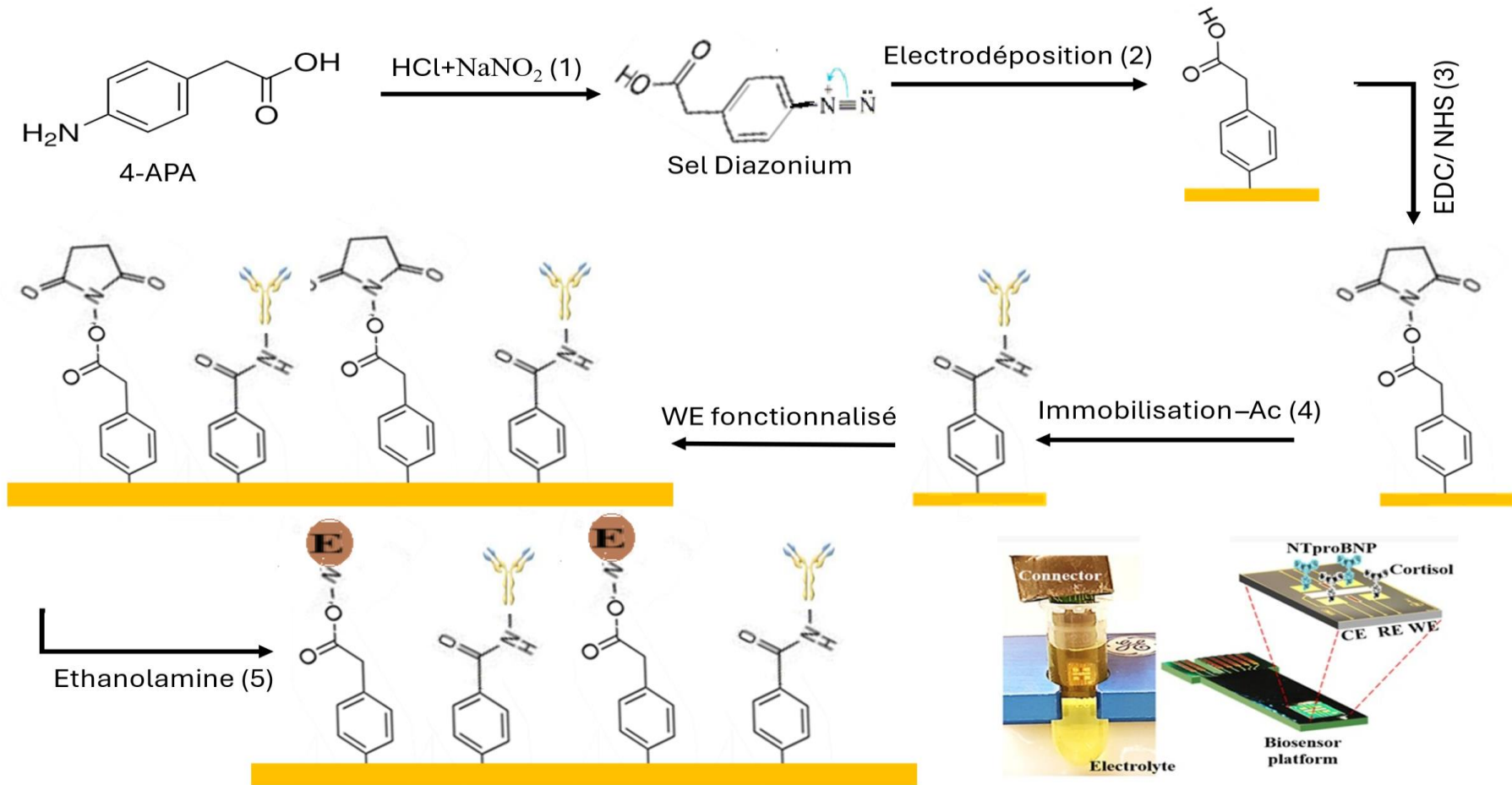


Figure 29 : Synthèse globale de l'approche méthodologique de biofonctionnalisation du biocapteur

3 Caractérisation électrochimique de biocapteur

3.1 Electrodeposition de 4-APA

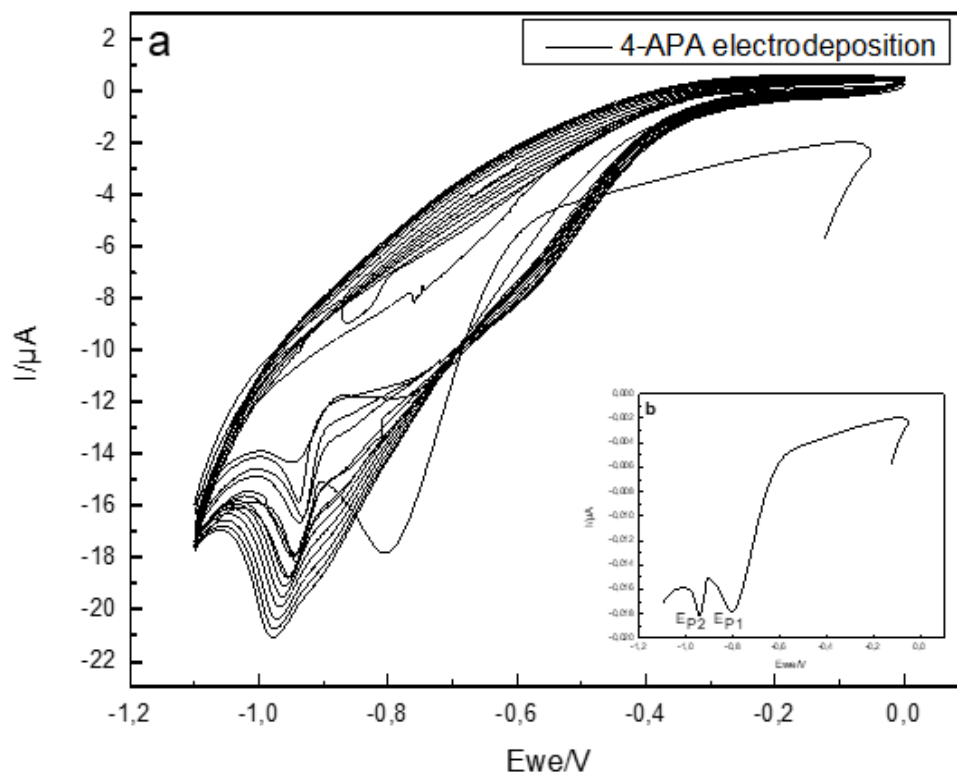


Figure 30 :(a) Voltammogramme de l'électrodeposition de 4-APA (b) Le premier cycle de l'électrodeposition (Fenêtre de potentiel ; 0 V to -1.1 V, Vitesse de balayage = 80 mV/s).

La figure 30 présente le voltammogramme obtenu lors de l'électrodeposition de 4-APA, dans une fenêtre de potentiel de 0V à -1,1V avec une vitesse de balayage de 80 mV/s, 15 cycles ont été appliqués selon le protocole mentionné dans la section 5.2.2 de chapitre 03.

A une vitesse de 80 mV/s, les processus dominants sont le transfert d'électrons et la diffusion, favorisant l'apparition des pics vers des potentiels plus négatifs avec des courants initiaux élevés. Le voltammogramme obtenu met en évidence deux pics cathodiques successifs correspondant à deux réductions distinctes. Le premier pic observé à -0,8V correspond à une réduction initiale de sels de diazonium 4-APA, conduisant ainsi à la formation d'un radical amorçant la formation d'un film sur la surface de l'électrode, le deuxième pic plus négatif -0,96 V peut correspondre à une poursuite d'un phénomène de polymérisation ou de croissance du

film sur l'électrode de travail partiellement recouverte. L'observation des deux pics successives peut être interpréter par la présence d'un processus séquentiel ou la première réduction rend possible la deuxième. Au fil des cycles (15cycles), une diminution progressive de l'intensité de ces pics, indiquant une passivation complète ou partielle de l'électrode, selon la qualité de dépôt. Cette passivation est due à la formation d'une couche isolante qui empêche l'accès des espèces réduites (4-APA) a la surface de l'électrode.

Le voltammogramme observé correspond à ceux décrites dans la littérature pour des dépôts similaires validant ainsi la de notre protocole de préparation et de l'électrodéposition.[1, 2]

3.2 Caractérisation par la voltampérométrie cyclique (CV)

Afin de valider la modifications électrochimique de la surface de notre électrode de travail et évaluer la qualité de la couche formée , une caractérisation par voltammétrie cyclique (CV) a été réalisée avant et après l'électrodéposition de 4-APA. Les mesures ont été conduites dans une solution électrolytiques de 5mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (Couple redox) dissous dans du PBS, en balayant le potentiel de -0,2V a+0,6 V à une vitesse de 80 mV/s

La figue 31 montre le résultat de cette caractérisation, le voltammogramme noir (a) obtenu avec une électrode en or nue préalablement nettoyé, on observe les deux pics du couple redox $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ bien défini et symétrique à 0,192 V et 0,264V correspond au pic d'oxydation et de réduction respectivement. Le rapport des courants de pic anodique et cathodique est environ 1, et la séparation de potentiel anodique/cathodique caractéristique traduisent un transfert d'électrons rapide entre la solution et la surface de l'électrode témoignant une surface propre et électroactive. Sur le deuxième voltammogramme en rouge (b) obtenu après l'électrodéposition de 4-APA, une disparition complète des pics d'oxydoréduction a été observé soulignant une suppression quasi-totale du courant faradique. Ce résultat indique la présence d'un film organique isolant (non conducteur) agissent comme une barrière recouvrant la surface de l'électrode. Cela confirme la réussite de notre approche de l'électrodéposition de 4-APA sur la surface de l'électrode en or et l'efficacité de la passivation électrochimique[3]

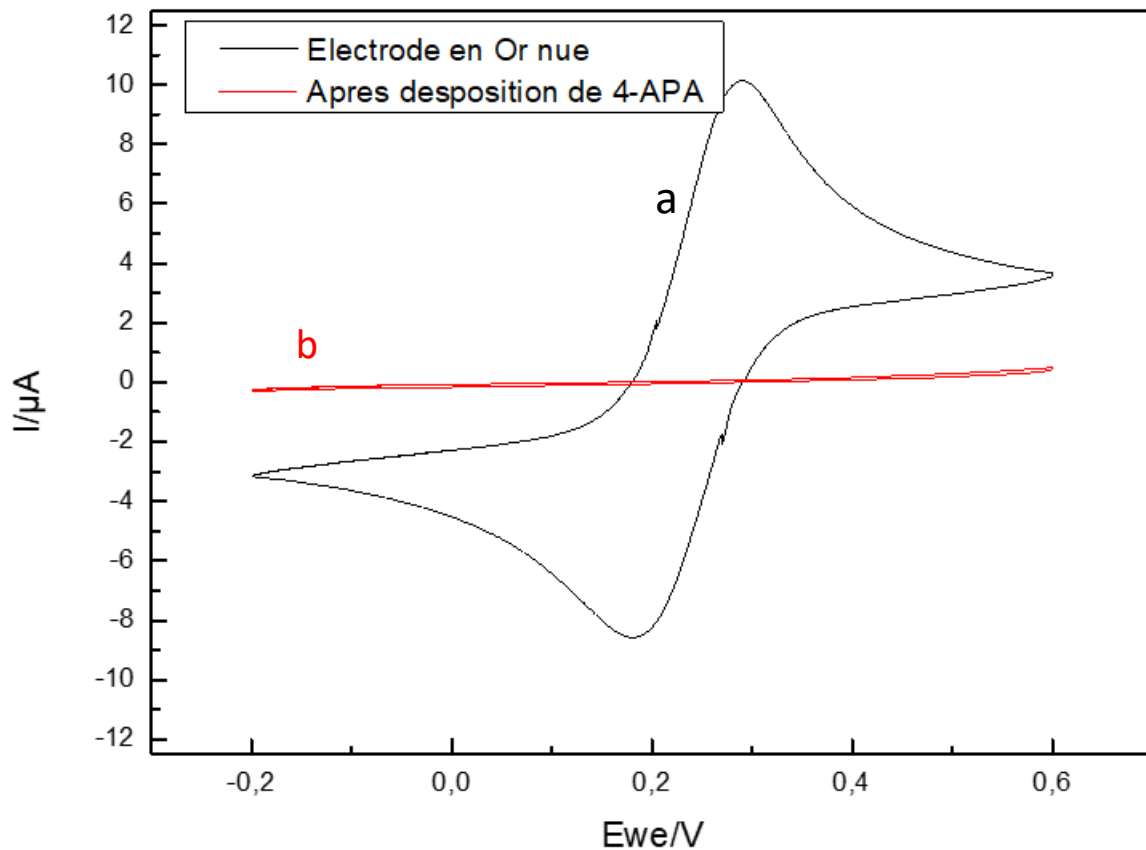


Figure 31 : Voltammogramme de caractérisation avant (a) et après électrodéposition (b) de 4-APA Vitesse de balayage 80 mV/s , Fenêtre de potentiel -0,2 a +0,6 V.

3.3 Caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

Une validation complémentaire du dépôt de 4-APA a été réalisée par la technique spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) figure 32. La caractérisation a été réalisée dans la même solution contenant le couple redox, 5mM de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (Couple redox) dissous dans du PBS, en appliquant un potentiel fixe 0,228 V(vs Ag/AgCl) sur une plage fréquentielle de 100mHz a10kHz.

Avant le dépôt, l'électrode en or nue présente un diagramme de Nyquist (noir) typique d'une interfaces électrochimique active et perméable, un demi-cercle typique à haute fréquence correspond à la résistance de transfert d'électrons (R_{ct}), suivi par une droite incliné à basse fréquence, correspond à la diffusion de Warburg

Après l'électrodéposition du 4-APA, le rayon du demi-cercle augmente fortement (diagramme rouge), traduisant une augmentation significative de (R_{ct}). Cette augmentation est une confirmation directe de la formation d'une couche isolante, qui inhibe le transfert d'électrons entre la solution et la surface de l'électrode. Cette allure est cohérente avec la passivation observée par CV lors de la cartérisation précédente.

Un troisième demi-cercle apparait dans le digramme (Bleu) avec une augmentation supplémentaire de la résistance de transfert d'électrons (R_{ct}), confirmant l'ajout d'une couche non conductrice, cette augmentation de R_{ct} est le résultat direct de l'immobilisation des anticorps sur la couche électrodéposée de 4-APA, qui renforcent l'obstruction du transfert d'électrons.[4]

La bonne visibilité de ce troisième demi-cercle valide non seulement le succès de l'électrodéposition de 4-APA, mais aussi la réussite et l'efficacité de l'ancrage covalent des anticorps a la surface de l'électrode modifié en passant par l'activation (EDC/NHS)

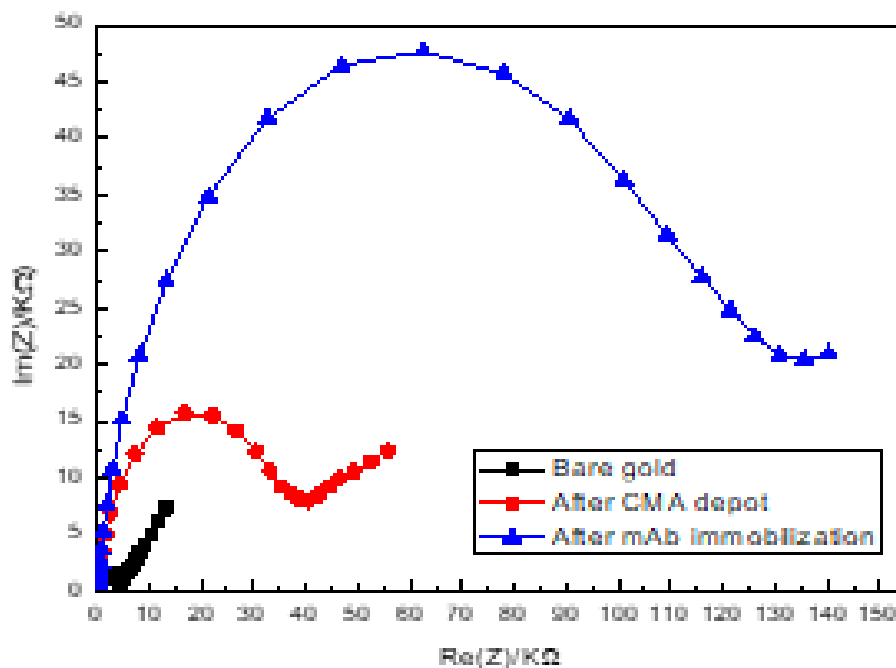


Figure 32 : Diagramme de Nyquist avant (noir), après (rouge) l'électrodéposition de 4-APA, et après immobilisation des anticorps (Bleu).

3.4 Caractérisation microscopique

L'analyse visuelle microscopique des électrodes de travail avant et après électrodéposition de 4-APA montre une modifications visible de la surface de l'électrode, avant dépôt (photo a) les 4 électrodes de travail (WE) apparaissent propres et homogènes traduisant un état de surface favorable pour la biofonctionnalisation.

Après l'électrodéposition de 4-APA (Photo b), un changement nettement visible de la surface, on peut constater la présence d'un dépôt doré/cuivré, correspond à la couche formée par l'électrodéposition de 4-APA, la couche semble avoir un aspect granuleux non uniformes témoignant une épaisseur non homogène de la couche formée, ou des effets de micro-agrégation exigent éventuellement une optimisation.

Le dépôt observé est localisé principalement sur la partie conductrice (4 microélectrodes en Or), l'aspect de la zone périphérique n'a pas changé confirmant que le dépôt s'est produit uniquement sur les zones conductrices ciblées par la voltammétrie cyclique.

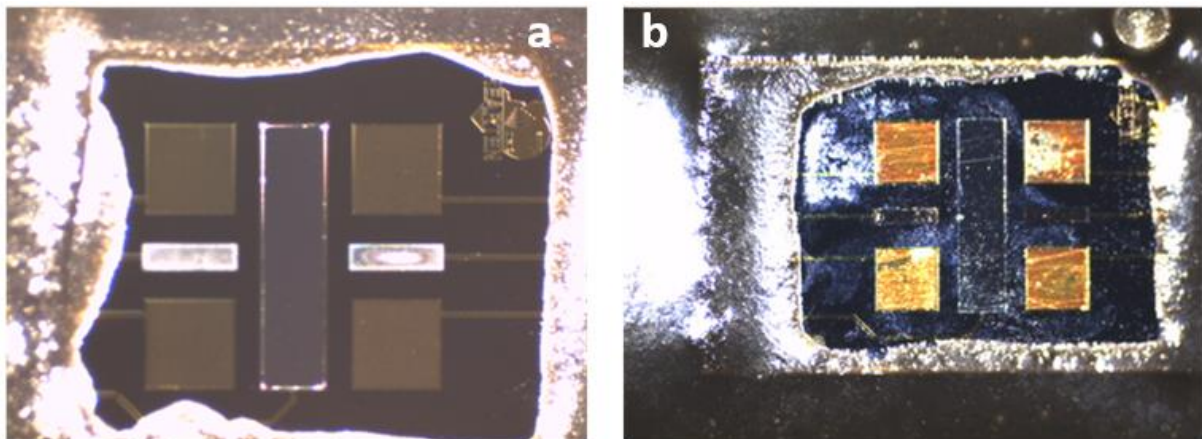


Figure 33 : Photo de la plateforme des électrodes avant (a) et après (b) l'électrodéposition de 4-APA

4 Validation de la détection des biomarqueurs par spectroscopie d'impédance électrochimique dans une solution tapon PBS

La fiabilité analytique et la reproductibilité de notre prototype a été testée par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE). Le principe de cette technique a été détaillé dans la section 6.2 du chapitre 03. Les mesures ont été réalisées conformément aux paramètres préalablement définis (voir la section 6.3 chapitre 03),

Chapitre 04 : Evaluation de la performance analytique des biocapteurs élaborés pour la détection de NT pro BNP et Cortisol dans la salive

Les diagrammes de Nyquist obtenus ont été modélisé à l'aide du circuit de Randles (Figure 26) dont le principe décrit ci-dessus (Voir la section 6.2.3.1 Chapitre 03) permettant ainsi d'extraire les valeurs de la résistance de transfert au transfert de charge (R_{ct}).

Étant donné que notre étude porte sur la détection simultanée de NT-proBNP et du Cortisol, et pour éviter les répétitions inutiles tout en garantissant une lecture cohérente et claire des résultats, l'interprétation de ces derniers suivra par convention un ordre constant les données relatives au NT-proBNP seront toujours présentées en premier suivi de celle relative au cortisol. Ainsi lorsque deux valeurs sont mentionnées successivement la première correspond systématiquement au NT-proBNP (en pg/mL) et la deuxième au Cortisol (en ng/mL).

4.1 Détection simultanée de NT-proBNP et de Cortisol.

En premier temps, afin d'exclure toute interférence croisée entre le NT-proBNP et le Cortisol, une détection séparée de chaque biomarqueur en l'absence de l'autre a été effectuée dans le PBS. Cette étape consiste à vérifier la spécificité et la réponse de notre biocapteur, les résultats obtenus sont présentés par **la figure 34 (A) et (B)** montre respectivement les digrammes de Nyquist obtenus de la détection de NT-proBNP et de Cortisol séparément.

Le diagramme de Nyquist obtenu montre clairement la capacité du capteur à détecter chacun des biomarqueurs. La première courbe (Noir) du diagramme correspond au capteur avec seulement l'anticorps immobilisée donc le demi-cercle observé correspond à la concentration 0pg/mL et 0ng/mL de notre antigènes NT-proBNP et Cortisol respectivement.

On observe un déplacement de la courbe (Rouge) et une augmentation du diamètre du demi-cercle, après la première incubation dans une solution de 0,03 pg/mL et 0,02 ng/mL de notre antigènes NT-proBNP et Cortisol respectivement, indiquant une augmentation de la résistance de transfert de charge (R_{ct}). Cette augmentation confirme l'interaction spécifique entre le biomarqueur et son anticorps. A mesure que la concentration augmente (0,06 ; 0,1 ; 0,3 ; 0,6 ; 0,9 pg/mL) et (0,04 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ng/mL) de NT-proBNP et du Cortisol respectivement, on observe une élévation progressive du diamètre du demi-cercle, reflétant une augmentation proportionnelle de la résistance de transfert de charge (R_{ct}) à l'interface de l'électrode, et confirmant la capacité analytique quantitative de notre prototype.[5]

En deuxième temps, après la validation de la détection séparée (Dans l'absence de l'autre biomarqueur), l'approche de détection simultanée a été mise en place, en fonctionnalisant uniquement deux électrodes de travail (WE) à la fois, comme il a été mentionnées dans le chapitre 03. La même procédure de fonctionnalisation et de mesures avec SIE a été appliquée,

mais cette fois dans la présence des deux biomarqueur en semble. Les résultats obtenus sont présenté par **la figure 34 (C) et (D)** , On observe le même comportement électrochimique, une corrélation entre l'augmentation des concentrations des biomarqueurs et l'augmentation de la résistance de transfert de charge, confirmant une autre fois la reconnaissance spécifique entre les biomarqueurs cibles (NT-proBNP et le Cortisol) et leur anticorps spécifiques. Et validant la pertinence de notre approche de détection simultanée des deux biomarqueurs cardiaques.[6]

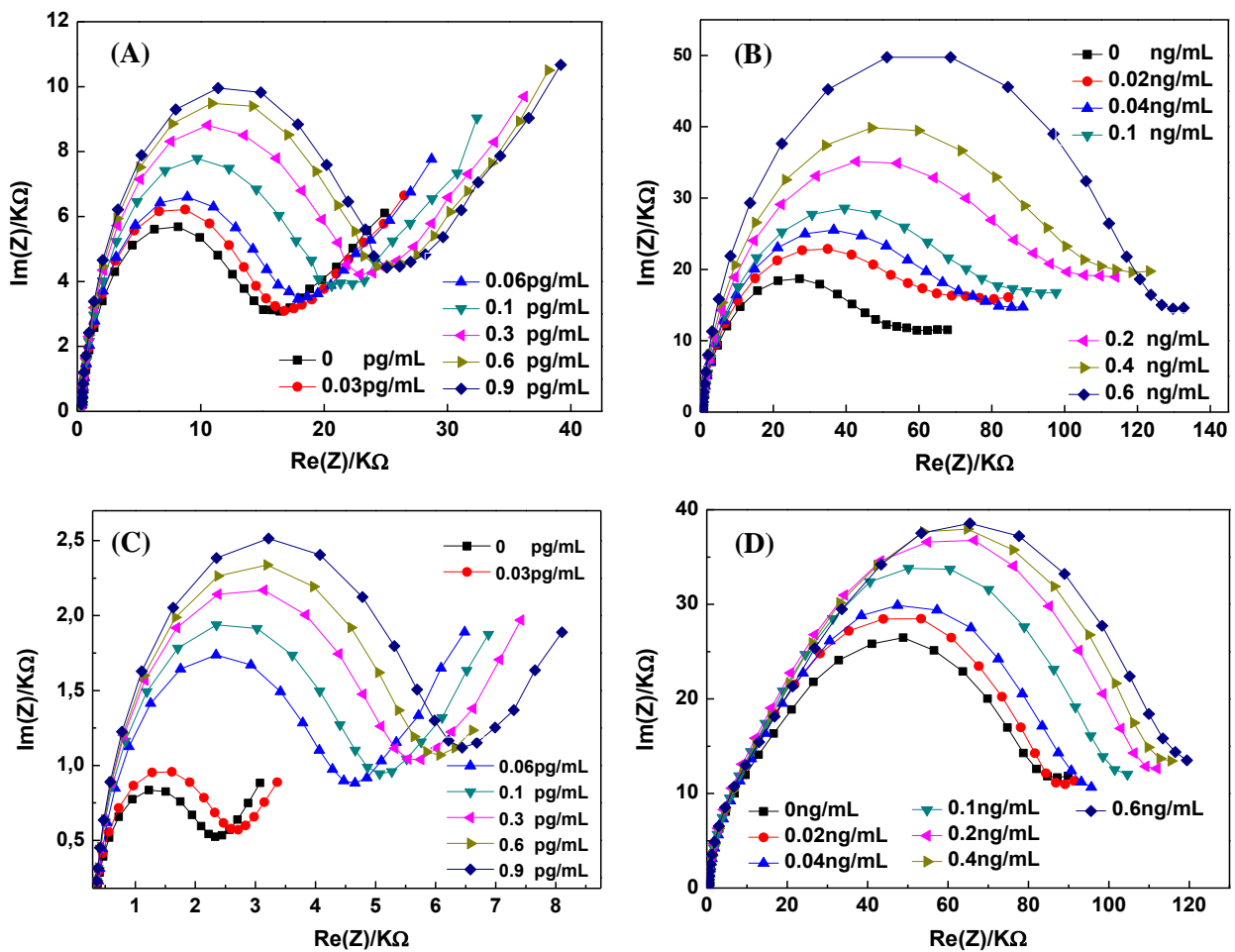


Figure 34 ; Diagrammes de Nyquist a différentes concentrations des biomarqueurs cibles préparées dans le PBS a 5 mM of K3[Fe(CN)6]/ K4[Fe(CN)6] (A) EIS détection de NT-proBNP dans l'absence de Cortisol, (B) EIS détection de Cortisol dans l'absences de NT-proBNP ; (C) EIS détection de NT-proBNP en présence de Cortisol ; (D) EIS détection de Cortisol en présence de NT-proBNP

L'interprétation des résultats de SIE obtenus a été réalisé à l'aide du circuit de Randles (Figure 26) en effectuant un fitting (modélisation) avec Zfit du logiciel EcLab pour extraire la résistance (R_{ct}), la grandeur étudiée dans ces mesures est la variations relative de R_{ct} en fonction du concentrations [7] :

$$\frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}} = \frac{R_{ct}(\text{Detction biomarqueur}) - R_{ct}(\text{Anticorps})}{R_{ct}(\text{Anticorps})}$$

Le diagramme en bâtons présentés par la **figure 35** montre la sensibilité du biocapteur en termes de variations de la résistance du transfert de charges $\frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}}$ en fonctions de différentes concentrations de NT-proBNP(en pg/mL) et du Cortisol(en ng/mL) selon qu'ils soient détectés seuls (**Figure 35 A**) ou en présence de l'autre biomarqueur (**Figure 35B**).

La **figure 35 (A)** présente la sensibilité de détection séparée de chaque biomarqueur , on observe une bonne sensibilité traduite par une augmentation de la variations électrochimique $\frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}}$ d'une manière croissante en fonction de la concentrations pour les deux biomarqueurs. Notamment le cortisol qui génère une réponse plus élevée pour le même niveau de concentrations équivalente de NT-proBNP. Cette déférence est probablement le résultat d'une reconnaissance anticorps-antigène plus efficace, ou une fonctionnalisation plus efficaces de la surface de l'électrode de travail.

La deuxième **figure 35 (B)** présente la sensibilité de biocapteur en conditions de détection multiplexée (Simultanée), en présence des biomarqueurs aux même temps. La sensibilité de NT-proBNP reste élevée indiquant une très bonne sélectivité même en présence de cortisol confirmant l'absence d'une interférence notable, néanmoins une forte baisse de la sensibilité du cortisol suggère soit une compétition à la surface du biocapteur, soit une configuration spatiale favorise la fixation du NT-proBNP et masque les site de reconnaissance du Cortisol

Ces résultats confirment l'absence de l'interférence croisée entre le NT-proBNP et le Cortisol.et mettent en lumière la nécessité d'optimiser la configuration spatiale de notre biocapteur, ou/et ajuster les concentrations (Densité) des anticorps pour une détection équilibrée.

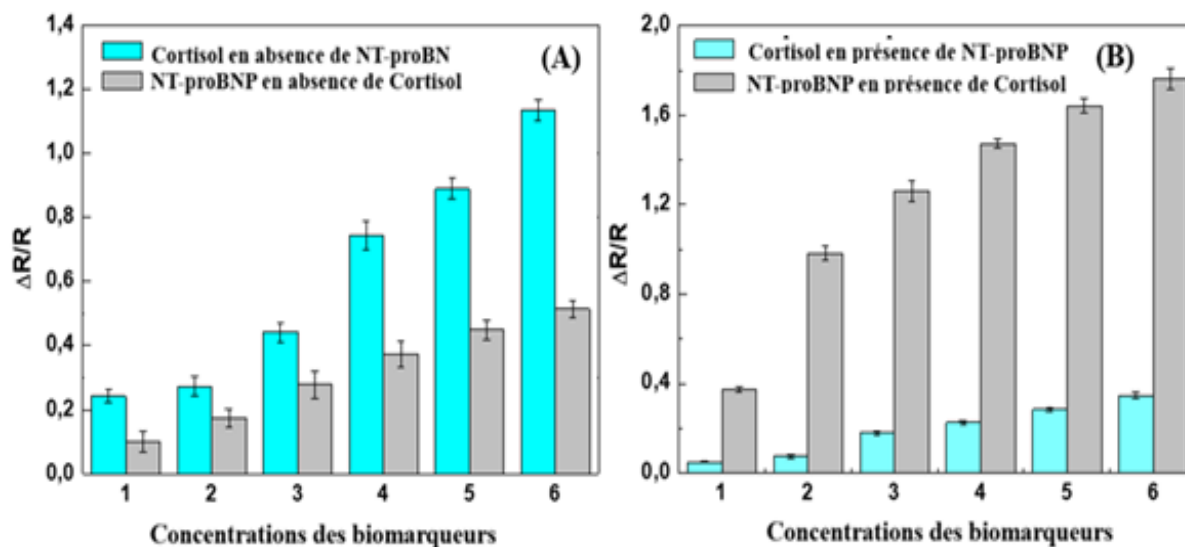


Figure 35 : (A) Sensibilité de biocapteur pour la détection séparée de NT-proBNP et Cortisol (B) Sensibilité de biocapteur pour la détection simultanée de NT-proBNP et Cortisol

4.2 Etude de la sélectivité de biocapteur en présence des interférents biologiques

Dans le but d'évaluer la sélectivité de prototype développé davantage, la détection simultanée de NT-proBNP et de cortisol a été répétée en présence d'autres interférents biologiques potentiels souvent trouvés dans les matrices biologiques (Sang, salive,...etc.). Les résultats sont présentés par la **figure 36 (A) et 36 (B)** pour NT-proBNP et Cortisol respectivement en présence de IL-10 et TNF- α (Voir l'annexe 1et 2). On observe clairement que le biocapteur conserve le même comportement électrochimique, une réponse élevée et spécifique pour les deux biomarqueurs cibles NT-proBNP et Cortisol. Tandis que aucune augmentation significative de Rct n'a été observée pour l' IL-10 et TNF- α , témoignant une absence de reconnaissance moléculaire non spécifique avec les anticorps immobilisés. les signaux obtenus restent faible est proche de la lignes de base.[8]

Ces résultats démontre la forte sélectivité de notre biocapteur et démontre qu'il est capable d'interagir d'une manière spécifiques avec ses molécules cibles même en présence dans un milieu complexe.. Ces résultats encourageante constituent une étape déterminante, nous permettant d'exploiter un niveau supérieur de complexité : l'évaluation de notre biocapteur dans une matrice encore plus complexe représentative des conditions réelles, telle que la salive artificielle.

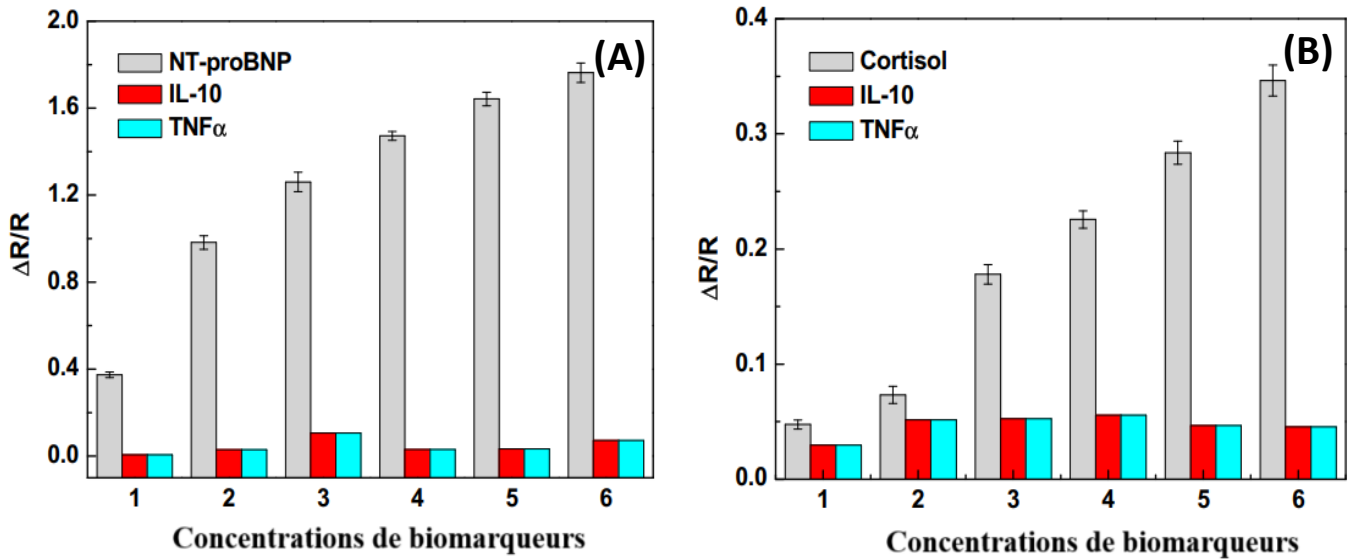


Figure 36 : Evaluation de la Sélectivité du biocapteurs en présence d'interférons biologiques IL-10 et TNF- α dans le PBS

5 Validation de la détection des biomarqueurs par spectroscopie d'impédance électrochimique dans la salive artificielle humaine (SAH)

5.1 Evaluation de l'effet de la matrice salivaire et son impact sur la détection

L'évaluation de l'effet de la matrice biologique non spécifique sur notre biocapteur est une étape cruciale pour affirmer la stabilité et la spécificité du biocapteur dans un milieu complexe.

Le principe consiste à incuber le biocapteur fonctionnalisé plusieurs fois dans la salive artificielle (SA) en absence de biomarqueur (NT-proBNP et Cortisol), et mesurer la réponse avec SIE.[9] **La figure 37** montre les résultats obtenus après chaque incubation. Le premier diagramme de Nyquist (Noir) correspond au biocapteur fonctionnalisé avant incubation montre une faible R_{ct} reflété par le petit diamètre de demi-cercle.

Dès la première incubation dans la salive artificielle (SA) on observe une augmentation de R_{ct} qui correspond à l'adsorption non spécifiques des composants de la matrice salivaire (Sels, protéines...etc.) sur la surface du biocapteur. L'augmentation continue et au bout de la quatrième incubation , on observe que elle se stabilise, et les diagrammes superposent indiquant que l'adsorption a atteint un plateau, donc la surface de l'électrode est saturé par les composants de la SA, et aucune augmentions considérable ne se produira. Cette étape de pré-conditionnement du biocapteur est importante car elle permet d'évaluer l' effet da la matrice et

l'éliminer par la suite pour réduire les faux positifs s'assurer que toute variation ultérieure de R_{ct} correspond à l'interaction spécifique entre le biomarqueur et son anticorps spécifique[5]

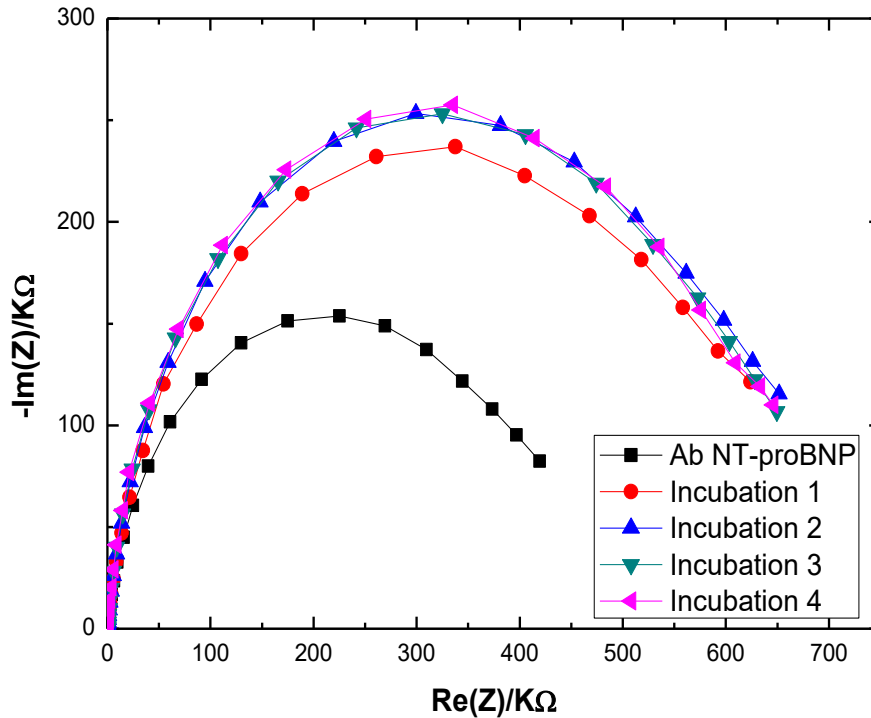


Figure 37 : Digramme de Nyquist après plusieurs incubation dans la salive artificielle-effet matrice de la SAH

5.2 Détection simultanée de NT-proBNP et de Cortisol dans la SAH

Pour évaluer la fiabilité analytique de notre biocapteur dans un milieu plus complexe que le PBS, la salive artificielle a été choisie comme milieu de détection en raison de ces composant qui reproduit les caractéristiques de la salive humaine.

On a réalisé la même série d'expériences précédente (détection dans le PBS) en utilisant la salive artificielle (SA). Les résultats de la SIE sont présentés par **la figure 38 (A) et (B)** pour la détection de NT-proBNP et Cortisol respectivement. On note le même comportement électrochimique observé dans la détection simultanée en PBS. Une augmentation progressive de R_{ct} en fonction d'augmentation de concentrations des deux biomarqueurs témoigne la sensibilité et reconnaissance spécifique entre les biomarqueurs (NT-proBNP et CORTISOL) et leur anticorps spécifiques. Néanmoins, le décalage successifs entre les diagrammes de

Nyquist est plus important par rapport au décalage observé dans la détection dans le PBS. Ce décalage confirme le phénomène d'adsorption non spécifique (Effet de matrice) observé avant.

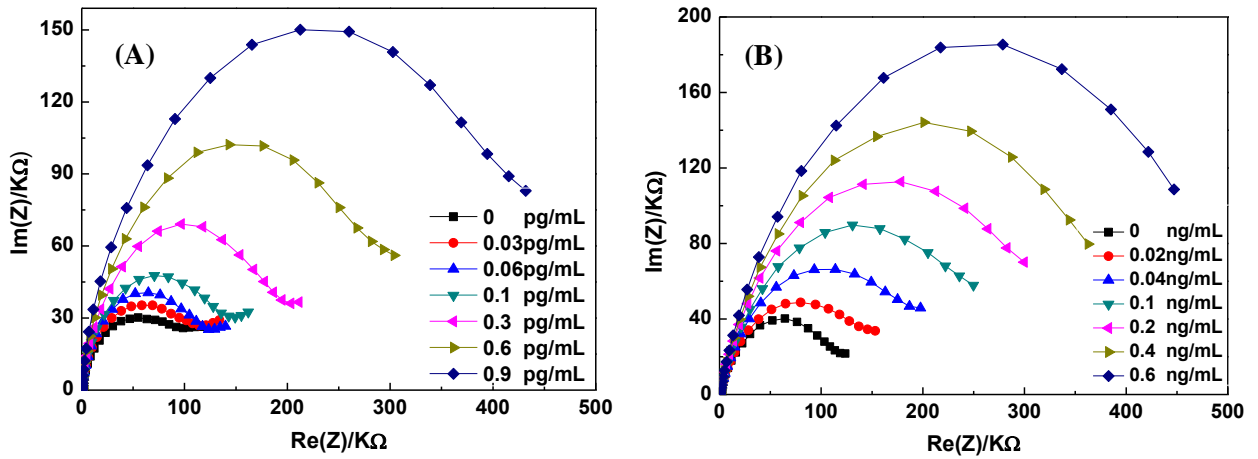


Figure 38 : Diagrammes de Nyquist a différentes concentrations des biomarqueurs cibles préparés dans la salive artificielle (A) EIS détection de NT-proBNP (B) EIS détection de Cortisol

Les résultats de modélisation en utilisant le circuit de Randles sont représentés par la **figure 39(A)** dans le PBS et **39 (B)** dans la salive artificielle. En comparant les deux détection notre prototype montre le même profil électrochimique indiquant la puissance de notre biocapteur même dans des milieux complexes le rapport $\frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}}$ augmente proportionnellement en fonction de l'augmentation des concentrations de biomarqueurs.

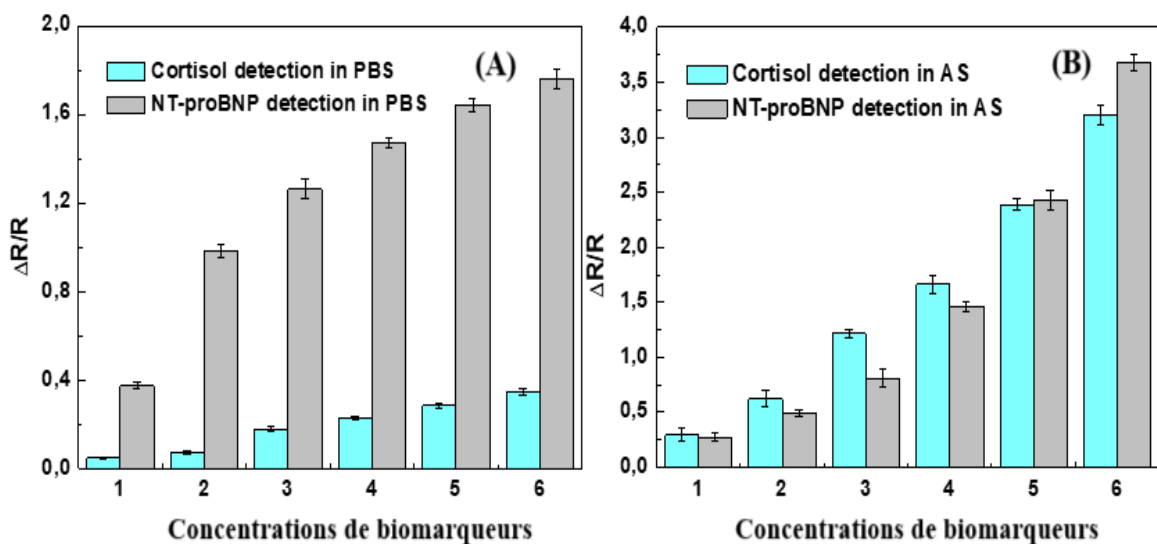


Figure 39 A) Sensibilité de biocapteur pour la détection simultanée de NT-proBNP et Cortisol dans le PBS (B) Sensibilité de biocapteur pour la détection simultanée de NT-proBNP et Cortisol dans la salive artificielle

Chapitre 04 : Evaluation de la performance analytique des biocapteurs élaborés pour la détection de NT pro BNP et Cortisol dans la salive

Deux plage de linéarité ont été observé dans les deux détection (**Figure 40**), pour les deux biomarqueurs.

Pour la détection de NT-proBNP dans la SA (**Figure 40 A**). La première zone s'étende de : 0.03pg/mL a 0.1pg/mL avec une équation de régression de :

$$Y=6,197(\pm 0.029)X+0.089 (\pm 0.011), (R^2= 0.99 (\pm 0.0005), CV\% 0.4 , n=4)$$

La deuxième zone s'étende de : 0.1pg/mL a 0.9pg/mL avec une équation de régression de :

$$Y=3.092(\pm 0.007)X+0.338(\pm 0.01), (R^2= 0.89 (\pm 0.00025), CV\% 0,23, n=4)$$

Pour la détection de Cortisol dans la SA(**Figure 40 B**) . La première zone s'étende de : 0.02ng/mL a 0.1ng/mL avec une équation de régression de :

$$Y=11.161 (\pm 0.045)X+0.079(\pm 0.004), (R^2= 0.99 (\pm 0.01), CV\% 0,4 , n=4)$$

La deuxième zone s'étende de : 0.1ng/mL a 0.6 ng/mL avec une équation de régression de :

$$Y=3.4602 (\pm 0.058)X+0.859(\pm 0.0022), (R^2= 0.99(\pm 0.005), CV\% 1.62, n=4)$$

Selon les plages de concentrations on observe un comportement électrochimique différencié pour les deux biomarqueurs.. Une linéarité marqué avec une pentes élevés (6,197 pour le NT-proBNP et 11,161 pour le Cortisol) en zone de basse concentrations témoignant une forte sensibilité. Cette linéarité est accompagnée d'un excellent coefficient de corrélation $R^2=0,99$, et un faible coefficient de variation $CV\%=0,4$ indiquant la bonne reproductibilité des mesures.

En revanche, on remarque une diminution de la pente (3,092 pour le NT-proBNP et 3,46 pour le Cortisol) signalant une diminution de la sensibilité du biocapteur en zone de haute concentrations, cette baisse s'accompagne également d'une diminution de la linéarité pour le NT-proBNP, $R^2=0,89$ bien que le $CV\%$ reste bas 0,23% témoignant une certaine stabilité mais une réponse moins linéaire. Pour le cortisol, la linéarité n'a pas changé $R^2=0,99$ mais le $CV\%$ a augmenté $CV\%=1,62$. La comparaison de $CV\%$ des deux plages indique une fiabilité et précision optimales dans la zones de basse concentrations.

Plusieurs explications sont possibles pour justifier ce changement de comportement électrochimiques :

- Une saturation progressive des sites de reconnaissance

- Une diffusion lente des composants de la salive artificielle
- Effet crochet, un phénomène fréquent dans les systèmes immunologiques.

La limite de détection (LOD) a été calculé selon la formule $3 \times \text{Ecart type} / \text{Pente}$, pour NT-proBNP la valeur de LOD= 0,2pg/mL et pour Cortisol LOD = 0,06ng/mL [10].

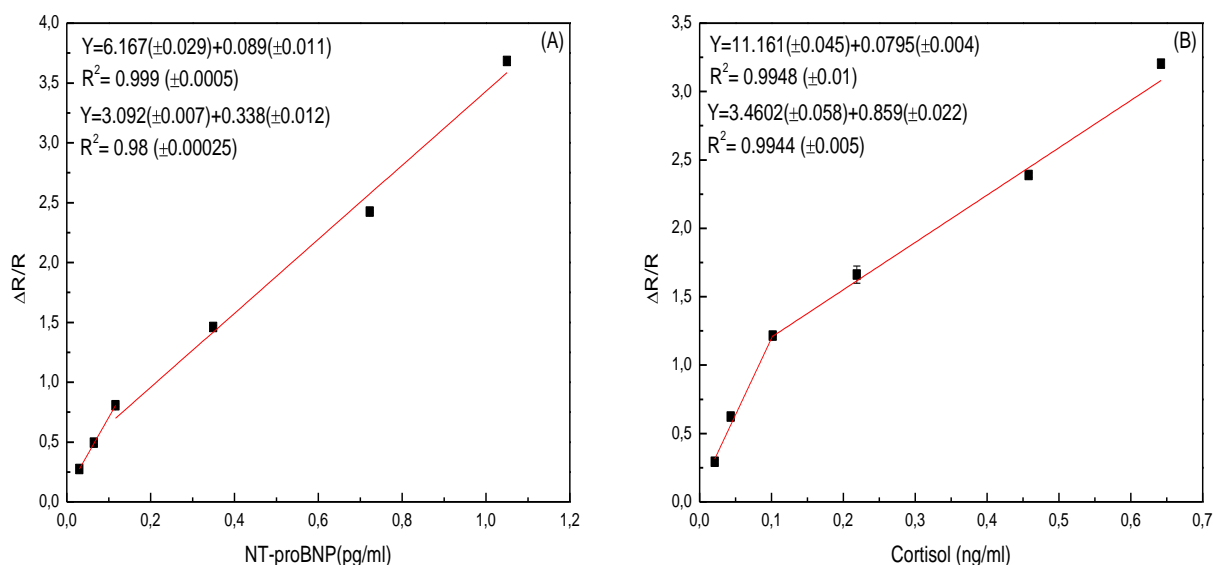


Figure 40 ; Droite de régression de la modélisation $\frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}}$ en fonctions de concentrations de NT-proBNP (A) et Cortisol (B) dans la salive artificielle

5.3 Etude de la sélectivité de biocapteur en présence des interférents biologiques

La sélectivité a été évalué aussi dans la salive artificielle pour validé la spécificité de biocapteur dans les milieux complexes. Le même protocole utilisée dans l'étude dans le PBS a été suivi. Les résultats sont présentés par la **figure 41 (A) et 41 (B)** pour NT-proBNP et Cortisol respectivement en présence de IL-10 et TNF- α (Voir l'annexe 1et 2). Aucune interférence n'a été observé , le biocapteur garde le même comportement électrochimique, indiquant ainsi la forte sélectivité de notre biocapteur et valide son performance dans un milieux complexe dans tel que la salive artificielle.

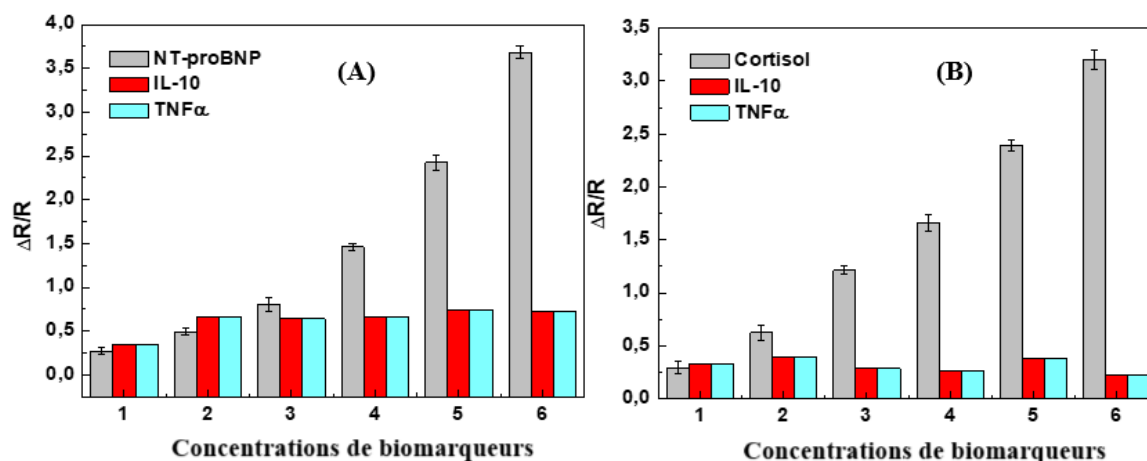


Figure 41 : Evaluation de la Sélectivité du biocapteurs en présence d'interférons biologiques IL-10 et TNF- α dans la salive artificielle.

5.4 Validation de la détection par la méthodes des ajouts dosées (SAM)

Un effet de matrice a été mis en évidence suite à l'étude précédente. Cet effet perturbe la réponse électrochimique en raison de la diffusion des composants de la salive artificielle sur la surface de l'électrode altérant ainsi la linéarité de la réponse de biocapteur.

Pour corriger l'impact de cet effet, on applique la méthode des ajouts dosés (SAM) en combinaison avec la SIE, une stratégie analytique rigoureuse permettant de tenir compte des effets de la matrice en enrichissant l'échantillon avec des concentrations connues croissantes de notre analyte cible, en plus de l'échantillon inconnu. Cela permet d'établir une droite avec une pente qui reflète fidèlement la sensibilité du biocapteur dans les conditions réelles. L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses (les concentrations) permet d'extrapoler la concentration réelle de l'échantillon inconnu tout en éliminant l'effet de matrice. (Voir section 4.4 chapitre 03).

Les résultats de cette approche sont présentés par la **figure 42**, les diagrammes de Nyquist obtenus pour chaque niveau de concentrations de mixte NT-proBNP (**figure 42 A et B**) montrent une augmentation progressive du diamètre de demi-cercle indiquant l'augmentation de la résistance de transfert de charge R_{ct} , en fonction de l'augmentation des concentrations. Les concentrations ajoutées (Level) correspondent à (0,5,10,15) de NT-proBNP (en pg/mL) et (0,5,10,15) du Cortisol (en ng/mL) respectivement,

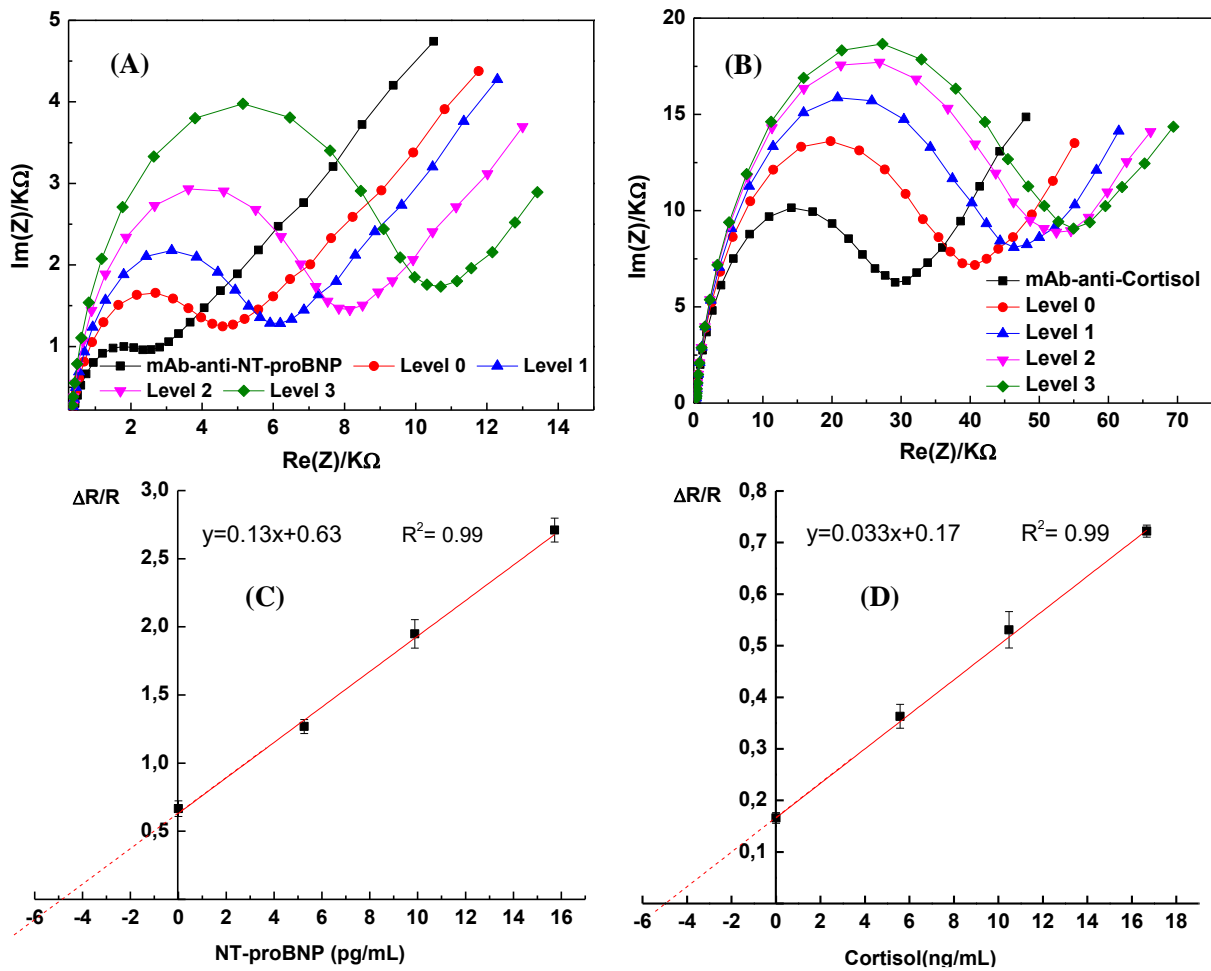


Figure 42: Diagrammes de Nyquist obtenus en appliquant la SAM : (A) NT-proBNP, (B) Cortisol , Level (1,2,3,4) correspond a (0,5,10,15) NT-proBNP (en pg/mL) et du Cortisol (en ng/mL) respectivement , (C) Droite de régression de la modélisation $\frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}}$ en fonctions de concentrations de NT-proBNP utilisée pour trouver la concentration inconnu dans l'échantillon (NT-proBNP/Cortisol). (D) Droite de régression de la modélisation $\frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}}$ en fonctions de concentrations du Cortisol utilisée pour trouver la concentration inconnu dans l'échantillon (NT-proBNP/Cortisol).

La modélisation des digrammes avec le circuit de Randles a permet d'obtenir les droites de régression $\frac{\Delta R_{ct}}{R_{ct}}$ en fonction des concentrations des biomarqueurs (Figure 42 (C) pour NT-ProBNP et (D) pour le cortisol) avec des équations présentant un excellent coefficient de corrélation.

$$\text{NT-proBNP : } Y = 0.13X + 0.63 \text{ (R}^2 = 0.99\text{)}$$

$$\text{Cortisol: } Y = 0.033X + 0.17 \text{ (R}^2 = 0.99\text{)}$$

Chapitre 04 : Evaluation de la performance analytique des biocapteurs élaborés pour la détection de NT pro BNP et Cortisol dans la salive

L'extrapolation de ces droites jusqu'à l'axe des abscisses a permis les concentration inconnu de l'échantillon a **4,85 pg/mL** de NT-proBNP, et **4,97ng/mL** de Cortisol. En tenant en compte le facteur de dilution appliquée lors de la préparation ($\times 20$). Les concentrations réelle dans l'échantillon (La solution mère) s'élèvent a **97 pg/mL** et **99,58 ng/mL**. Ces résultats concordent parfaitement avec la concentration théorique préparée 100pg/mL de NT-proBNP et 100ng/mL de Cortisol. Et confirme la pertinence et la fiabilité de l'approche adoptée.

6 Conclusions et perspectives

Ce travail décrit une approche de développement d'un biocapteur prototype conçu pour une application médicale (Diagnostic et suivi de l'insuffisance cardiaque). Le prototype s'agit d'un immunocapteur multiplexé destiné à une détection simultanée de deux biomarqueurs cardiaques le NT-proBNP et le Cortisol dans la salive artificielle humaine.

L'approche est basé sur l'immobilisation covalente des anticorps (Anti-NT-proBNP et Anti-Cortisol) sur une plateforme multi-électrodes (4 Electrodes de travail par plateforme) a l'aide sel de diazonium 4-APA. et l'application de la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) combinée à la méthodes des ajouts dosés (SAM)

Le biocapteur a démontré une sensibilité satisfaisante dans des plages de concentrations salivaires critiques (permet une détection précoce de l'insuffisance cardiaque), avec une bonne sélectivité en présence des deux biomarqueurs et en présence d'autres interférents potentiels IL-10 et TNF- α .

La détection simultanée offre un gain de temps considérable, à partir d'un volume réduit tout en conservant les performances analytiques élevées dans un milieu complexe. Dans l'optique de rendre la quantification de ces biomarqueurs rapide et directe des travaux sont en cours pour :

- Valider le prototype dans un échantillon réelle .
- Une évaluation approfondie de la sélectivité de biocapteur vis-à-vis d'autres interférents potentiels notamment des cytokines et des stéroïdes
- L'optimisation de la biofonctionnalisation de la surface et de la stabilité de biocapteur
- Automatisation et miniaturisations de biocapteur

A terme ce type de biocapteur pourrait contribuer énormément a l'amélioration de la qualité de vie des patients et de la santé publique (Diagnostic rapide, meilleur prise en charge, réduction des financiers publiques et personnels)

7 Références

- [1] L. Barhoumi, F. G. Bellagambi, F. M. Vivaldi, A. Baraket, Y. Clément, N. Zine, *et al.*, "Ultrasensitive immunosensor array for TNF- α detection in artificial saliva using polymer-coated magnetic microparticles onto screen-printed gold electrode," *Sensors*, vol. 19, p. 692, 2019.
- [2] A. Berisha, M. M. Chehimi, J. Pinson, and F. I. Podvorica, "Electrode surface modification using diazonium salts," *Electroanalytical chemistry*, vol. 26, 2015.
- [3] S. Parot, "Biofilms électroactifs: formation, caractérisation et mécanismes," Toulouse, INPT, 2007.
- [4] H. S. Magar, R. Y. Hassan, and A. Mulchandani, "Electrochemical impedance spectroscopy (EIS): Principles, construction, and biosensing applications," *Sensors*, vol. 21, p. 6578, 2021.
- [5] E. Ghedir, A. Baraket, S. Kouchar, S. Rabai, M. Benounis, A. Alcacer, *et al.*, "Electrochemical Immunosensor for NT-proBNP Detection in Artificial Human Saliva: Heart Failure Biomedical Application," in *Proceedings*, 2018, p. 1085.
- [6] E. K. Ghedir, A. Baraket, M. Benounis, N. Zine, and A. Errachid, "Electrochemical Multiplexed N-Terminal Natriuretic Peptide and Cortisol Detection in Human Artificial Saliva: Heart Failure Biomedical Application," *Chemosensors*, vol. 11, p. 416, 2023.
- [7] A. Baraket, M. Lee, N. Zine, M. Sigaud, J. Bausells, and A. Errachid, "A fully integrated electrochemical biosensor platform fabrication process for cytokines detection," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 93, pp. 170-175, 2017/07/15/ 2017.
- [8] H. B. Halima, F. G. Bellagambi, M. Hangouët, A. Alcacer, N. Pfeiffer, A. Heuberger, *et al.*, "A novel electrochemical strategy for NT-proBNP detection using IMFET for monitoring heart failure by saliva analysis," *Talanta*, vol. 251, p. 123759, 2023.
- [9] F. G. Bellagambi, A. Baraket, A. Longo, M. Vatteroni, N. Zine, J. Bausells, *et al.*, "Electrochemical biosensor platform for TNF- α cytokines detection in both artificial and human saliva: Heart failure," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 251, pp. 1026-1033, 2017.
- [10] A. Baraket, M. Lee, N. Zine, R. Caruso, M. Trivella, and A. Errachid, "Electrochemical Biosensor for Interleukin-10 Detection in Real Human Plasma Patients: Heart Failure Biomedical Application," *Int. J. Cardiovasc. Res*, vol. 6, 2016.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Cette thèse s'inscrit dans une dynamique d'innovation biomédicale au croisement de la chimie analytique, biologie clinique et l'électrochimie, en visant l'élaboration d'un biocapteur électrochimique sélectif dédié à la détection simultanée de deux biomarqueurs cardiaques clés : le NT-proBNP, marqueur de pronostic et de diagnostic standard de l'insuffisance cardiaque, et le cortisol reflet du stress physiologique.

L'approche interdisciplinaires imposée dans ce travail a permis de concevoir un biocapteur innovant basé sur un substrat en nitrure de silicium, comporte quatre microélectrodes en or, fonctionnalisées par l'électrodéposition de 4-Aminophénylacétique acide (4-APA) assurant ainsi l'immobilisation stable et contrôlée des anticorps monoclonaux anti-NT-proBNP et anti-Cortisol via greffage diazonium et le couple EDC/NHH.

EN combinant les deux technique électrochimique, la voltampérométrie cyclique (CV) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) pour la détection, on a obtenu une lecture approfondie des interactions biomoléculaires. Les résultats obtenues témoignent de la haute sensibilité du dispositifs, même en présence d'interférents biologiques avec des limites de détections de 0,2 pg/mL pour le NT-proBNP et 0,06 ng/mL pour le cortisol dans la salive artificielles. Ces résultats confirment la performance de notre approche analytique et la pertinence de la matrice salivaire comme fluide biologique alternatif, non invasif pour la surveillance en santé cardiovasculaire dans le cadre de la médecine moderne personnalisée.

La complémentarité de déférentes aspects disciplinaires (Chimie /Biologie/Electrochimie) dans cette thèse a permis d'établir une démarche cohérente pour la validation expérimentale d'un prototype médical fonctionnel.

Néanmoins, plusieurs perspectives de recherche peuvent être envisagées, on cite :

- Validation du biocapteur sur des échantillons salivaires réels provenant de patients .
- Développer un outil de e-santé personnalisé pour chaque cas, en intégrant ce biocapteur dans un dispositif portable.
- Renforcer la sensibilité du biocapteur par l'exploration des techniques de détection alternatives telles que l'utilisation de matériaux bidimensionnels ou amplifier le signal par nanoparticules.

Conclusion générale et perspectives

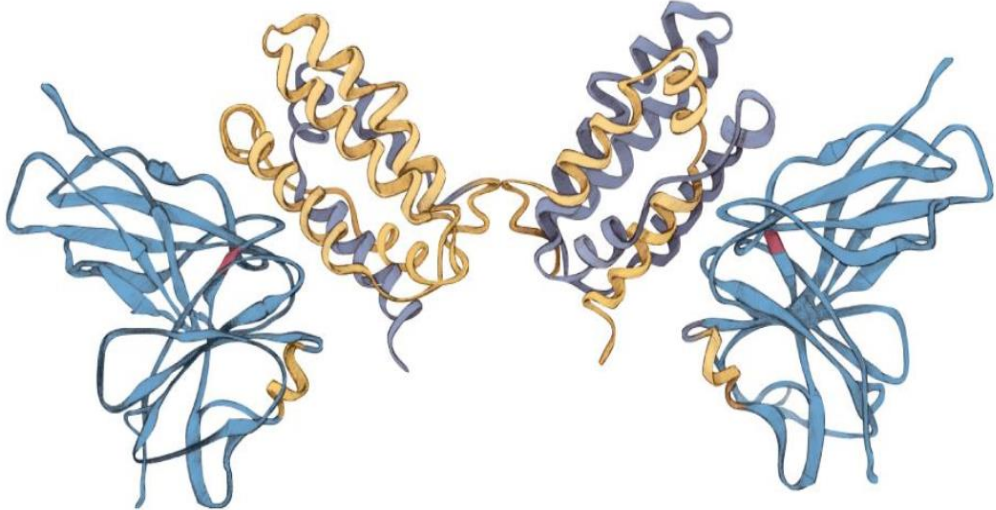
Au-delà du cadre cardiovasculaire, le biocapteur développé dans ce travail représente une base adaptable à d'autres contextes médicaux, le caractère modulaire de ce prototype pourrait être étendue à la détection d'autres couples de biomarqueurs de différentes pathologies et infections.

En conclusion, ce travail représente une étape modeste dans l'avancement de la recherche biomédicale, qui pose les jalons d'une nouvelle génération de dispositifs de diagnostic intelligent, accessibles à tous .

Annexes

Annexes

IL-10

Interleukine 10 (IL-10) [1-3]	
	
Figure 43 : Structure de IL-10	
Nature	Cytokine anti-inflammatoire (Protéines homodimère)
Origine	Lymphocytes T et macrophages
Rôle physiologique	<ul style="list-style-type: none">• Inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires.• Neutralise les effets de TNF-α• Participe à la guérison de myocarde lésé après un processus inflammatoire.• Préserve la matrice extracellulaire
Implication dans l'IC	<ul style="list-style-type: none">• Corrélation négative à la sévérité de l'IC• Contribuer à la préservation des tissus cardiaques
Interprétation clinique	<ul style="list-style-type: none">• Détectable dans le sang, l'urine , et la salive• Indicateur de l'états inflammatoires et le stress oxydatif dans l'IC
Biomarqueur salivaire	<ul style="list-style-type: none">• Présent dans la salive.

TNF- α

Le facteur de nécrose tumorale alpha TNF- α [4-6]

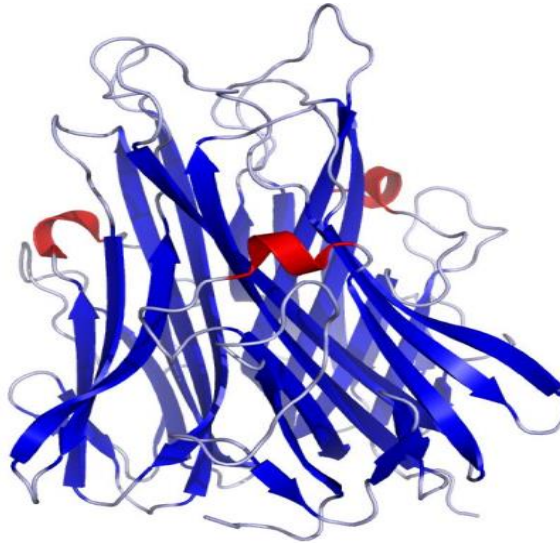


Figure 44 : Structure cristallisée de TNF- α humain

Nature	Cytokine pro-inflammatoire polypeptidique
Origine	Monocytes et macrophages activés
Rôle physiologique	<ul style="list-style-type: none">• Activation de la réponse immunitaire.• Implication dans les réactions allergiques.• Rôle antitumoral.• Induction de la cachexie.
Implication dans l'IC	<ul style="list-style-type: none">• Favorise le remodelage du ventricule gauche.• Provoque une dysfonction myocardique et une cardiomyopathie inflammatoire.• Réduit le flux sanguin musculaire• Perturbe le métabolisme énergétique du myocarde
Interprétation clinique	<ul style="list-style-type: none">• Une corrélation entre les concentrations élevées de TNF-α et la sévérité de l'IC.• Considéré comme biomarqueur cardiaque de l'IC en raison de son
Biomarqueur salivaire	<ul style="list-style-type: none">• Présent dans la salive avec des concentrations plus élevées chez les patients avec IC.• Bonne corrélation entre les concentrations sanguines et salivaires.

Références

- [1] K. Josephson, N. J. Logsdon, and M. R. Walter, "Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site," *Immunity*, vol. 15, pp. 35-46, 2001.
- [2] R. de Waal Malefyt, J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, and J. E. de Vries, "Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes," *The Journal of experimental medicine*, vol. 174, pp. 1209-1220, 1991.
- [3] K. Kaur, S. Dhingra, J. Slezak, A. K. Sharma, A. Bajaj, and P. K. Singal, "Biology of TNF α and IL-10, and their imbalance in heart failure," *Heart failure reviews*, vol. 14, pp. 113-123, 2009.
- [4] T. Horiuchi, H. Mitoma, S.-i. Harashima, H. Tsukamoto, and T. Shimoda, "Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents," *Rheumatology*, vol. 49, pp. 1215-1228, 2010.
- [5] E. Sinagra, G. Perricone, C. Romano, and M. Cottone, "Heart failure and anti tumor necrosis factor-alpha in systemic chronic inflammatory diseases," *European journal of internal medicine*, vol. 24, pp. 385-392, 2013.
- [6] L. Barhoumi, A. Baraket, F. G. Bellagambi, G. S. Karanasiou, M. B. Ali, D. I. Fotiadis, *et al.*, "A novel chronoamperometric immunosensor for rapid detection of TNF- α in human saliva," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 266, pp. 477-484, 2018.

Résumé

La détection précoce à faible concentration, par des méthodes non invasives, des biomarqueurs cardiaques dans les fluides physiologiques a suscité un intérêt croissant de la part de la communauté scientifique au cours de la dernière décennie. Cette approche permet un diagnostic anticipé et une prédiction plus précoce des premiers signes de l'insuffisance cardiaque (IC). À cet égard, l'analyse de la salive humaine s'impose comme le milieu le plus adapté à cette stratégie non invasive, en raison de sa richesse en informations biologiques utiles pour le suivi de la santé générale et des pathologies.

Dans ce travail, nous avons développé un immunocapteur multiplexé à haute sensibilité, permettant la détection simultanée directe du peptide natriurétique de type B aminoterminal (NT-proBNP) et du cortisol dans la salive artificielle humaine (AS). La plateforme de biocapteur élaborée repose sur un substrat en nitrure de silicium, intégrant quatre microélectrodes de travail (WE) en or ainsi qu'une microélectrode de référence et une électrode auxiliaire intégrées. Les électrodes de travail en or ont été biofonctionnalisées à l'aide d'un composé diazonium carboxylique (4-aminophénylacétique, 4-APA), afin d'immobiliser simultanément les anticorps anti-NT-proBNP et anti-cortisol. Le greffage électrochimique du 4-APA sur les surfaces des WE en or a été réalisé par voltampérométrie cyclique (CV), tandis que l'interaction anticorps/antigène dans le tampon PBS a été suivie par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS). La détection des antigènes dans la salive artificielle humaine a été effectuée à l'aide de l'EIS, combinée à la méthode d'addition standard. L'immunocapteur s'est révélé hautement sensible et spécifique vis-à-vis des biomarqueurs cibles, que ce soit dans le PBS ou dans la salive artificielle, même en présence d'interférents biologiques potentiels tels que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et l'interleukine-10 (IL-10). La limite de détection (LOD) obtenue pour le NT-proBNP était de 0,2 pg/mL, dans une plage de concentration allant de 0,03 à 0,9 pg/mL, tandis que celle du cortisol était de 0,06 ng/mL, dans une plage allant de 0,02 à 0,6 ng/mL. L'immunocapteur développé présente un fort potentiel pour la détection sensible et rapide de biomarqueurs dans les milieux physiologiques. Il constitue un outil prometteur pour le diagnostic simultané de multiples analytes, tout en réduisant considérablement le temps d'analyse.

Mots clés : Détection multiplexée, NT-proBNP, Cortisol, Salive artificielle humaine, EIS, insuffisance cardiaque.

Abstract

The early detection at low concentration, by non-invasive methods, of cardiac biomarkers in physiological fluids has attracted the interest of researchers over the last decade. This enables early diagnosis and prediction of the first signs of heart failure (HF). In this respect, the analysis of human saliva remains the most suitable medium for this non-invasive approach, as it contains a highly interesting biological matrix for general health and disease monitoring. In this work, we developed a highly sensitive multiplexed immunosensor for direct simultaneous detection of both N-terminal Natriuretic Peptide (NT-proBNP) and Cortisol in human artificial saliva (AS). The developed biosensor platform based on silicon nitride substrate was composed from four gold working microelectrodes (WEs) and an integrated counter and reference microelectrode. Gold WEs were biofunctionalized through carboxyl diazonium (4-APA) to immobilize both anti-NT-proBNP and anti-Cortisol antibodies for simultaneous detection. The electroaddressing of the 4-APA onto the gold WE surfaces was realized with cyclic voltammetry (CV), while the interaction between antibodies and antigens in PBS was monitored using electrochemical impedance spectroscopy (EIS). The antigen detection in human AS was realized with EIS combined with the standard addition method. The immunosensor was highly sensitive and selective toward the corresponding biomarkers in both PBS and artificial human saliva as well as in the presence of other potential interfering biomarkers such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10). The limit of detection (LOD) was at 0.2 pg/mL for NT-proBNP within the range of 0.03 to 0.9 pg/mL, while the LOD for Cortisol was 0.06 ng/mL within the range of 0.02 to 0.6 ng/mL for Cortisol in artificial saliva. The developed immunosensor is very promising for significant detection in physiological media, and time reducing as it allows the simultaneous detection of various biomarkers.

Keywords: multiplexed detection; N-terminal brain natriuretic peptide (NT-proBNP); cortisol; human saliva analysis; electrochemical impedance spectroscopy; heart failure.

ملخص

إن الكشف المبكر عن المؤشرات البيولوجية القلبية بتركيزات منخفضة، باستخدام طرق غير جراحية في السوائل الفسيولوجية، قد جذب اهتمامًا متزايدًا من المجتمع العلمي خلال العقد الأخير. تتيح هذه المقاربة تشخيصًا مبكرًا وتوقعًا دقيقًا لأولى علامات قصور القلب. وفي هذا السياق، تُعدّ اللعاب البشري الوسط الأنسب لهذه الاستراتيجية غير الجراحية، نظرًا لغناه بالمعلومات البيولوجية المفيدة لمتابعة الحالة الصحية العامة وتشخيص الأمراض.

في هذا العمل، قمنا بتطوير جهاز استشعار مناعي كهربائي متعدد الأهداف وعالي الحساسية، يتيح الكشف المباشر والمتزامن لكل من الجزء الأميني الطرفي للبتيد الناتريوتريتي من النوع (NT-proBNP) والكورتيزول في اللعاب الصناعي البشري. وتعتمد منصة المستشعر المطوّرة على ركيزة من نيتريد السيليكون، وتحتوي على أربع أقطاب عمل كهربائية مصنوعة من الذهب، بالإضافة إلى قطب مرجعي وقطب مساعد مدمجين.

تمت تفعيل الأقطاب الذهبية وظيفيًا بيولوجيًا باستخدام مركب ديازونيوم كربوكسيلي-4، حمض أمينوفينيل الأسيتيك-4-APA، وذلك لتثبيت الأجسام المضادة لـ NT-proBNP والكورتيزول في آنٍ واحد. وقد تم تثبيت 4-APA على أسطح الأقطاب باستخدام الفولتامبيرومترية الدورية (CV)، بينما تم تتبع تفاعلات الجسم المضاد/المستضد في محلول PBS باستخدام تقنية التحليل الطيفي للممانعة الكهربائية (EIS).

وقد تم الكشف عن المستضدات في اللعاب الصناعي البشري عبر تقنية EIS، مدمجة مع طريقة الإضافة القياسية. أظهر المستشعر المناعي حساسية وانتقائية عاليتين تجاه المؤشرات البيولوجية المستهدفة، سواء في PBS أو في اللعاب الصناعي، حتى في وجود مؤشرات أخرى متداخلة مثل عامل نخر الورم ألفا (TNF- α) والإنترلوكين-10 (IL-10). وبلغ حد الكشف (LOD) لمؤشر NT-proBNP حوالي 0.2 بيكوغرام/مل، ضمن مدى تركيز من 0.03 إلى 0.9 بيكوغرام/مل، بينما بلغ لحد الكورتيزول 0.06 نانوغرام/مل، في مدى من 0.02 إلى 0.6 نانوغرام/مل.

يُظهر المستشعر المطوّر إمكانيات واعدة للكشف السريع والحساس عن المؤشرات الحيوية في البيئات الفسيولوجية، ويُعد أداة فعالة للتشخيص المتزامن لعدة أناليتات، مع تقليص كبير في زمن التحليل.

الكلمات المفتاحية: الكشف المتعدد، NT-proBNP، الكورتيزول، اللعاب الصناعي البشري، التحليل الطيفي للممانعة الكهربائية (EIS)

Production scientifique

1. Publications

- E. Ghedir, A. Baraket, S. Kouchar, S. Rabai, M. Benounis, A. Alcacer, et al., "Electrochemical Immunosensor for NT-proBNP Detection in Artificial Human Saliva: Heart Failure Biomedical Application," in Proceedings, 2018, p. 1085.
<https://www.mdpi.com/2504-3900/2/13/1085#>
- E. K. Ghedir, A. Baraket, M. Benounis, N. Zine, and A. Errachid, "Electrochemical Multiplexed N-Terminal Natriuretic Peptide and Cortisol Detection in Human Artificial Saliva: Heart Failure Biomedical Application," Chemosensors, vol. 11, p. 416, 2023
<https://doi.org/10.3390/chemosensors11070416>

2. Conférences et congrès :

- Conférence Internationale : Environnement et Toxicologie « SINENTOX2019-18et 19 Février 2019 » Constantine, Algérie.

Intitulé : Extraction des composés phénoliques issus de l'olivier (feuilles et margines), et l'étude de leur activité antibactérienne

- Conférence Internationale : 11eme journée MAGHREB-EUROPE Matériaux et Applications aux Dispositifs et Capteurs « MADICA 2018-7 et 8 Novembre 2018 » Mahdia-Tunisie

Intitulé : Electrochemical biosensor for NT-proBNP Detection in Artificial Human Saliva: Heart Failure Biomedical Application.

- Conférence Internationale : Biotechnologies Appliquées à l'Agriculture, Santé et Ecologie « SIBAASE01- 2016-17 au 19 Avril 2016 » Université Abbes Laghrour Khenchela Algérie.

Intitulé : Extraction des composés phénoliques issus des produits de l'olivier et l'évaluation de leur activité antibactérienne