

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABBES LAGHROUR
KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES & DE LA
TECHNOLOGIE

DEPARTEMENT DE GENIE
INDUSTRIEL



جامعة عباس لغرور خنشلة

كلية العلوم و التكنولوجيا

قسم: الهندسة الصناعية

No. Réf. : .././...

Mémoire

Présenté par :

Hani Hind

Pour obtenir le diplôme de **MASTER (LMD)**

OPTION : Génie des Procédés et Environnement

Thème

**Elaboration d'un nouvel aptacapteur
sélectif au cadmium à base
d'électrode de carbone modifiée par
des nanoparticules d'or (AuNPs) et
nanotubes de carbone (CNT)**

Devant le jury :

Dr. Nacira Mechri	Président	U.A.L.K
Pr. Messaoud Benounis	Rapporteur	U.A.L.K
Mr. Khaled Djefal	Examineur	U.A.L.K
Mme. Selma Rabai	Invité	U.A.L.K

Année universitaire : 2018 – 2019

Dédicace



A ceux qui n'ont jamais cessé de m'encourager, et me conseiller.

A ceux qui n'ont jamais été avares ni de leur temps ni de leurs connaissances pour
satisfaire mes interrogations.

A mes parents

A ma sœur ; Hanane

A mon frère ; Abd El Djalil

A toute ma grande famille.

En témoignage de l'amour et de l'affection qui me lient.

A Monsieur Benounis

A mes chères Khalida, Malek, Mouna, Imen et Rania ;

A tous mes professeurs ;

A tous mes amis...

Remerciement

Remerciements

Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragée, soutenue et confortée. Qu'elles trouvent ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

J'adresse une pensée particulière à Monsieur M.Benounis, Professeur à l'université Abbas Laghrour, directeur de laboratoire et mon directeur de thèse pour avoir accepté et encadré cette thèse, pour la confiance qu'il m'a témoignée du début à la fin du travail, pour sa disponibilité à comprendre et à communiquer et sans oublier ses précieux conseils, pour ses qualités humaines, pour le temps qu'il m'a accordé.

Je tiens également à remercier chaleureusement Madame Rabai Selma ; Doctorante à l'université Abbas Laghrour pour son aide, sa disponibilité, son soutien et surtout ses conseils et recommandations qui m'ont permis pas seulement d'acquérir de nombreuses compétences dans les domaines scientifique et académique mais aussi de développer ma personnalité.

Je veux remercier ici très sincèrement les membres de mon jury de thèse, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour avoir accepté de le juger.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Boumaaza, Professeur à la Faculté de Chimie- Université Abbas laghrour, pour son aide, sa disponibilité et générosité.

Je tient à remercier tous les responsables de laboratoires pédagogique de la faculté de science et technologie de l'Université de Khenchela, pour leur patience, leur gentillesse.

Je m'adresse mes remerciement aux colléges à LCIP ; particulièrement Aymen.A et Mohamed pour son aide ; Alia ;Hadjer et Houda pour leur gentillesse ; Mlle A.Sara pour ses précieux conseils ; sans oublié mes collégues Tarek ; Mostapha et Chahinez.

Je voudrais réserver mes remerciements à mes parents ; mon frère et ma soeur ; qui m'ont toujours soutenu pendant les études.

Liste des abréviation et des notations

<i>Symbole</i>	<i>Nom</i>
ADN	<i>Acide Désoxyribonucléique.</i>
AFM	<i>« Atomic Force Microscopy », microscopie à force atomique.</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
A	<i>Aire de reaction électrochimique à WE</i>
AuNPs	<i>Nanoparticules d'or</i>
AE	<i>Electrode auxiliaire</i>
CNTs/CNTs	<i>Nanotubes de carbone</i>
C_{dl}	<i>Capacité de la double couche</i>
CCDV	<i>Deposition chimique de la vapeur</i>
CV/Vc	<i>Voltamétrie cyclique</i>
CS	<i>Chitosan</i>
E^\bullet	<i>Potentiel standard d'un couple redox</i>
E_0	<i>Potentiel initial</i>
ECS	<i>Electrode au Calomel Saturé</i>
FTIR	<i>spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier</i>
GA	<i>Glutaraldehyde</i>
GCE	<i>Electrode de carbone vitreux</i>
DRX	<i>diffraction de rayon X</i>
I	<i>Courant électrique</i>
K_d	<i>Constante de dissociation</i>
MS	<i>Spectroscopie de masse</i>
MWCNT	<i>Nanotubes de carbone à multi-paroi</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
pH	<i>Potentiel de l'hydrogène</i>
R_s	<i>Résistance de la solution.</i>
R_{tc}	<i>Résistance de transfert de charge.</i>
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>

Liste des abréviation et des notations

<i>SIE</i>	<i>Stectroscopie d'impesance électrique</i>
<i>TEM/MET</i>	<i>Microscopie électronique en transmission</i>
<i>V</i>	<i>Vitesse de variation de potentiel</i>
<i>WE</i>	<i>Electrode de travail</i>
<i>W</i>	<i>Impédance warburg</i>
<i>Z</i>	<i>Somme des impédances</i>
<i>Zre</i>	<i>Impédance réelle</i>
<i>Zim.</i>	<i>Impédance imaginaire</i>
σ	<i>Coefficient de warburg</i>
ϵ_0	<i>Constante diélectrique relative du vide</i>
ϵ	<i>Permittivité</i>
ΔI	<i>La réponse en courant</i>
ΔE	<i>Perturbation imposé à un potentiel</i>
ω	<i>Pilsation ou vitesse angulaire</i>
<i>Cd</i>	<i>Cadmium</i>
<i>Pb</i>	<i>Plomb</i>
<i>Zn</i>	<i>Zinc</i>
<i>Hg</i>	<i>Mercur</i>
<i>Ni</i>	<i>Nickel</i>
<i>As</i>	<i>Arsenic</i>
<i>Cr</i>	<i>Chrome</i>
<i>Cu</i>	<i>Cuivre</i>
<i>CaCO₃</i>	<i>Carbonate de calcium</i>
<i>HCl</i>	<i>Chlorure d'hydrogène</i>
<i>HAuCl₄</i>	<i>Acide Chloraurique</i>
<i>Na₂SO₄</i>	<i>Sulfate de Sodium</i>
<i>K₄[Fe(CN)₆]</i>	<i>Ferrocyanure</i>
<i>NaOH</i>	<i>Hydroxyde de sodium</i>

Figure I.1 : Chaîne trophique contaminée par les métaux lourds	5
Figure I.2 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur	8
Figure I.3 : Principales applications des biocapteurs	10
Figure I.4 : Classification des biocapteurs.....	11
Figure I.5 : Différents types de biorécepteurs.	14
Figure I.6 : Caractéristiques structurales des acides nucléiques	15
Figure I.7 : Principe de la méthode SELEX. Chaque cycle de sélection est composé d'une étape d'incubation entre la cible et la banque d'oligonucléotides, une étape de sélection des séquences ayant présenté une affinité pour la cible et une étape d'amplification des séquences sélectionnées.....	18
Figure I.8 : Schéma illustrant les différentes applications impliquant l'utilisation d'aptamères.....	19
Figure II.1 : Immobilisation des biomolécules par adsorption	24
Figure II.2 : Immobilisation des biomolécules par liaison covalente	24
Figure II.3 : Immobilisation des biomolécules par piégeage mesure	25
Figure II.4 : Immobilisation des biomolécules par réticulation et co-réticulation	25
Figure II.5 : Schématisation d'une nanoparticule d'or aux fonctionnalités multiples pour des applications diverses	28
Figure II.6 : Feuillette de graphène enroulée en cylindre.....	29
Figure II.7 : A) Images TEM et représentation schématique de la structure des SWCNT ; B) Image TEM et représentation schématique de la structure des MWCNT.....	29
Figure II.8 : a) Schéma illustrant la méthode d'arc électrique. c) Schéma de la méthode de décomposition chimique en phase vapeur sur un catalyseur fixe. b) Schéma du procédé d'ablation laser	30
Figure II.9 : Exemple de fonctionnalisation des SWCNT avec A) la fonctionnalisation des défauts, B) la fonctionnalisation covalente, C) la fonctionnalisation non-covalente, D) la fonction par des polymères et E) la fonctionnalisation endoédrique.....	31
Figure II.10 : Composite CNTs-Chitosan.....	32
Figure II.11 : Structure chimique du N-acétyl-D-glucosamine (a), de D-glucosamine (b) et du chitosane (c)	33
Figure II.12 : Principe de la détection impédancemétrique	34
Figure II.13 : (a,b). Représentation graphique des diagrammes de Nyquist et de Bode.....	36
Figure II.14 : Structure de la double couche.....	37

Figure II.15 : Circuit équivalent de Randles	38
Figure II.16 : Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat	39
Figure II.17 : Représentation typique d'un voltammogramme	40
Figure III.1 : Electrode de travail en carbone vitreux.....	43
Figure III.2 : Potentiostat/galvanostat utilisé pour les mesures	43
Figure III.3 : Cellule électrochimique	44
Figure III.4 : de référence (a) et contre électrode (b).....	45
Figure III.5 : Photos de la suspension de nanotubes de carbone dans le chitosan soumise à 30 min d'ultrasons, A) avant repos et B) après 24h de repos.....	46
Figure III.6 : Représentation schématique des différentes étapes de la conception du biocapteur pour la détection de cadmium	47
Figure III.7 : Spectre FTIR correspondant à (S ₀) nanotubes de carbone pure, (S ₁) nanotubes de carbone fonctionnalisés par un acide (HNO ₃ : H ₂ SO ₄).	48
Figure III.8 : Spectre FTIR correspondant à (S ₀) nanotubes de carbone pure, (S ₁) nanotubes de carbone fonctionnalisés par un acide (HNO ₃ : H ₂ SO ₄) : (b) bande 400-1500 cm ⁻¹ (c) bande 1800-3000 cm ⁻¹	49
Figure III.9 : Spectre de diffraction des rayons X de NTCs (S ₀) et NTCs-COOH (S ₁).	50
Figure III.10 : Voltammogrammes cycliques en présence de Fe (CN ₆) ^{3-/4-} , de l'électrode nue (a), Cs CNTs/GCE (b), AuNPs/Cs-CNTs/GCE (c), Apta/AuNPs/Cs-CNTS/GCE, Cd ²⁺ /Apta/AuNPs/Cs-CNTS/GCE. Vitesse de balayage 50 mV/s	52
Figure III.11 : Diagrammes de Nyquist de l'électrode nue (a), Cs-CNTs/GCE (b), AuNPs/Cs-CNTs/GCE (c), Apta/AuNPs/Cs-CNTS/GCE, Cd ²⁺ /Apta/AuNPs/Cs-CNTS/GCE. Les mesures ont été effectuées dans un tampon PBS pH 4.5 à -0.5V.....	53
Figure III.12 : Circuit équivalent de Randles	54
Figure III.13 : Concentrations croissantes de cadmium (10 ⁻¹³ -10 ⁻⁴) dans un PBS (pH=4.5)..	54
Figure III.14 : Influence de la concentration de cadmium sur la réponse du biocapteur impédimétrique . Mesures effectuées dans PBS (pH 4.5), à un potentiel de -0.5V et une gamme de fréquence de 10kHz- 100mHz	55
Figure III.15 : Courbes de calibration du biocapteur impédimétrique	56
Figure III.16 : Comparaison des réponses du biocapteur obtenues en présence d'éventuelles substances interférentes. Les mesures ont été réalisées dans un tampon PBS (pH 4.5).	57

Liste des tableaux

Tableau I.1 : flux des métaux lourds dans l'environnement.....	4
Tableau I.2 : Comparaison des aptamères aux anticorps.....	16
Tableau I.3 : Exemples des Biocapteurs de cadmium	20

Sommaire

Dédicace	I
Remerciement	II
Liste d'abréviation	III
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VI

Sommaire

Introduction Générale.....	1
Références bibliographique	
Chapitre I : Généralités sur les biocapteurs à base d'aptamère pour la détection de cadmium	3
Introduction	3
I.1. Généralités sur les métaux lourds	3
I.1.1 Les métaux lourds dans l'environnement	3
I.1.2. Origines et distribution des métaux lourds.....	3
I.1.3. Pollution par les métaux lourds.....	4
I.1.3.1 Les effets sur l'environnement.....	4
I.1.3.2 Les effets sur la santé	5
I.1.4. Pollution par le cadmium	6
I.1.4.1. Historique.....	6
I.1.4.2 Propriétés du cadmium.....	6
I.1.4.3 Utilisation du cadmium	6
I.1.4.4 Toxicité du cadmium	7
I.2. Les biocapteurs	7
I.2.1. Historique.....	7
I.2.2. Définition	8
I.2.3. Domaines d'application des biocapteurs.....	9
I.2.4. Classification des biocapteurs	11
I.2.4.1. Selon leur mode de transduction	11

Sommaire

I.2.4.2. Selon l'élément de reconnaissance	14
I.3. Aptamères	14
I.3.1. Anticorps versus aptamère	16
I.3.2. Selexion des aptamères	17
I.3.3. Application.....	19
I.4. Biocapteur pour la détection de cadmium	19
Conclusion	22
Références bibliographiques	
Chapitre II :Techniques de caractérisaion et méthodes d'immobilisation	23
Introduction	23
II.1. Méthodes d'immobilisation	23
II.1.1 Adsorption	23
II.1.2. Liaison covalente	24
II.1.3. Piégeage.....	24
II.1.4. Réticulation et co-réticulation.....	25
II.2. Intégration de nanomatériaux pour l'élaboration de biocapteur.....	26
II.2.1. Les nanoparticules d'or	26
II.2.2. Les nanotubes de carbone	28
II.2.2.1. Méhodes de synthèse	29
II.2.2.2. Fonctionalisation des nanotubes	30
II.2.2.3. Les composites à base de nanotubes de carbone	31
II.3. Le Chitosan.....	33
II.3.1. Origines et obtention	33
II.3.2. Structures et propriétés	33
II.4. Techniques électrochimiques d'analyse	34
II.4.1. L'impédancemétrie	34
II.4.1.1. L'impédance de différent phénomène électrique.....	36

Sommaire

II.4.1.2. Modélisation de l'impédance	38
II.4.2. La voltamétrie	38
II.4.2.1. Composants et principes des techniques voltamétriques	38
II.4.2.2. Analyses voltamétriques	39
Conclusion	41
Références bibliographiques	
Chapitre III : Elaboration d'un biocapteur à base d'aptamère pour la détection de cadmium	42
Introduction	42
III.1. Matériel et méthodes	42
III.1.1. Réactifs	42
III.1.2. Transducteur	42
III.1.3. Mesures électrochimiques	43
III.1.4. Protocole de nettoyage d'électrode de travail	43
III.2. Préparation du biocapteur	45
III.3. Résultats et discussion	48
III.3.1. Caractérisation des nanorubans de carbone	48
III.3.1.1. Caractérisation par spectroscopie à infrarouge	48
III.3.1.2. Caractérisation par diffraction des rayons X	49
III.3.2. Caractérisation par la voltamétrie cyclique	51
III.3.3. Caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique	52
III.3.4. Détection de cadmium	54
III.3.5. Sélectivité	54
Conclusion	57
Références bibliographiques	
Conclusion Générale	58
Résumé	

INTRODUCTION

GENERAL

Introduction

Le cadmium, un métal lourd provenant de nombreuses applications industrielles telles que la métallisation et la production des batteries cadmium-nickel, est un danger potentiel pour l'homme et l'environnement. Plusieurs composés contenant du cadmium sont classés dans la liste des produits carcinogènes et peuvent induire beaucoup de types de cancer [1].

Les biocapteurs constituent l'un des moyens les plus couramment utilisés dans l'évaluation ou la détection de cadmium. Ces nouveaux moyens d'analyses ont connus un essor tout à fait remarquable grâce aux besoins de plus en plus pressants des différents secteurs touchant à la chimie et à la biochimie (environnement, alimentation, pharmacie, sécurité domestique et industriel, diagnostic médical...)[2-6]. En effet, ils peuvent être sélectifs, sensibles et permettent d'obtenir des mesures rapides *in situ*. Ceux-ci sont des dispositifs souvent simples et compacts transformant le signal (bio) chimique en un signal électrique facilement exploitable [7].

De nombreux biocapteurs ont été mis au point pour la détermination de cadmium dans les échantillons environnementaux [8-9], citant notamment la spectrométrie [10] , l'ampérométrie [11]...etc. Parmi ces méthodes, la détection par mode électrochimique est hautement adaptable et polyvalente. Elle implique l'utilisation d'un aptacapteur de cadmium électrochimique. Dans le développement des biocapteurs de cadmium électrochimiques, l'immobilisation d'aptamère sur des électrodes est le paramètre clé qui détermine la sensibilité du capteur [12-13].

Les capteurs à base d'aptamère pour la détermination électrochimique de cadmium appartiennent à la classe de biocapteurs la plus connue. Depuis une vingtaine d'année, ces aptacapteurs démontrent une grande richesse dans les possibilités de détection de molécules dans de nombreux domaines.

L'objectif ultime de ce travail de thèse porte essentiellement à comment développer un biocapteur à base d'aptamère sur une électrode de carbone vitreux modifiée avec des nanoparticule d'or (AuNPs) par électrodéposition sur des nanotubes de carbone (CNT) dans un film CS (CNT / CS) pour une détection électrochimique de cadmium.

Pour réaliser ce nouveau biocapteur nous avons utilisées des nanomatériaux afin de maximiser les performances de biocapteur en termes de stabilité, sélectivité et limite de détection. Notre travail est subdivisé comme suivant:

Introduction général

Le premier chapitre est consacré pour une bibliographie présentant des généralités sur les biocapteurs à base d'aptamère.

Le deuxième chapitre a été dédié à une présentation détaillé des procédés d'immobilisation des aptamères ainsi que les différentes techniques électrochimiques appliquées dans ce travail.

Le troisième chapitre, englobera la méthodologie du travail, et exposera les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Finalement, nous donnant une conclusion générale avec des perspectives.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Centre SPIN, méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation (les métaux lourds), Axe " Génie des Procédés", Ecole des Mines de Saint-Étienne. 1997.
- [2] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1025–1041.
- [3] L. Barthelmebs, C. Calas-Blanchard, G. Istamboulie, J.-L. Marty, T. Noguer, Biosensors as analytical tools in food fermentation industry, *Adv. Exp. Med. Biol.* 698 (2010) 293–307.
- [4] N.A. Mungroo, S. Neethirajan, Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry-a review, *Biosensors.* 4 (2014) 472–493.
- [5] A.M. Skelley, J.R. Scherer, A.D. Aubrey, W.H. Grover, R.H.C. Ivester, P. Ehrenfreund, FJ Grunthner , JL Bada , RA Mathies , Development and evaluation of a microdevice for amino acid biomarker detection and analysis on Mars, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 1041–1046.
- [6] T.B. Tims, D.V. Lim, Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores directly from powders with an (2007) 45-57
- [7] Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S., *Biosens & Bioelectron.* 2001, 16, 121-127.
- [8] Reuven Babai , Klimentiy Levkov , Judith Rishpon , Eliora Z. Ron ; Online and in situ monitoring of environmental pollutants: electrochemical biosensing of cadmium; *Environmental microbiologie*; December 2001; 62
- [9] Gregory March , Tuan Dung Nguyen ,and Benoit Piro; Modified Electrodes Used for Electrochemical Detection of Metal Ions in Environmental Analysis; *Biosensors* 2015, 5(2), 241-275
- [10] Tsao-JenLin Mon-FuChung ; Detection of cadmium by a fiber-optic biosensor based on localized surface plasmon resonance; *Biosensors and Bioelectronics* Volume 24, Issue 5, 1 January 2009, Pages 1213-1218
- [11] Gregory March , Tuan Dung Nguyen ,and Benoit Piro; Modified Electrodes Used for Electrochemical Detection of Metal Ions in Environmental Analysis; *Biosensors* 2015, 5(2), 241-275

Références bibliographiques

[12] Graziella L. Turdean ; Design and Development of Biosensors for the Detection of Heavy Metal Toxicity; International Journal of Electrochemistry Volume 2011, Article ID 343125, 15 pages

[13] Elicia L.S.Wong¹EdithChowJ.Justin Gooding ; The electrochemical detection of cadmium using surface-immobilized DNA; Electrochemistry CommunicationsVolume 9, Issue 4, April 2007, Pages 845-849

CHAPITRE I :

*Généralités sur les
biocapteurs à base d'aptamère
pour la détection de cadmium*

Introduction

Cette étude bibliographique s'articulera essentiellement autour de quatre grands points. Le premier donne des généralités sur les métaux lourds, notamment leurs origines, leurs effets sur l'environnement et la santé, et en particulier le cadmium.

Le second s'intéressera à l'étude des biocapteurs, définissant ce que représente ce terme et présentant les domaines d'application et les différentes classes existantes de biocapteur ainsi que les propriétés et les inconvénients qu'ils peuvent apporter.

Le dernier point présente l'aptamère comme élément de reconnaissance, sa structure, ses propriétés, présentant la méthode SELEX et les différents domaines d'application des aptamères.

I.1. Généralité sur les métaux lourds

I.1.1. Les métaux lourds dans l'environnement

Les métaux présents dans l'environnement ont des origines anthropiques et naturelles. Bien qu'ils soient largement répandus dans l'environnement, les métaux lourds existent généralement sous une forme inoffensive pour les organismes vivants. En effet, la forme chimique d'un métal conditionne sa disponibilité et donc sa toxicité vis-à-vis des organismes.[1]

I.1.2. Origine et distribution des métaux lourds

L'émission de métaux lourds dans l'environnement est d'origine naturelle et anthropique. Les sources naturelles atmosphériques consistent en une émission de particules due aux activités volcaniques, aux feux de forêts ou aux particules du sol emportées par le vent [1]. Pour la plupart des métaux toxiques, le flux naturel est infime comparé aux émissions industrielles (tableau I.1). Notons cependant que les émissions atmosphériques de plomb ont diminué récemment grâce au remplacement du tétraéthyle de plomb dans les carburants.

Tableau I.1: flux des métaux lourds dans l'environnement [1]

Eléments	Flux anthropogénique (1)	Flux naturel (2)	Rapport (1)/(2)
As	150	90	1.7
Cd	43	4.5	9.6
Cr	7810	810	9.6
Cu	9162	375	24.4
Pb	3665	180	20.4
Hg	17.8	0.9	19.8
Ni	1134	255	4.4
Zn	7467	540	13.8

On constate que les rapports (flux anthropogénique/ flux naturel) sont tous supérieurs à 1 c'est à dire que le risque de contamination des cycles biogéochimiques par les activités humaines est très grand. L'influence de celles-ci est marquée par une augmentation de la concentration en métaux dans les sédiments des rivières et des lacs (liée à leur faible solubilité aux pH habituels des eaux (5 à 9)). Dans le sol, la pollution est plus sournoise puisque ce compartiment a la propriété de fixer les métaux. On risque donc d'observer des effets de bioaccumulation.

I.1.3. Pollution par les métaux lourds

I.1.3.1 Les effets sur l'environnement

Les métaux lourds ont des effets néfastes sur tous les compartiments environnementaux, l'identification des dangers de métaux lourds s'appuie sur les tests écotoxicologiques terrestres et aquatiques qui couvrent des populations des niveaux trophiques différents.

Les essais réalisés sur des insectes pollinisateurs (*Apis mellifica*), des oiseaux (coturnix

Généralités sur les biocapteurs à base d'aptamère pour détection de cadmium

japonica, colinus virginianus, Anas platyrhynchos) ou des mammifères estiment l'inhibition de la germination, de la croissance des plantes ou de la reproduction des animaux. Ces effets atteignent l'homme à travers la chaîne alimentaire [1].

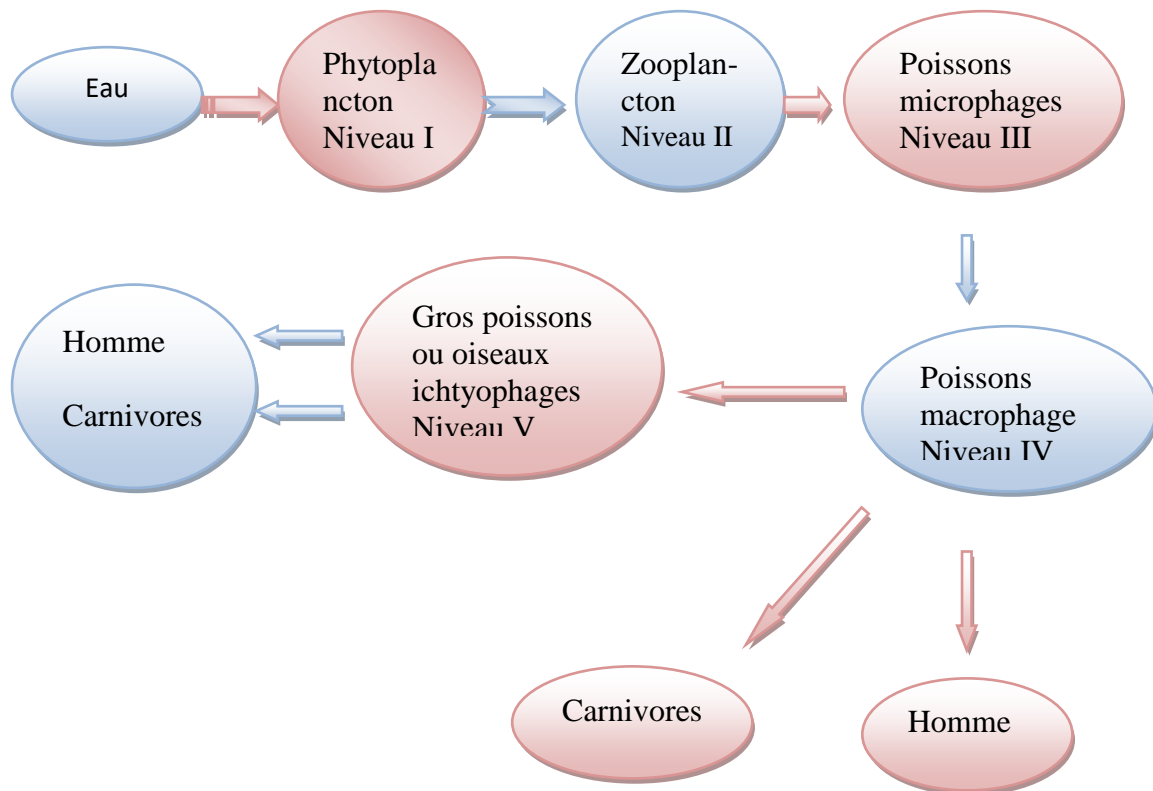


Figure I.1 Chaîne trophique contaminée par les métaux lourds. [1]

I.1.3.2. Les effets sur la santé

Les métaux lourds peuvent entraîner chez l'homme des pathologies touchant à son intégrité physique et mentale. Il n'est alors plus capable de réagir et de s'adapter aux diverses situations.

Les métaux lourds peuvent s'accumuler au sein de l'organisme et donc perturber son organisation interne. Certains d'entre eux ont des effets tératogènes et d'autres peuvent entraîner des troubles de la fécondité. Comme nous le voyons donc, chaque fonction fondamentale et vitale de l'homme est mise en danger par la présence des métaux lourds dans son environnement [2].

I.1.4. Pollution par le cadmium [3]

I.1.4.1. Historique

Le cadmium fut découvert en 1808 par Magnus Martin af Pontin, mais c'est en 1817 que l'Allemand Friedrich Stromeyer le prépara pour la première fois. Le nom de Cadmium vient du latin *cadmia*, « calamine », ancien nom donné au carbonate de zinc, le cadmium était extrait de ce minerai aux environs de la ville de Thèbes, qui fut fondée par Cadmos, et dont la citadelle porte le nom de *kadmeia*, en français Cadmée.

I.1.4.2. Propriétés du cadmium

Le cadmium est un métal blanc, mou et malléable. Il ternit au contact de l'air.

➤ Propriétés physiques

Le cadmium est un métal blanc argenté ayant des propriétés physiques proches de celle du zinc. Il fond à 320,9 °C et bout à 767 °C. Lors de l'ébullition du cadmium, il se dégage des vapeurs jaunes toxiques. Sa masse spécifique (densité) est de 8 650 kg/m³. Il est ductile (résistance à l'étirement), malléable (résistance à l'aplatissement) et résiste à la corrosion atmosphérique, ce qui en fait un revêtement de protection pour les métaux ferreux.

➤ Propriétés chimiques

Les propriétés chimiques du cadmium sont semblables à celles du zinc. L'ion cadmium est remplacé par le zinc métallique en solution : il est donc plus noble que le zinc.

Il s'oxyde très peu à température ambiante et brûle dans l'air en donnant l'oxyde anhydre CdO, insoluble dans un excès d'hydroxyde de sodium. Il réagit avec les acides et les bases. Le cadmium est soluble dans l'acide nitrique dilué et dans les acides chlorhydrique et sulfurique concentrés et chauds. La masse molaire atomique du Cadmium (Cd) est de 112,4 g/mol.

I.1.4.3. Utilisation du cadmium

Le cadmium a de multiples utilisations : notamment dans les écrans de télévision, les barres de contrôles des réacteurs nucléaires, les colorants,... etc.

Il entre dans la composition de nombreux alliages à bas point de fusion (soudures, brasures) et sert à la fabrication de certaines batteries d'accumulateurs (« piles rechargeables ») mais, ses principales utilisations sont celles de ses composés utilisés comme revêtements anticorrosion (appliqué en couche mince sur l'acier par cadmiage, le cadmium protège contre

la corrosion, en particulier saline), ou encore la fabrication de pigments de couleurs (jaune et rouge).

I.1.4.4. Toxicité du cadmium

Le cadmium est un métal extrêmement toxique qui est largement utilisé dans la galvanoplastie. Il est également présent dans la fumée de cigarette, dans certaines peintures industrielles et dans certains produits destinés aux activités agricoles (engrais phosphorés).

Chimiquement, lorsqu'il est à l'état élémentaire atomique, tout comme le mercure et le plomb, le cadmium n'est pas toxique pour les organismes vivants. Mais il le devient après transformation chimique ou biochimique en un cation divalent M^{2+} .

Le cadmium est un métal d'origine naturelle, il est généralement présent dans l'environnement comme un minéral combiné avec d'autres éléments (par exemple, l'oxygène, le chlore et le soufre).

La toxicité du cadmium se produit par voie orale ou respiratoire [3], pouvant provoquer à court ou à long terme des problèmes de santé graves car il est capable de remplacer le calcium dans l'organisme et d'entraîner une fuite calcique.

Cette exposition affecte les poumons, les reins, les os et le système immunitaire. Elle peut conduire au cancer des poumons et à celui de la prostate, être à l'origine de troubles cardiovasculaires, ou encore causer le jaunissement des dents et provoquer de l'anémie. Le cadmium semble aussi contribuer aux maladies auto-immunes de la thyroïde, il est classé cancérigène et peut conduire au décès.

II.2. Les biocapteurs

II.2.1. Historique

L'histoire des biocapteurs a débuté en 1950, lorsque Leland Clark a créé le premier biocapteur dont le but est de mesurer la concentration de l'oxygène dissous dans le sang. En 1962, ce biocapteur est adapté à la mesure de la concentration de glucose dans le sang [4]. Cinq années plus tard, Updike et Hucks ont conçu une électrode enzymatique permettant de doser le glucose dans des solutions biologiques [5]. Dans les années qui ont suivi, de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le fonctionnement de ce premier biocapteur à glucose ou dans le but d'appliquer son principe au développement d'autres biocapteurs enzymatiques. On peut ainsi citer par exemple le biocapteur potentiométrique proposé par Guilbault et Montalvo en 1969 pour la détection de l'urée [6].

II.2.2. Définition

Un biocapteur est un outil ou système analytique conçu pour transformer une réponse biologique en un signal électrique [7]. Ce dispositif est basé sur l'accouplement spatial direct d'un composé biologiquement actif immobilisé, appelé "biorécepteur" ou "élément de reconnaissance biologique", avec un transducteur qui agit en tant que détecteur et un amplificateur électronique [8]. Le biocapteur emploie les systèmes biologiques à différents niveaux d'intégration pour identifier spécifiquement la substance à déterminer. La première étape de cette interaction est la formation d'un complexe spécifique de la substance active immobilisée avec l'analyte.

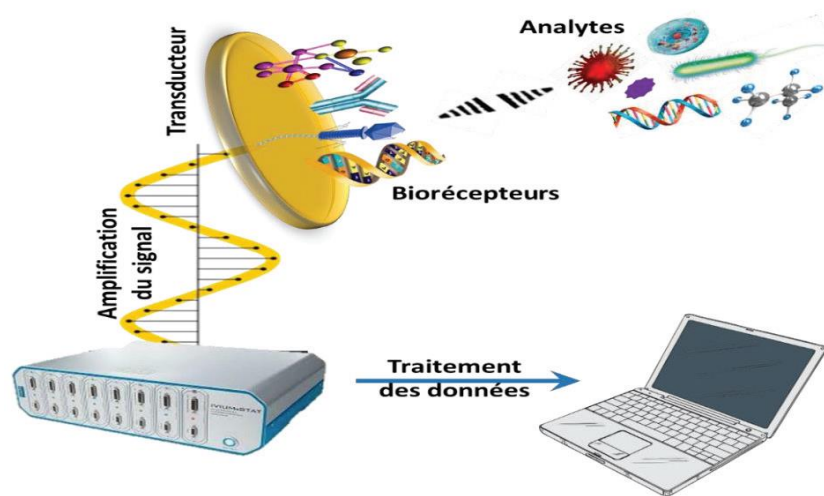


Figure I.2. Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur

La figure I.2 représente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans l'échantillon, toute information utile à son évaluation. Cette donnée va ensuite être traitée, enregistrée et stockée. Le biorécepteur (enzymes, anticorps, ADN, cellules, organites cellulaires, tissus...) catalyse des réactions biochimiques ou interagit avec des structures complémentaires conduisant à des changements de propriétés physiques ou chimiques convertis en signaux électriques mesurables grâce au transducteur. Ces signaux seront ensuite amplifiés et traités par des circuits électroniques. Les plus utilisés reposent sur l'optique, la calorimétrie, la piézoélectricité et l'électrochimie.

Comme toute méthode d'analyse, les performances des biocapteurs sont caractérisées par différents paramètres :

Généralités sur les biocapteurs à base d'aptamère pour détection de cadmium

- ✓ la sélectivité : l'aptitude à détecter l'espèce cible à l'exclusion de toute autre. Ce paramètre dépend principalement du biorécepteur, bien que le choix du transducteur puisse contribuer à une bonne sélectivité.
- ✓ la sensibilité : le rapport entre la réponse du capteur et la variation correspondante de la grandeur à mesurer.
- ✓ la reproductibilité : la capacité du biocapteur à donner des réponses très voisines pour des mesures répétées de la même quantité d'analyte à mesurer.
- ✓ la limite de détection : la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée de façon significative.
- ✓ l'exactitude : c'est l'accord entre le résultat de la mesure et la valeur vraie de la grandeur mesurée ; l'écart est appelé erreur absolue.
- ✓ la durée de vie : période pendant laquelle les caractéristiques du capteur permettent son utilisation avec un degré de précision suffisant.
- ✓ la dérive : l'évolution de la ligne de base du capteur en l'absence de l'espèce cible.

I.2.3. Domaines d'application des biocapteurs

Un grand nombre de travaux ont été dédiés ces dernières décennies au développement de biocapteurs pour des applications très variées dans le domaine de la santé [9,10], l'environnement [11], l'industrie agroalimentaire [12,13], l'espace [14] ou encore le bioterrorisme [15] (Figure I.3).



Figure I.3. Principales applications des biocapteurs.

L'évolution des normes de plus en plus strictes de l'industrie alimentaire a contribué au développement de biocapteurs pour l'analyse des produits (essentiellement de grande consommation). Ils permettent l'étude de la qualité de viandes, de poissons, de la composition de nourriture ou de la présence de toxines d'origine bactérienne [16],[17]. De même, le contrôle de la qualité de l'environnement étant une préoccupation majeure, les biocapteurs environnementaux donnent des informations importantes sur la qualité de l'eau, allant de la détection de détergents, de polluants considérés comme perturbateurs endocriniens[18] à la détermination de la composition chimique de l'eau[19], en passant par la détection d'algues marines toxiques.

Depuis le 11 septembre 2001 et les envois de courriers contenant de l'anthrax, le besoin de renforcer la sécurité nationale et les techniques de biosurveillance a contribué au développement de nombreux biocapteurs pour la lutte contre le terrorisme[20]–[22].

Les applications dans le domaine médical et pharmaceutique connaissent les succès les plus importants et lucratifs. C'est d'ailleurs dans ces domaines que les efforts en termes de recherche et développement sont les plus remarquables. De nombreux biocapteurs ont été développés pour le contrôle de biomarqueurs de santé tels que le cholestérol [23], le glucos

[24], les applications de diagnostic rapide en temps réel, de type « point-of-care », et la découverte de nouveaux médicaments.[25]

I.2.4. Classification des biocapteurs

Les biocapteurs sont généralement classés en fonction de la nature des biorécepteurs et des transducteurs qui les composent (figure I.4).

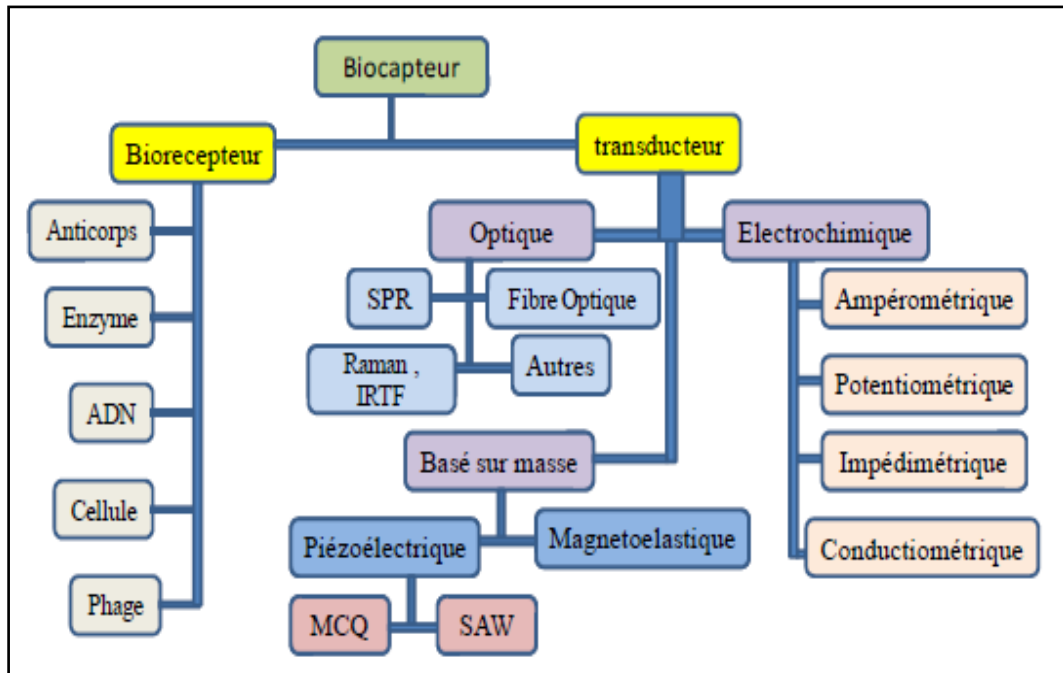


Figure I.4. Classification des biocapteurs.

I.2.4.1. Selon le mode de transduction

Le transducteur est l'élément physique qui exploite la modification biochimique issue d'une interaction entre l'analyte et le biorecepteur pour la transformer en signal électrique. L'adéquation entre le type de transducteur et l'élément biologique permet d'obtenir un signal sensible et facilement exploitable avec un minimum de bruit de fond. L'information donnée par le transducteur doit, tout comme le biorecepteur, être spécifique et ne doit correspondre qu'à la reconnaissance biologique.

Quatre types de transducteurs sont généralement utilisés pour la conception de biocapteurs. Ainsi le transducteur peut être :

a. Transduction optique

Ce type de transduction consiste à transformer l'évènement de reconnaissance biologique sous forme d'une grandeur optique (variation d'indice de réfraction, d'absorbance,

de fluorescence, de luminescence...). Les principaux atouts de ces transducteurs sont généralement leur caractère non destructif qui autorise des mesures in situ et en temps réel, leur insensibilité aux interférences électromagnétiques et leur bonne sensibilité de détection. Cependant, la limitation principale de cette technique réside dans la difficulté de son intégration complète sur une puce miniaturisée. La transduction optique reste donc l'archétype d'une méthode de détection excellente, toutefois elle nécessite un appareillage externe non intégrable [26–28].

b. Transduction mécanique

Ce type de transduction est principalement basé sur la génération et la détection d'ondes mécaniques ou acoustiques. Ces ondes se propagent à travers ou à la surface d'un matériau provoquant un changement de vitesse et/ou d'amplitude au niveau de la zone de passage de l'onde propagée [29]. L'augmentation ou la diminution de masse induite par ces variations peut être typiquement suivie par la mesure de spectres en fréquence et corrélées à l'information correspondant à la reconnaissance biologique recherchée. De bonnes performances peuvent être obtenues, mais cette technique s'avère être dépendante de plusieurs facteurs influençant la fiabilité des résultats, tels que la variation de la température, l'atténuation des ondes, le dépôt non-spécifique des molécules, de poussières ou d'autres contaminants sur les cristaux.

c. Transduction thermique

La transduction thermique consiste à mesurer l'énergie produite ou absorbée au cours d'une réaction biochimique. Les transducteurs thermiques sont généralement des thermocouples ou des thermorésistances [30]. Les biocapteurs thermiques les plus utilisés sont enzymatiques mais il existe des biocapteurs thermiques immunochimiques. Ce type de transduction, adapté aux mesures en continu, présente de nombreux avantages tels que la rapidité de réponse, la reproductibilité et l'absence d'interférence électrochimique ou optique. Elle est cependant très peu utilisée à cause du coût élevé de l'instrumentation et des contraintes technologiques liées à la nécessité de compenser les variations parasites de température.

Dans ce qui suit, nous nous intéressons à définir la transduction électrochimique qui sera utilisée comme mode de transduction de biocapteur développé au cours de cette thèse.

d. Transduction électrochimique

La méthode de détection électrochimique est, avec la transduction optique, la plus répandue dans le domaine des biocapteurs et c'est celle que nous avons choisie d'exploiter dans notre travail. Son principe repose sur la détection de changements électrochimiques lors de l'événement de bio-reconnaissance [31].

Le système électrochimique est composé de deux ou trois électrodes :

- une électrode de travail : stable et conductrice fabriquée à l'aide de métaux nobles tels que l'or, le diamant ou le carbone
- une électrode de référence désignée pour maintenir un potentiel de référence connu et stable
- une électrode auxiliaire qui sert au passage du courant à travers le système et non à travers l'électrode de référence

La transduction électrochimique possède plusieurs avantages à savoir sa sensibilité, sa simplicité, son faible coût, et éventuellement sa miniaturisation et son intégration dans des dispositifs automatisés. Les biocapteurs électrochimiques s'avèrent, alors, très prometteurs et font actuellement l'objet d'intenses recherches [32].

Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques qui sont classés selon leur mode de détection [33] :

- ✓ La potentiométrie mesure le changement de potentiel de charge à une électrode de travail par rapport à une électrode de référence dont le potentiel reste constant. La potentiométrie fournit donc des informations sur l'activité des ions mis en jeu lors d'une réaction électrochimique.
- ✓ L'ampérométrie et la voltammétrie sont basées sur la mesure du courant électrique produit lorsqu'un potentiel est appliqué entre une électrode de référence et une électrode de travail. Le courant mesuré est le résultat du processus de réduction ou d'oxydation électrochimique d'une espèce électroactive produite lors d'une réaction biochimique ayant lieu à l'électrode de travail. On parle d'ampérométrie lorsque le courant est mesuré à un potentiel constant et de voltammétrie lorsque la mesure est réalisée lors d'une variation contrôlée de potentiel.
- ✓ La conductimétrie mesure la conductance électrique d'une solution électrolytique contenant des charges électriques mobiles, constituées par l'ensemble des ions.

- ✓ La spectroscopie d'impédance électrochimique mesure le changement d'impédance (à la fois la résistance et la réactance). C'est une excellente technique pour étudier les propriétés électriques à l'interface électrode/électrolyte.

I.2.4.2. Selon l'élément de reconnaissance (biorecepteur)

Les éléments de reconnaissance biologique, appelés aussi biorecepteurs, sont la clé de la technologie des biocapteurs. Par définition, un biorecepteur est une espèce moléculaire qui utilise un mécanisme de reconnaissance biochimique spécifique. Son choix est tributaire de plusieurs paramètres : sa stabilité, sa durée de vie, la spécificité de sa réponse et la facilité de son utilisation aussi bien que de la nature des molécules à analyser. Les biorecepteurs peuvent être classés selon leur type d'activité (Figure I.5). On distingue les biorecepteurs d'affinité, qui fixent simplement l'analyte sans le modifier, les biorecepteurs métaboliques, qui possèdent une activité catalytique, et une autre catégorie récemment intégrée : les récepteurs biomimétiques [34].

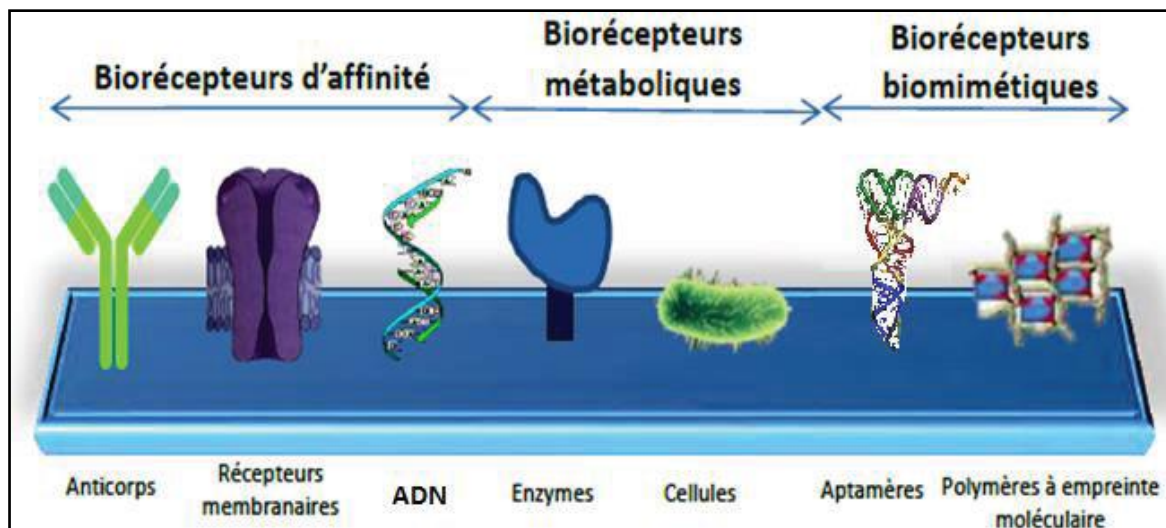


Figure I.5. Les différents types de biorecepteurs.

Dans ce qui suit, nous nous intéresserons à définir les aptamères en tant que biorecepteurs utilisés pour la fabrication de biocapteur développé au cours de cette thèse.

I.3. Aptamère

Au début des années 1990, trois différents laboratoires ont développé une méthode *in vitro* de sélection et d'amplification pour isoler des acides nucléiques spécifiques capables de se lier à une molécule cible avec une grande affinité et spécificité [35]. Cette méthode a été nommée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) et les oligonucléotides résultants ont été appelés aptamères, du latin « aptus », adapté à. Les

aptamères sont typiquement composés d'ARN, d'ADN simple brin ou d'une combinaison de l'un d'eux avec des nucléotides de synthèse. Ils ont une taille pouvant aller de 6 à 40 kDa. Ils sont isolés à partir de bibliothèques d'acides nucléiques extrêmement complexes, générées par chimie combinatoire, par un processus itératif de liaison, d'éluion et de réamplification.

Après un enrichissement suffisant, les aptamères sont identifiés et étudiés pour leur liaison à la cible en tant que population homogène. Grâce à leur structuration tridimensionnelle, caractérisée par des tiges, des boucles latérales, des épingles à cheveux, des triplexes et des quadruplexes, les aptamères peuvent se lier à une grande variété de molécules cibles telles que des ions, des antibiotiques, des petites molécules, des acides aminés, des nucléotides, des peptides, des oligosaccharides ou des protéines. Ils se lient sélectivement à leur cible par des interactions de Van der Waals, des liaisons hydrogène, des empilements de cycles aromatiques, des interactions électrostatiques ou une combinaison de ces interactions [36]. La plupart des aptamères décrits présentent des constantes de dissociation (K_d) de l'ordre du bas nanomolaire voire du picomolaire, équivalentes et même parfois supérieures à celles observées pour des anticorps monoclonaux envers leur antigène. Les aptamères présentent une grande spécificité leur permettant de discriminer leur cible par rapport à leurs dérivés.

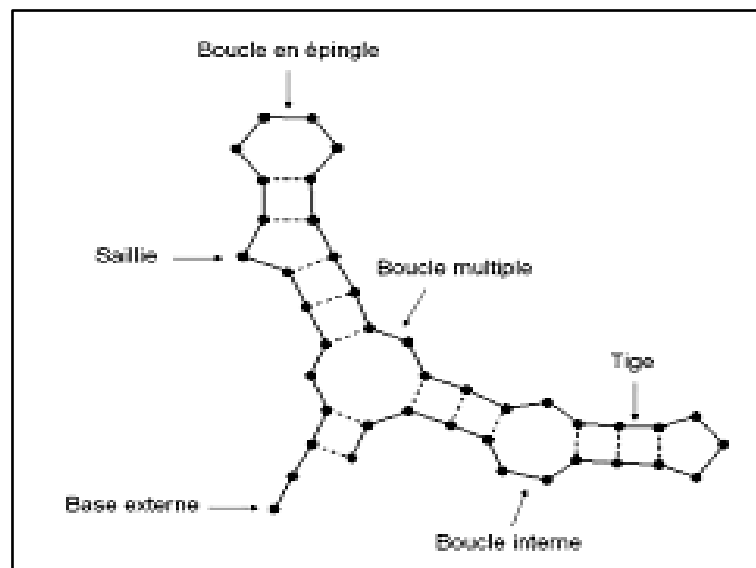


Figure 1.6 Caractéristiques structurales des acides nucléiques, adapté de Hermann et al. [37].

I.3.1. Anticorps versus Aptamère

Les aptamères constituent une alternative intéressante aux anticorps pour le développement de nouvelles méthodes d'analyse basées sur la reconnaissance moléculaire de la cible. Les principaux avantages des aptamères sont résumés dans ce tableau I.2 :

Tableau I.2. Comparaison des aptamères aux anticorps

Paramètres	Anticorps	Aptamères
Identification	L'identification des anticorps est restreinte à une production in vivo chez des animaux ou des lignées cellulaires.	Les aptamères sont identifiés par un processus in vitro ne nécessitant ni animaux ni lignées cellulaires.
Production	La production d'anticorps est laborieuse et peut être coûteuse pour des anticorps rares nécessitant le criblage d'un nombre important de colonies.	Les aptamères sont synthétisés rapidement, à faible coût et sont purifiés dans des conditions dénaturantes permettant l'obtention d'une excellente pureté.
Limitation par rapport à la cible	Les anticorps dirigés contre des cibles faiblement immunogéniques sont difficiles à obtenir.	Des molécules cibles faiblement immunogéniques peuvent être utilisées pour générer des aptamères à forte affinité.
Sensibilité à la température	Les anticorps sont sensibles à la température, ce qui conduit à des dénaturations irréversibles. Ils possèdent une faible durée de vie.	Les aptamères fonctionnels peuvent être régénérés facilement en quelques minutes après dénaturation, de façon réversible. Ils sont stables à long terme et peuvent être transportés à

		température ambiante.
Reproductibilité de production	La performance des anticorps semble varier d'un lot à l'autre, nécessitant une optimisation des immunoessais pour chaque lot d'anticorps.	Les aptamères sont produits par synthèse chimique avec une extrême précision et reproductibilité, il y a peu ou pas de variation d'un lot à l'autre.
Modification des paramètres cinétiques	Les paramètres cinétiques des interactions anticorps-cible ne peuvent être modifiés à la demande.	Les paramètres cinétiques des complexes aptamère-cible peuvent être changés en fonction de la méthodologie SELEX.
Modifications chimiques	Une diminution ou une perte d'affinité de l'anticorps pour la cible peut être causée par le marquage de l'anticorps	Des molécules chimiques (biotine, fluorescéine...) peuvent être attachées à l'aptamère à des positions précises non impliquées dans la fixation.

I.3.2. Sélection des aptamères

L'identification et la sélection de molécules d'aptamères fait appel à un procédé d'évolution moléculaire dirigée ou SELEX. Développée simultanément par deux équipes en 1990 [38, 39], le principe de cette technique repose sur l'extraction de ligands potentiels à partir d'une banque d'oligonucléotides composée initialement de séquences générées aléatoirement. La coexistence, dans une même entité moléculaire, de la structure et de la séquence permet alors, par alternance d'étapes de sélection (basées sur la structure) et d'amplification (basées sur la séquence), d'isoler le composé possédant les propriétés recherchées (Figure 1.7). Ainsi, il s'agit d'une méthode combinatoire faisant intervenir trois étapes principales : la synthèse de banques de séquences suffisamment riches, le criblage de candidats potentiels et enfin, l'identification et purification des séquences retenues.

Généralités sur les biocapteurs à base d'aptamère pour détection de cadmium

La première étape, cruciale, nécessite la constitution de banques d'oligonucléotides présentant une diversité moléculaire suffisante. Sachant que les séquences sont constituées d'une région aléatoire de n nucléotides (en général de 20 à 100), la diversité de la banque dépendra de la taille de cette région. La limite expérimentale de la richesse de la banque est généralement de l'ordre de 10^{13} à 10^{15} séquences différentes [40].

Cette population est ensuite soumise à une étape de criblage via une sélection basée sur l'existence d'une activité catalytique, ou le plus souvent, l'affinité pour une cible choisie. La sélection s'opère par séparation physique et peut faire intervenir diverses méthodes telles que la chromatographie, la rétention sur filtre ou encore l'électrophorèse. Les séquences sélectionnées sont alors amplifiées par PCR grâce à des amorces qui s'hybrident aux régions fixes. Une banque enrichie en candidats potentiels est donc obtenue, à partir de laquelle un nouveau cycle de sélection/amplification peut être effectué. Le taux d'enrichissement dépend des conditions de sélection, qui jouent un rôle déterminant pour l'évolution de la population. Cette succession d'étapes de sélection et d'amplification est répétée sur 10 à 15 cycles, permettant ainsi l'enrichissement progressif de la population en séquences présentant les meilleures qualités pour la fonction recherchée.

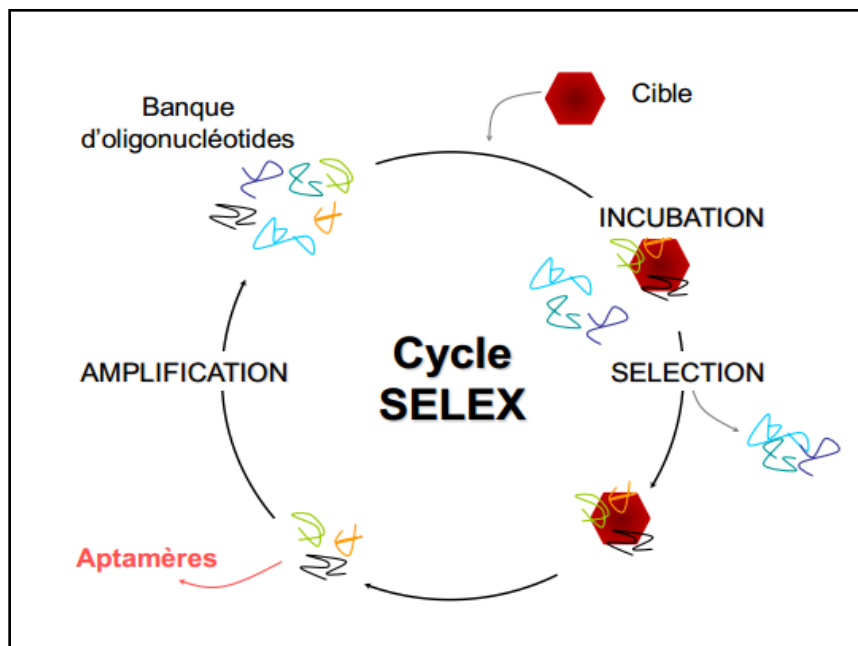


Figure I.7. Principe de la méthode SELEX. Chaque cycle de sélection est composé d'une étape d'incubation entre la cible et la banque d'oligonucléotides, une étape de sélection des séquences ayant présenté une affinité pour la cible et une étape d'amplification des séquences sélectionnées.

I.3.3. Applications

La découverte des aptamères et de leurs propriétés a ouvert la voie à de multiples applications (Figure 1.8). Leur potentiel en tant que nouvel outil pour l'analyse médicale ou la thérapeutique, rivalisant ou complétant celui apporté par les anticorps, est en constante évolution. Les revues de Luzi et al [41] ainsi que Tombelli et al. [42] en résument les principales avancées.

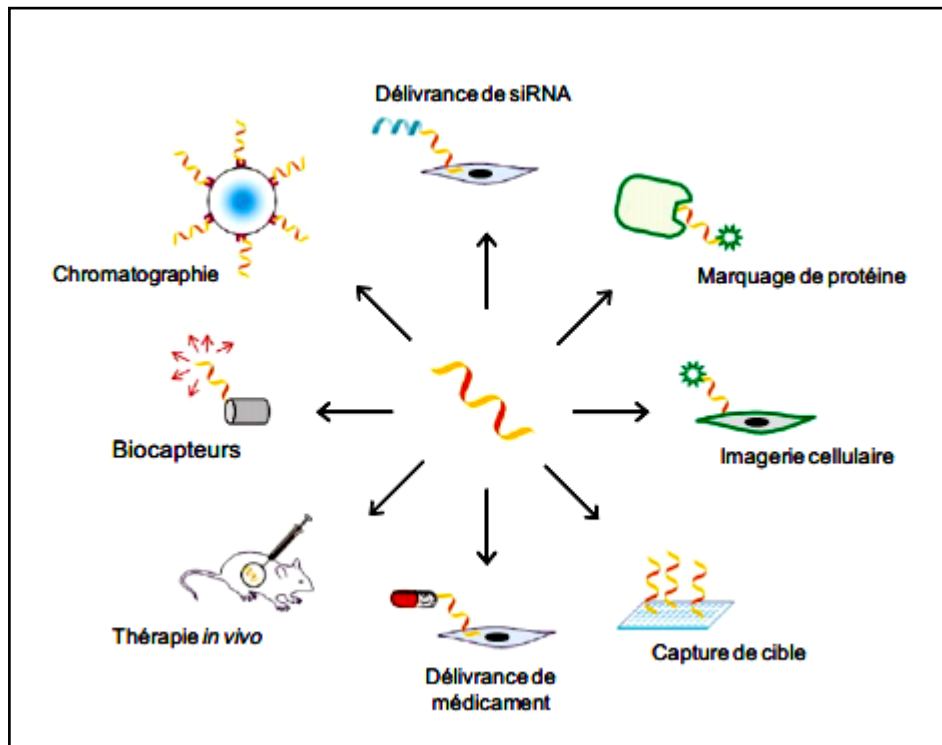


Figure 1.8. Schéma illustrant les différentes applications impliquant l'utilisation d'aptamères. D'après Iliuk et al. [43].

I.4. Biocapteurs pour la détection de cadmium

Un grand nombre de travaux ont été dédiés ces dernières décennies au développement de biocapteurs pour le contrôle environnemental le (tableau I.3) montre quelques exemples des biocapteurs pour la détection de cadmium.

Généralités sur les biocapteurs à base d'aptamère pour détection de cadmium

Tableau I.3. Exemples des Biocapteurs de cadmium

Molécule réceptrice sélective d'ions	Limite de détection (plage linéaire)	Mécanisme de capteur	Références
CNT	2,2 pM	Appareils d'analyse colorimétriques et électrochimiques à base de papier microfluidique utilisant des NTC multi-parois sérigraphiées.	Rattanarat et al. 2014
Nano-fleurs poreuses en oxyde de magnésium	81 pM (40–140 nM)	Surveillance des électrodes sensibles aux nano-fleurs d'oxyde de magnésium poreux au moyen d'une voltampérométrie inverse à anodisation en onde carrée	Wei et al.2012
Levure	0,2 nM	Ampérométrie	Jarque et al.2016
CNT	0,27 nM (0,44–178 nM)	Voltamétrie de stripage anodique par impulsions différentielles utilisant une électrode en carbone vitreux modifiée avec du Nafion, du poly (dimercapto-1,3 thiadiazole-1,3) et des NTC à parois multiples	Lui et al.2011
Nanofibres de Polyaniline	0,7 nM (5–80 nM)	Voltampérométrie inverse striée anodique utilisant une électrode de carbone vitreux modifiée avec des nanofibres de polyaniline auto-dopée / nitrure de carbone mésoporeux et bismuth	Zhang et al.2016a , b ,c
Colonne de monolithe en silice C18	0,8 nM (0,44 à 44 µM)	Chromatographie liquide à haute performance en phase inversée	Thirumalai et al. 2018

Généralités sur les biocapteurs à base d'aptamère pour détection de cadmium

Au NPs	3,5 nM (10–30 μM)	Analyse colorimétrique à l'aide de NP Au et d'ascorbes fonctionnalisés à l'acide trithiocyanurique	Wang et al.2018
Electrodes à couche épaisse sérigraphiées	4,4 nM (0–1,3 μM)	Couple électrochimique standard d'électrodes solides à couche épaisse de ferrocyanure de fer cyanure de potassium	Prášek et al. 2006
Glutathion	5 nM	Voltamétrie utilisant le glutathion comme ligand sélectif immobilisé sur une électrode en or modifiée avec une monocouche auto-assemblée d'acide 3-mercaptopropionique	Chow et al.2005
L-cysteine	0.12 μM	Voltametrie cyclique et spectroscopie d'impedance utiliant une électrode en carbone vitreux modifiée avec graphène et chitosan.	Wenshu Zhou et al 2015
Fluorescence bactérienne à cellules entières	10 nM	Souche RN4220 de <i>Staphylococcus aureus</i> et souche BR151 de <i>Bacillus subtilis</i> en utilisant la séquence régulatrice du gène cadA du plasmide pI258	Tauriainen et al. 1998
Nanoparticules de bismuth	20 nM	Nano composite de nanoparticules d'oxyde de graphène réduit – bismuth	Sahoo et al.2013
CNT	0,4 μM (0,4–71 μM)	Réseau de nanoélectrodes / voltampérométrie époxy	Liu et al.2005
Au NPs	0.04995 pM (10 ⁻¹³ – 10 ⁻⁸)	Spectroscopie d'impedance utilisant une électrode de carbone vitreux modifiée avec CS et Au NPs.	Liu,Yuan et al 2017

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté le principe de fonctionnement d'un biocapteur, basé sur la reconnaissance entre un analyte et son biorécepteur, puis sur la transduction de cette reconnaissance en un signal quantifiable. Nous avons montré que différentes techniques sont utilisées pour cela, qu'elles soient optiques, mécaniques, thermiques ou encore électrochimiques, donnant ainsi naissance à diverses familles de biocapteurs.

A travers les exemples cités dans cette présentation générale des biocapteurs, nous avons pu voir que l'immobilisation des biorécepteurs à la surface de transducteurs peut se faire de multiples manières et influe directement sur les performances du système. C'est pourquoi le prochain chapitre traitera plus en détail des différentes méthodes les plus couramment utilisées pour réaliser de telles fonctionnalisations de surface.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographiques

- [1] J. Berthelin, Paul-Henri Bourrelier. Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. Académie des sciences. n°42. Technique et documentation, 1998.
- [2] Recherche google. La pollution par les métaux lourds. <http://crdp.ac-amiens.fr/enviro/air/air-maj3-p3-1.htm>. 5 mai 2006.
- [3] M.J. Chowdhury, E.F. Pane, C.M. Wood, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 139 (2004) 163–173.
- [4] Clark Jr, L.C. *Trans. Am. Soc. Arti. Intern. Organs* 1956, 2, 41-48.
- [5] Clark Jr, L.C, Lyons. C. *Ann. Ny Acad. Sci.* 1962, 102, 29-45.
- [6] Guilbault, G.G., Montalvo Jr, J.G. *J. Am. Chem. Soc* 1969. 91, 2164-2165.
- [7] D'Souza, S.F. *Biosens & Bioelectron* 2001, 16, 337-353.
- [8] Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S., *Biosens & Bioelectron*. 2001, 16, 121-127.
- [9] E. Burcu Bahadır, M. Kemal Sezginürk, Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics, *Talanta*. 132 (2015) 162–174.
- [10] M.L.Y. Sin, K.E. Mach, P.K. Wong, J.C. Liao, Advances and challenges in biosensorbased diagnosis of infectious diseases, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 14 (2014) 225–244.
- [11] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1025–1041.
- [12] L. Barthelmebs, C. Calas-Blanchard, G. Istamboulie, J.-L. Marty, T. Noguer, Biosensors as analytical tools in food fermentation industry, *Adv. Exp. Med. Biol.* 698 (2010) 293–307.
- [13] N.A. Mungroo, S. Neethirajan, Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry-a review, *Biosensors*. 4 (2014) 472–493.
- [14] A.M. Skelley, J.R. Scherer, A.D. Aubrey, W.H. Grover, R.H.C. Ivester, P. Ehrenfreund, FJ Grunthaner, JL Bada, RA Mathies, Development and evaluation of a microdevice for amino acid biomarker detection and analysis on Mars, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 1041–1046.
- [15] T.B. Tims, D.V. Lim, Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores directly from powders with an (2007) 45-57

Références bibliographiques

- [16] D. Dupont, « Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire », Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire, 2005, F3, F4010.
- [17] L. D. Mello et L. T. Kubota, « Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries », Food Chemistry, 2002, 77, 2, 237-256.
- [18] S. Rodriguez-Mozaz, M.-P. Marco, M. J. Lopez de Alda, et D. Barceló, « Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article », Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 378, 3, 588-598.
- [19] I. Karube et Y. Nomura, « Enzyme sensors for environmental analysis », Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 10, 1-3, 177-181.
- [20] T. B. Tims et D. V. Lim, « Rapid detection of Bacillus anthracis spores directly from powders with an evanescent wave fiber-optic biosensor », J. Microbiol. Methods, 2004, 59, 1, 127-130.
- [21] F. Arduini, A. Amine, D. Moscone, F. Ricci, et G. Palleschi, « Fast, sensitive and cost-effective detection of nerve agents in the gas phase using a portable instrument and an electrochemical biosensor », Anal Bioanal Chem, 2007, 388, 5-6, 1049-1057.
- [22] S. Singh, « Sensors--an effective approach for the detection of explosives », J. Hazard. Mater., 2007, 144, 1-2, 15-28.
- [23] S. K. Arya, M. Datta, et B. D. Malhotra, « Recent advances in cholesterol biosensor », Biosensors and Bioelectronics, 2008, 23, 7, 1083-1100.
- [24] J. Mastrototaro, « The MiniMed Continuous Glucose Monitoring System (CGMS) », J. Pediatr. Endocrinol. Metab., 1999, 12 Suppl 3, 751-758.
- [25] M. Keusgen, « Biosensors: new approaches in drug discovery », Naturwissenschaften, 2002, 89, 10, 433-444.
- [26] X.-D. Wang, O.S. Wolfbeis, Fiber-optic chemical sensors and biosensors (2008-2012), Anal. Chem. 85 (2013) 487–508.
- [27] H.H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications, Sensors. 15 (2015) 10481–10510.
- [28] X. Guo, Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review, J. Biophotonics. 5 (2012) 483–501.

Références bibliographiques

- [29] B. Becker, M.A. Cooper, A survey of the 2006-2009 quartz crystal microbalance biosensor literature, *J. Mol. Recognit. JMR.* 24 (2011) 754–787.
- [30] K. Mosbach, Thermal biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 179–182.
- [31] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1747–1763.
- [32] J.C. Vidal, L. Bonel, A. Ezquerro, S. Hernández, J.R. Bertolín, C. Cubel, JR Castillo , Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: A review, *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 146–158.
- [33] D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, E. Reimhult, Electrochemical
- [34] J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor recognition elements, *Curr. Issues Mol. Biol.* 10 (2008) 1–12.
- [35] Tuerk, C. & Gold, L., 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968), pp.505–510.
- [36] Hermann, T. & Patel, D., 2000. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science*, 287(5454), pp.820–825.
- [37]. Hermann, T. and D.J. Patel, Stitching together RNA tertiary architectures. *Journal of Molecular Biology*, 1999. 294(4): p. 829-849
- [38]. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 1990. 346(6287): p. 818-822.
- [39]. Tuerk, C. and L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990. 249(4968): p. 505-510.
- [40]. Toulmé, J.-J., et al., Les aptamères : du concept à l'outil. *Médecine Nucléaire*, 2007. 31(9): p. 478-484
- [41]. Luzzi, E., et al., New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003. 22(11): p. 810-818.
- [42]. Tombelli, S., M. Minunni, and M. Mascini, Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, 2005. 20(12): p. 2424-2434.
- [43]. Iliuk, A.B., L. Hu, and W.A. Tao, Aptamer in Bioanalytical Applications. *Analytical Chemistry*, 2011. 83(12): p. 4440-4452. 35. Mairal, T., et al., Aptamers: molecular tool.

CHAPITRE II :

*Techniques de
caractérisaion et méthodes
d'immobilisation*

Introduction

Ce deuxième chapitre s'articulera autour de trois grands points. Le premier portera sur la présentation des différentes méthodes d'immobilisation, chimiques ou physiques, de molécules à la surface d'un transducteur et plus précisément sur l'immobilisation de biorécepteurs.

Le deuxième point mettra en avant l'utilisation de nanomatériaux dans la réalisation de biocapteurs, présentant de ce fait les plus grandes familles de nanomatériaux couramment utilisés de nos jours.

Enfin le troisième et dernier point s'intéressera pour sa part à la présentation des différentes techniques électrochimiques d'analyse.

II.1. Méthodes d'immobilisation de biorécepteur

La conception d'un biocapteur nécessite l'immobilisation de l'élément de reconnaissance sur le transducteur. Le choix de la technique d'immobilisation dépend du type de matériel biologique fixé, du substrat à analyser ainsi que de la configuration du transducteur. Quelle que soit la technique utilisée, celle-ci doit conserver la conformation du matériel biologique, garantir l'accès de l'analyte et permettre la transmission du signal à travers la couche sensible immobilisée sur le transducteur.

Parmi les différentes méthodes d'immobilisation [1], on distingue :

II.1.1. Adsorption

L'adsorption physique est la méthode la plus simple qui permet l'immobilisation de l'élément biologique sur le transducteur (Figure 1). Elle met en jeu des interactions faibles de type Van der Waals, des liaisons hydrogènes, des transferts de charges ou encore des interactions homophiles entre les groupements fonctionnels de la biomolécule active et la surface du support. Dans tous les cas, il suffit de laisser en contact le biorécepteur à un pH, une force ionique et une température convenables. Il s'agit d'une technique non dénaturante qui préserve la structure de la molécule adsorbée et qui permet la régénération du biocapteur.

L'inconvénient majeur de cette technique est la faible résistance de l'assemblage. Les phénomènes de désorption sont régulièrement observés suite à des variations de conditions du milieu (pH, force ionique, température). La stabilité et la durée d'utilisation des biocapteurs ainsi obtenus se trouvent diminuées.

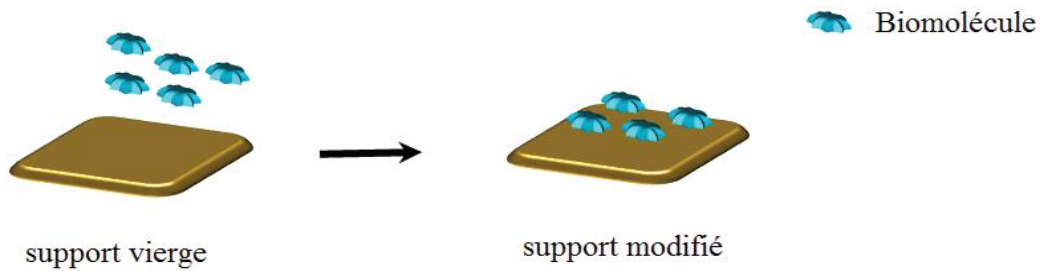


Figure II.1. Immobilisation des biomolécules par adsorption.

II.1.2. Liaison covalente

Il s'agit de créer des liaisons fortes et irréversibles entre les groupements fonctionnels du bioélément et les groupes réactifs du transducteur. Une fonctionnalisation et/ou une activation préalable, soit du biorécepteur, soit du support, est souvent nécessaire. Il est préférable de fonctionnaliser/activer le support afin de maintenir l'activité de la biomolécule [2].

Cette méthode est considérée comme une méthode simple, efficace et irréversible, toutefois elle doit faire l'objet de précautions car elle peut impliquer des changements drastiques des performances du biorécepteur en termes de sensibilité, de sélectivité et de stabilité, voire même le détruire [3].

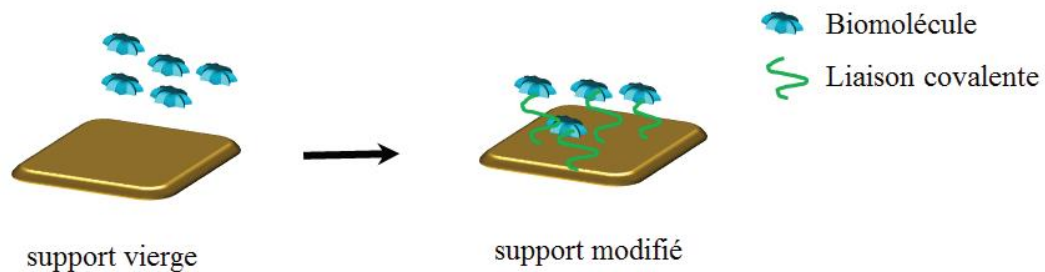


Figure II.2. Immobilisation des biomolécules par liaison covalente.

II.1.3. Le piégeage

La méthode d'inclusion physique consiste à incorporer le biorécepteur dans une matrice organique (polymère) [4], ou inorganique (le chitosane, la gélatine, l'agarose) [5-6]. La maille de la matrice assure de manière purement physique la rétention d'enzyme tout en permettant la diffusion du substrat. L'inconvénient majeur de ce type de technique réside dans l'établissement d'une résistance diffusionnelle supplémentaire qui se traduit par une baisse de la sélectivité et une augmentation des limites de détection [7]. Le relargage du biorécepteur dans le milieu réactionnel suite à la modification des conditions expérimentales telles que le

pH, la force ionique, la température ou encore la présence de solvant peut également constituer, dans certains cas, une limitation à cette technique.

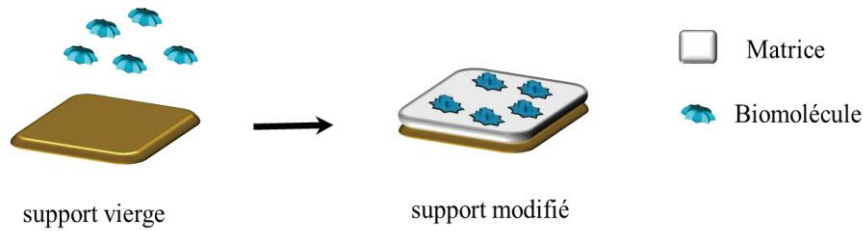


Figure II.3. Immobilisation des biomolécules par piégeage.

II.1.4. Réticulation et co-réticulation

Il s'agit dans ce cas d'immobiliser les éléments biologiques, essentiellement les enzymes, en utilisant un réticulant. Celui-ci est un agent bifonctionnel qui permet de lier les biomolécules entre elles par des liaisons chimiques, donnant ainsi des composés de hautes masses moléculaires insolubles dans l'eau. En présence d'une autre protéine inactive telle que l'albumine de sérum bovin, on parle de co-réticulation. L'utilisation de cette protéine permet, par une meilleure répartition des masses, une meilleure maîtrise de l'activité enzymatique sans altérer les propriétés mécaniques des membranes obtenues. L'agent de réticulation le plus utilisé est le glutaraldéhyde (GA) [8].

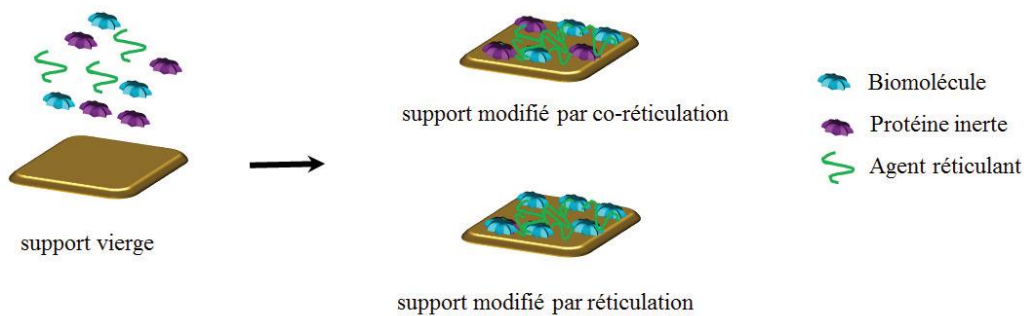


Figure II.4. Immobilisation des biomolécules par réticulation et co-réticulation.

Le GA est un liquide incolore très odorant à l'aspect huileux, soluble dans l'eau, dans l'alcool et dans le benzène. Généralement vendu sous forme de solution aqueuse contenant entre 1 et 50% de glutaraldéhyde et 0,05 à 0,5% d'un agent stabilisant comme le méthanol, il est souvent utilisé comme désinfectant ou agent de stérilisation à froid. En biologie, il est employé comme fixateur cellulaire ou agent de réticulation de protéines et particulièrement les enzymes et les aptamers. Sous ses différentes formes (libre, linéaire monohydrate et

dihydrate, hémiacétal cyclique et oligomérique...), le GA réagit essentiellement avec les groupements amines des protéines créant des ponts intra- et intermoléculaires, ce qui immobilise les molécules tout en préservant leur activité et leur conformation [9].

Il est primordial, lors de l'étape d'immobilisation par le GA, de contrôler certains paramètres tels que le temps de réticulation. En effet, pour de faibles temps de réaction, les connexions formées sont insuffisantes pour obtenir une membrane assez dense et un relargage de l'enzyme est possible. A l'inverse, pour des temps trop longs, la forte réticulation peut entraîner un changement de conformation, en particulier une déformation de la structure du site actif, affectant ainsi l'activité biologique d'aptamère.

Le GA a été abondamment utilisé, sous forme liquide [10] ou gazeuse [11], pour l'immobilisation d'aptamère ou de cellules en vue du développement de biocapteurs.

II.2. Intégration de nanomatériaux dans l'élaboration de biocapteurs

Les nanomatériaux utilisés pour l'élaboration de biocapteurs sont des structures dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm. Les nanoparticules d'or et les matériaux carbonés tels que les nanotubes de carbone sont les plus couramment utilisés dans le domaine des biocapteurs, en particulier des biocapteurs électrochimiques [12–13]. Du fait de leur petite taille et de leur forte surface spécifique, ces nanomatériaux possèdent des propriétés différentes de celles des matériaux à l'état natif. Ces propriétés modulables avec la taille s'avèrent extrêmement intéressantes.

Ces nanomatériaux interviennent, en outre, dans la miniaturisation des dispositifs ainsi que dans le développement de nouveaux systèmes d'immobilisation plus efficaces des biorécepteurs. Ils permettent également d'améliorer nettement leurs performances, en particulier leur sensibilité.

II.2.1. Les nanoparticules d'or

Sous la forme de nanoparticules, l'or présente des propriétés intrigantes que les scientifiques explorent méticuleusement depuis quelques années. On peut citer quelques-unes:

- ❖ La réactivité chimique des nanoparticules d'or et leurs propriétés d'adsorption de molécules sont directement liées à la surface des nanoparticules et en particulier aux différentes configurations possibles des atomes de surface. Généralement, lorsque la taille de la particule diminue, non seulement la proportion d'atomes de surface

augmente par rapport aux atomes de volume, mais la proportion d'atomes de coin et d'arête augmente aussi alors que celle d'atomes de plan diminue.

- ❖ des changements dans les propriétés électroniques sont induits par la diminution de la taille des particules. Les particules perdent le caractère métallique et deviennent des semi-conducteurs.

Applications

Les nanoparticules sont utilisées comme des nano-émetteurs électromagnétiques pour la transmission de l'information. Elles sont utilisées dans certaines réactions de catalyse telles que l'oxydation du CO, la réduction des NOx et la décomposition des composés organiques volatils pour la dépollution de l'air et de l'eau [14]. En médecine, les nanoparticules d'or ont favorisé l'évolution du domaine de l'imagerie [15] et du diagnostic [16,17]. En ce qui concerne les biocapteurs, les nanoparticules d'or jouent un rôle de plus en plus important aussi bien au niveau de leur miniaturisation que de l'élaboration de nouvelles stratégies d'immobilisation de biomolécules de reconnaissance, notamment des aptamers [18]. Elles offrent l'avantage d'être biocompatibles, non cytotoxiques, et facilement fonctionnalisables [19]. En général, les nanoparticules d'or minimisent le problème de diffusion, augmentent la surface de contact et la densité de greffage des biomolécules, maintiennent la stabilité et l'activité biologique de ces dernières, améliorent les transferts d'électrons, contribuant à l'augmentation de la sensibilité des biocapteurs élaborés. Ces aspects ont fait l'objet de plusieurs revues [20-21].

Les domaines d'applications des NPs d'or sont très variés. Leurs possibilités d'applications sont non seulement liées aux propriétés intrinsèques de leurs coeurs métalliques (propriétés optiques et électroniques ainsi que la variation de ces dernières en fonction de leurs tailles, leurs formes et leurs environnements), mais également à leurs grandes capacités de fonctionnalisation (Figure 5).

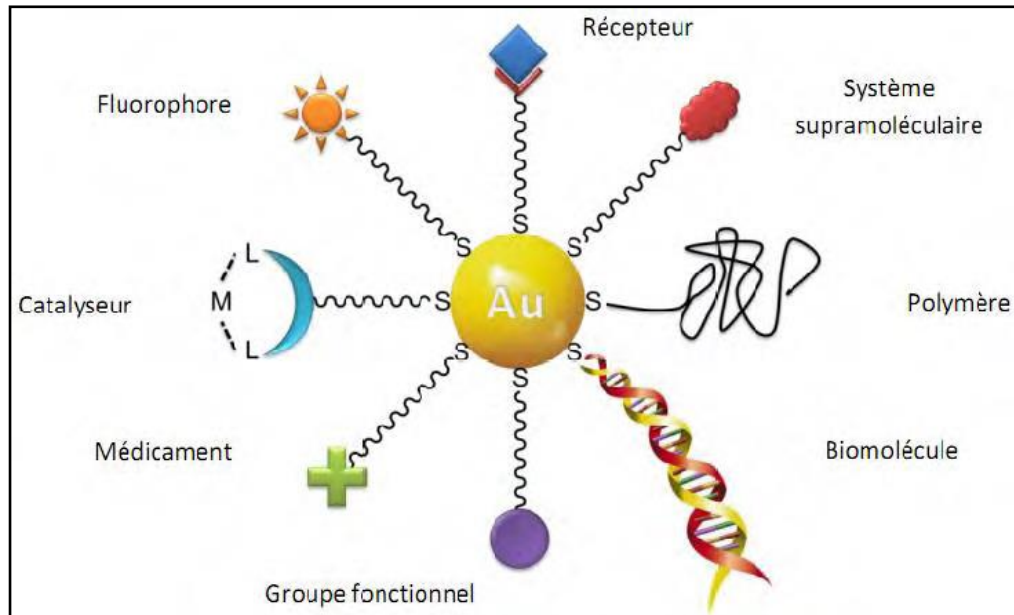


Figure II.5. Schématisation d'une nanoparticule d'or aux fonctionnalités multiples pour des applications diverses.

II.2.2. Les nanotubes de carbone

Observés pour la première fois en 1991 par Sumio Iijima, Celui-ci parle alors de microtubules de carbone graphitique en référence à la structure en forme d'épingle allongée de plusieurs microns pour un diamètre de quelques nanomètres. Ces tubes sont formés de feuillets de carbone hybridé sp^2 , appelés aussi feuillets de graphène, enroulés en cylindre (figure 6). En raison de la courbure des feuillets, les atomes de carbone possèdent aussi un caractère sp^3 partiel qui augmente avec la diminution du rayon du cylindre. On distingue deux types de nanotubes de carbone : les nanotubes de carbone mono-feuillets (SWCNT) et les nanotubes de carbone multi-feuillets (MWCNT) (figure 7). Il existe aussi des nanotubes de carbone double-feuillets aux propriétés à mi-chemin entre les deux types précédents. Les nanotubes de carbone sont dotés d'une conductivité électrique et thermique remarquablement élevées. Leur usage a permis également une grande avancée technologique dans de nombreux domaines, que ce soit en électronique ou en médecine. Les nanotubes de carbone sont par ailleurs largement utilisés pour l'élaboration de capteurs [22-23-13].

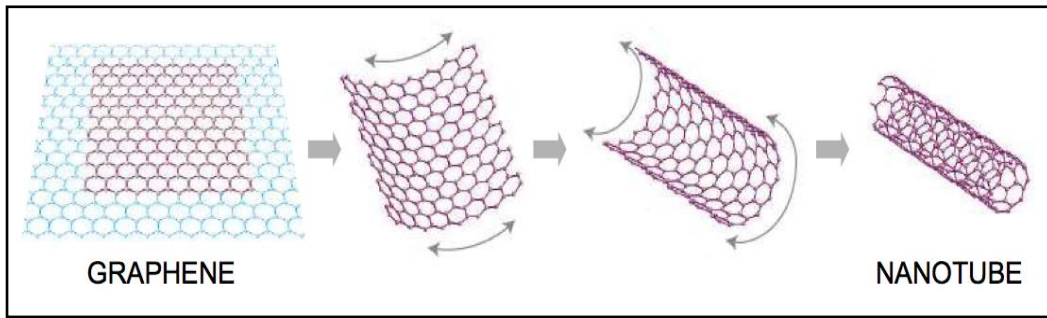


Figure II.6. Feuillette de graphène enroulée en cylindre

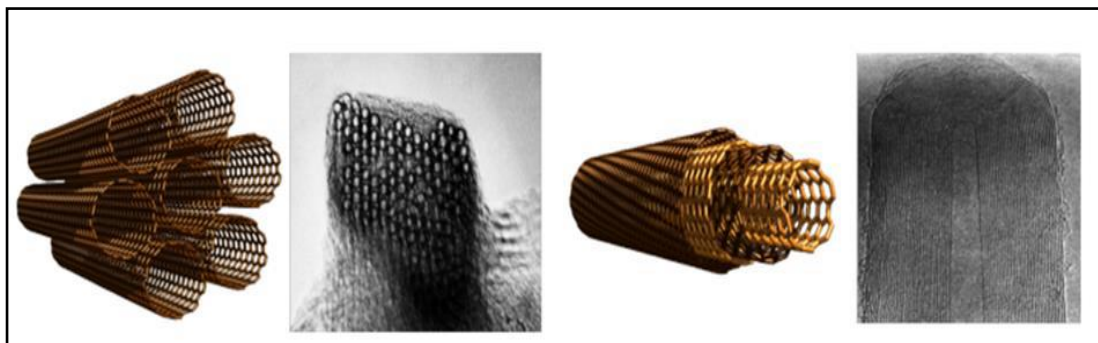


Figure II.7. A) Images TEM et représentation schématique de la structure des SWCNT ;
B) Image TEM et représentation schématique de la structure des MWCNT.

II.2.2.1. Méthodes de synthèse

Il existe deux principales méthodes de synthèse des NTC :

- ❖ **la méthode physique**, c'est la première méthode utilisée pour la synthèse des NTC.

Dans cette méthode, les atomes de carbone qui constituent les feuillets des NTC viennent de l'évaporation d'une cible de graphite. On distingue principalement deux techniques :

- l'arc électrique où l'évaporation de la cible en graphite s'effectue à l'aide d'un courant électrique.
- l'ablation laser est, comme son nom l'indique, la sublimation de la source en graphite à l'aide d'une puissante source laser.

Cette méthode a l'avantage de produire des NTC de haute qualité structurale, mais présente l'inconvénient de ne pas permettre un contrôle des caractéristiques des NTC (diamètre, longueur) et n'a qu'un faible rendement.

- ❖ **la méthode chimique** ou CCVD (Catalytic Chemical Vapor Deposition), est basée sur la décomposition d'un gaz carboné sur des particules catalytiques portées à moyenne température dans une atmosphère inerte.

Elle reste la méthode la plus utilisée actuellement car elle présente un meilleur rendement avec un meilleur contrôle sur les caractéristiques des NTC produits. Cependant, les NTC produits par cette méthode présentent plus de défauts structuraux que ceux produits par la méthode physique.

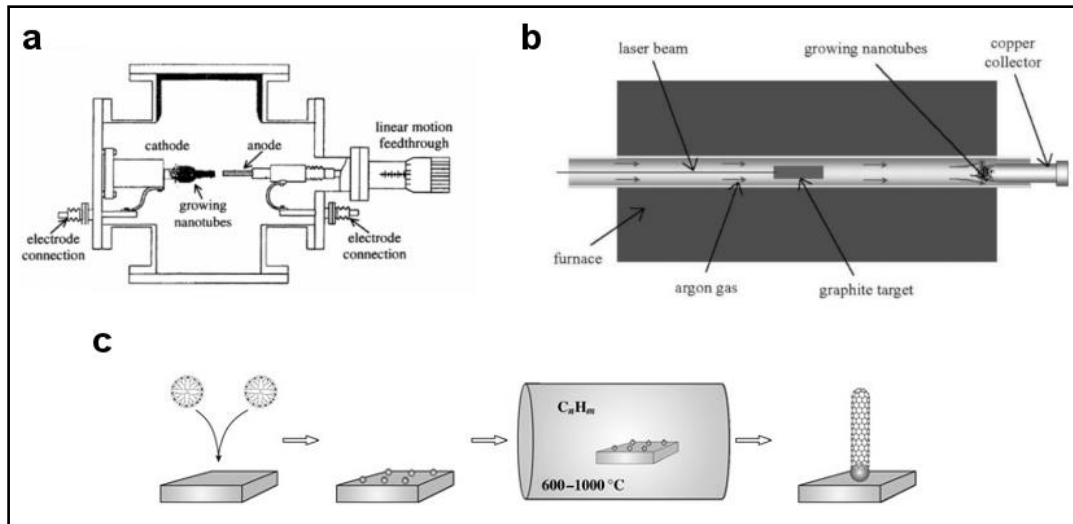


Figure II.8. a) Schéma illustrant la méthode d'arc électrique [24]. c) Schéma de la méthode de décomposition chimique en phase vapeur sur un catalyseur fixe [24]. b) Schéma du procédé d'ablation laser [25].

II.2.2.2. Fonctionnalisation des nanotubes

La fonctionnalisation joue un rôle important dans l'utilisation des CNT. En effet, elle permet de remédier à la faible solubilité des nanotubes en les rendant plus hydrophiles ou en les stabilisant grâce à la présence de diverses fonctions, choisies selon le solvant utilisé, à leur surface. La fonctionnalisation permet également de doter les nanotubes de propriétés ou d'affinités qu'ils ne possédaient pas à l'origine. C'est notamment le cas des modifications à l'aide de protéines ou d'enzymes, qui viennent offrir aux CNT une sélectivité vis-à-vis d'un substrat.

La fonctionnalisation des nanotubes de carbone peut être classée en trois catégories mettant en jeu des interactions et des liaisons spécifiques. La première fait intervenir des agents chimiques agressifs et permet une fonctionnalisation covalente des CNT. La seconde utilise les propriétés des nanotubes pour former des liaisons non-covalentes par interaction π - π principalement. Enfin la troisième recouvre l'utilisation de l'électrochimie comme agent de fonctionnalisation. Elle permet par exemple le recouvrement du CNT par un polymère. Ces différentes techniques de fonctionnalisation sont représentées au sein de la (Figure 9) ci-dessous [26].

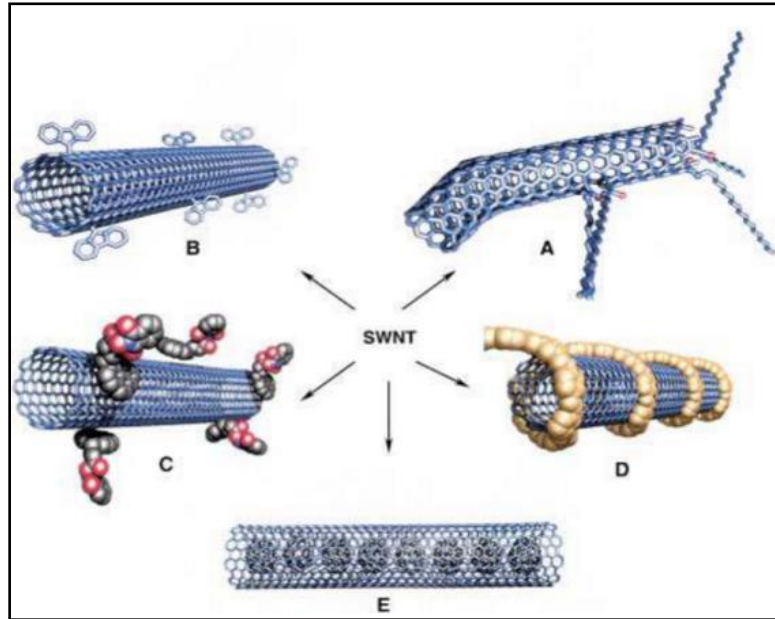


Figure II.9. Exemple de fonctionnalisation des SWCNT avec A) la fonctionnalisation des défauts, B) la fonctionnalisation covalente, C) la fonctionnalisation non-covalente, D) la fonction par des polymères et E) la fonctionnalisation endoédrique. Reproduit de [26].

II.2.2.3. Les composites à base de nanotubes de carbone

Un matériau composite est un matériau constitué de la combinaison de deux matériaux ou plus comportant une grande différence dans leurs propriétés physiques ou chimiques. Le matériau résultant possède alors des propriétés que les matériaux qui le constituent n'ont pas individuellement. Les éléments qui constituent les composites sont une matrice qui assure la cohésion et un renfort en faible charge qui sert à améliorer une propriété physique ou chimique de la matrice.

Les matériaux composites à base des nanotubes de carbone sont sujets à des études de plus en plus nombreuses.

Dans les paragraphes suivants, on s'intéressera de manière plus détaillée aux composites à base des NTC et polymère.

❖ Les composites polymère/NTC

L'idée d'améliorer les propriétés physiques des polymères avec des renforts en nanotubes

de carbone fait l'objet de nombreux travaux. L'intérêt porté pour ce type de composite est dû principalement à la maîtrise de leur fabrication à l'échelle industrielle ainsi qu'à leur faible coût. L'élaboration de ce type de composites se fait principalement par deux méthodes :

– la voie fondue, qui consiste à disperser les nanotubes de carbone dans une matrice polymère portée à l'état fondu. Cette méthode permet donc la mise en forme directe des composites par les méthodes industrielles comme le moulage, la compression ou l'extrusion. Cependant, l'ajout des nanotubes entraîne une forte augmentation de la viscosité du polymère, ce qui nécessite l'application des taux de cisaillement plus importants pour la mise en forme et conduit ainsi à la dégradation du polymère.

– la voie solvant, qui consiste à disperser les nanotubes de carbone dans une solution contenant un polymère dans un solvant, puis à contrôler l'évaporation du solvant pour conduire à la formation du composite.

Les polymères peuvent être utilisés pour améliorer la solubilité des nanotubes ou encore leur biocompatibilité sans avoir recours à l'électropolymérisation. En effet, il est possible de simplement modifier les CNT en utilisant les affinités et interactions. Ces interactions permettent d'enrouler le polymère autour du nanotube sans en modifier la structure ou les propriétés. Liu et al ont développé un système reposant sur cette méthode et ont ainsi pu recouvrir des CNT d'un polymère de chitosan [27-28] (figure 10). Le chitosan est un biopolymère présent dans la nature et largement utilisé dans la recherche. Une fois immobilisé autour du nanotube, il lui confère ainsi une meilleure solubilité mais aussi une bonne biocompatibilité qui peut s'avérer intéressante pour la réalisation de biocapteurs. NH_2^+

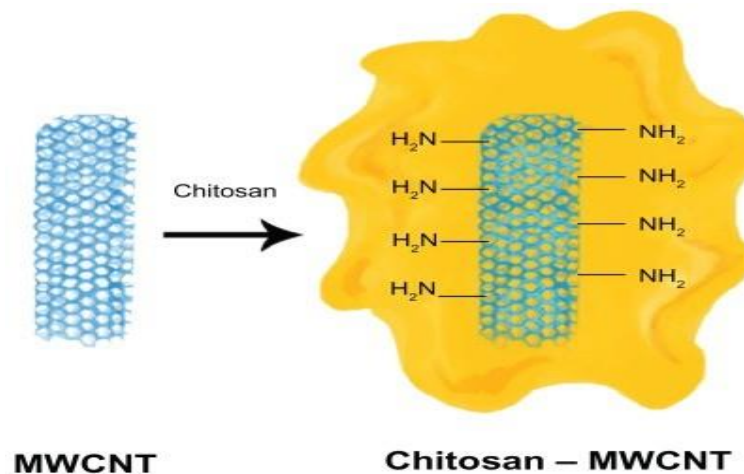


Figure II.10. Composite CNTs-Chitosan

Améliorer la conductivité électrique des polymères est un but très recherché dans plusieurs applications comme la dissipation des charges statiques dans des parties extérieures de voitures ou les boîtiers d'ordinateurs. En raison de leur grande conductivité électrique et leur grand rapport d'aspect, l'utilisation des NTC comme renfort dans des matrices polymères

a montré la possibilité d'obtenir de très faibles seuils de percolation, ces derniers correspondent à la charge à partir de laquelle on observe une augmentation brutale de la conductivité électrique.

II.3. Le chitosane

II.3.1. origine et obtention

Le chitosane est le dérivé le plus industrialisé de la chitine (découverte au 18^{ème} siècle). La chitine est extraite généralement des carapaces de crustacés, des cuticules d'insectes et de la paroi cellulaire des champignons. Le carbonate de calcium (CaCO_3) étant l'un des principaux composants des carapaces et enrobant la chitine, l'extraction de cette dernière commence par une étape de déminéralisation en utilisant une solution acide (HCl par exemple) pour enlever le carbonate de calcium [30]. Selon l'origine, divers allomorphes de la chitine ont été distingués (α , β et γ) selon la différence d'organisation structurale/spatiale des chaînes de la chitine, ce qui induit une différence de propriétés [29,30–31]. La déminéralisation est suivie d'une étape de désacétylation par une solution basique (souvent NaOH) pour obtenir le chitosane. Une étape de purification est nécessaire et consiste en un traitement enzymatique pour éliminer les protéines et un lavage supplémentaire pour supprimer le reste des pigments [32].

II.3.2. structure et propriétés

Le chitosane est un biopolymère macromoléculaire composé d'un enchaînement hétérogène de deux monomères : D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine, liés par des liaisons $\beta(1-4)$ (Figure 11).

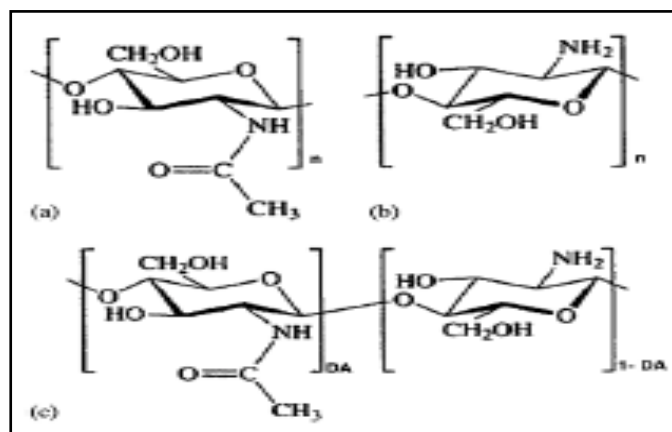


Figure II.11. Structure chimique du N-acétyl-D-glucosamine (a), de D-glucosamine (b) et du chitosane (c) [29].

Le chitosane possède une structure chimique très similaire à celle de la cellulose ; la seule différence se situe au niveau du carbone C2 où le groupement hydroxyle de la cellulose est remplacé par un groupement amine (NH_2) pour le chitosane 100% désacétylé et acétamide ($-\text{NHAc}$) pour le chitosane partiellement désacétylé. Les propriétés du chitosane dépendent fortement de l'origine de la chitine et de sa structure chimique et moléculaire [31,33]. Il est ainsi nécessaire de définir les paramètres qui les qualifient, tels que la masse moléculaire et le degré d'acétylation.

En effet, c'est un biopolymère naturel polycationique, non toxique, biodégradable et biocompatible. Contrairement à la chitine qui est insoluble, le chitosane est soluble en milieu acide. La solubilisation s'effectue grâce à la fonction amine (NH_2) placée en C2 sur l'unité D-glucosamine qui capte un proton pour se charger positivement. Cette particularité lui permet de réagir avec tous les composés biologiques chargés négativement et ainsi les fixer solidement par liaison ionique. Cela lui permet d'être utilisé comme agent antibactérien.

II.4. Techniques électrochimiques d'analyse

II.4.1. L'impédancemétrie

La spectroscopie d'impédance électrochimique est une technique non destructive adaptée à l'étude des propriétés électriques interfaciales. Elle permet de différencier les divers phénomènes susceptibles de se produire dans la cellule électrochimique en fonction de la fréquence. Le transfert de charge qui a lieu entre l'interface et l'électrode est défini comme un phénomène rapide qui se produit à hautes fréquences, tandis que le transport de matière qui a lieu entre l'interface et l'électrolyte, est défini comme un phénomène plutôt lent qui se déroule à basses fréquences [34-35]. La mesure de l'impédance s'effectue dans une cellule classique à trois électrodes (Figure 12).

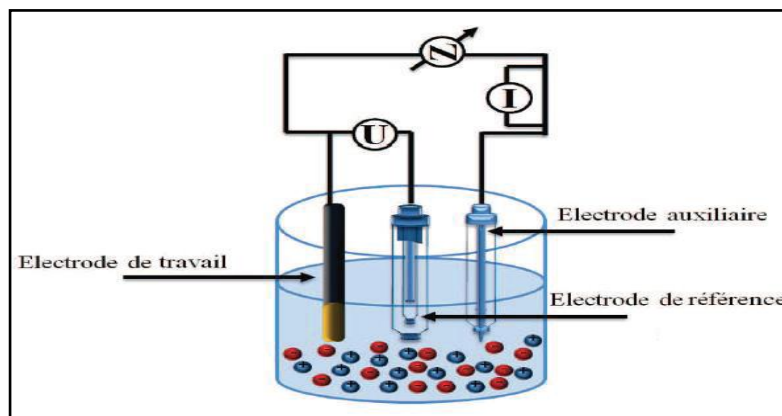


Figure II.12. Principe de la détection impédancemétrique.

La perturbation imposée est classiquement sinusoïdale. Le signal appliqué est donc de la forme :

$$\mathbf{x}(t) = \mathbf{A} \sin(\omega t) \quad (\text{Equation II.1})$$

La réponse du système est :

$$\mathbf{y}(t) = \mathbf{B} \sin(\omega t + \varphi) \quad (\text{Equation II.2})$$

avec une fréquence f , une pulsation $\omega = 2\pi f$ et un déphasage φ . L'impédance électrochimique se définit comme étant le nombre complexe $Z(\omega)$:

$$\mathbf{Z}(\omega) = \Delta \mathbf{E}(\omega) / \Delta \mathbf{I}(\omega) \quad (\text{Equation II.3})$$

où, en mode potentiostatique, $\Delta E(\omega)$ est la perturbation imposée à un potentiel choisi E , et $\Delta I(\omega)$ la réponse en courant du système étudié avec une composante continue I . L'impédance $Z(\omega)$ est un nombre complexe qui peut être écrit sous deux formes équivalentes:

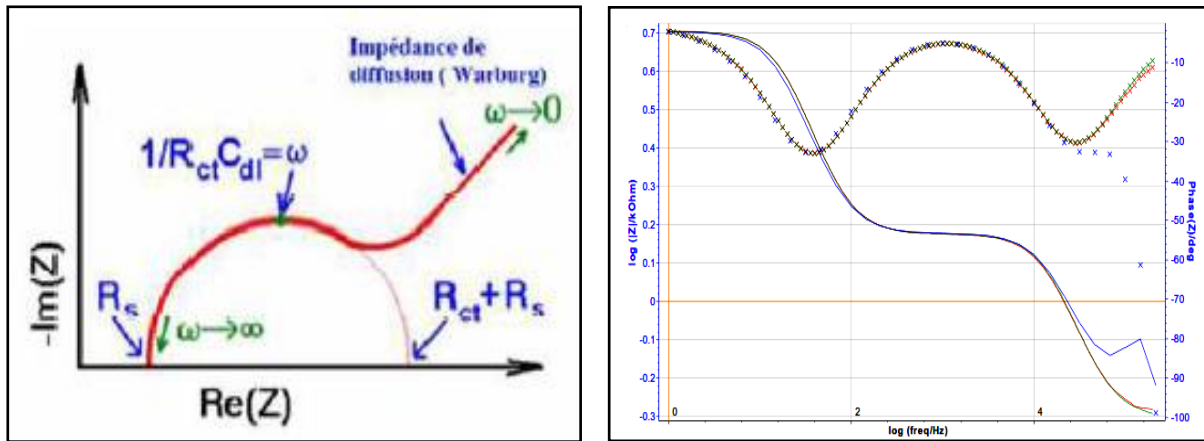
$$\mathbf{Z}(\omega) = |\mathbf{Z}(\omega)| e^{j\varphi(\omega)} \quad (\text{Equation II.4})$$

ou

$$\mathbf{Z}(\omega) = \mathbf{Z}_r(\omega) + j \mathbf{Z}_i(\omega) \quad (\text{Equation II.5})$$

$|Z|$ étant le module de l'impédance, φ le déphasage, ω la vitesse angulaire appelée aussi pulsation, Z_r la partie réelle et Z_i la partie imaginaire. Plusieurs types de diagrammes sont utilisés pour représenter l'impédance électrochimique $Z(\omega)$. Le diagramme de Nyquist est obtenu en traçant l'opposé de la partie imaginaire de l'impédance $-Z_i(\omega)$ en fonction de sa partie réelle $Z_r(\omega)$. Le diagramme de Bode est obtenu en traçant respectivement $\log |Z(\omega)|$ et la phase en fonction de $\log(\omega)$ ou $\log(f)$. Ces deux modes de représentation de l'impédance donnent des visualisations des résultats différentes mais restent complémentaires.

La représentation de Nyquist permet de voir les différentes « boucles et droites du diagramme mais masque les résultats haute fréquence alors que la représentation de Bode offre la vision complète du domaine de fréquence, tout en étant moins parlante pour identifier certains phénomènes caractéristiques (figure 13 a,b)



a) Diagramme de Nyquist

b) Diagramme de Bode

Figure II.13. (a,b). Représentation graphique des diagrammes de Nyquist et de Bode.

II.4.1.1. L'impédance de différents phénomènes électrochimique

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) permet d'étudier les paramètres électriques de l'interface métal/électrolyte. Le système électrochimique utilisé est une cellule à trois électrodes.

❖ Résistance de la solution

Du côté de l'électrode, le potentiel est constant en tout point de la surface. Par contre, dans la solution, il se crée une variation de potentiel et de courant dans l'électrolyte, qui conduit au concept de chute ohmique. En SIE, l'électrode de référence et la contre-électrode sont placées relativement loin de la surface de l'électrode de travail. A haute fréquence, la répartition des courants secondaires peut donc être négligée.

La chute ohmique est alors classiquement décrite comme étant la résistance de la solution et des contacts électriques R_s . L'impédance de la chute Ohmique est :

$$Z_{R_s, \omega} = R_s \quad (\text{Equation II.6})$$

❖ Capacité de la double couche

Un phénomène observé à l'interface électrode/électrolyte est la formation d'une double couche d'ions [36]. L'application d'une perturbation sinusoïdale lors de la mesure d'impédance entraîne la charge et la décharge de cette couche qui se comporte, selon le modèle de Stern [37], comme un condensateur électrique. La réponse de cette double couche génère un courant I_{dc} qui dépend de la fréquence de perturbation et de la variation de charge interfaciale. Ce type de processus peut être généralisé à tous les phénomènes qui entraînent la

charge et la décharge de deux zones séparées par un diélectrique. L'impédance d'un condensateur de capacité C est donnée par l'équation :

$$Z_{CaI} \cdot \omega = \frac{1}{jC\omega}, \text{ avec } C_{aI} = \epsilon\epsilon_0 \frac{A}{e} \quad (\text{Equation II.7})$$

Où C_{aI} est la capacité de la double couche, ϵ la permittivité relative du diélectrique, ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide, A l'aire de réaction électrochimique à l'électrode de travail et e l'épaisseur du diélectrique.

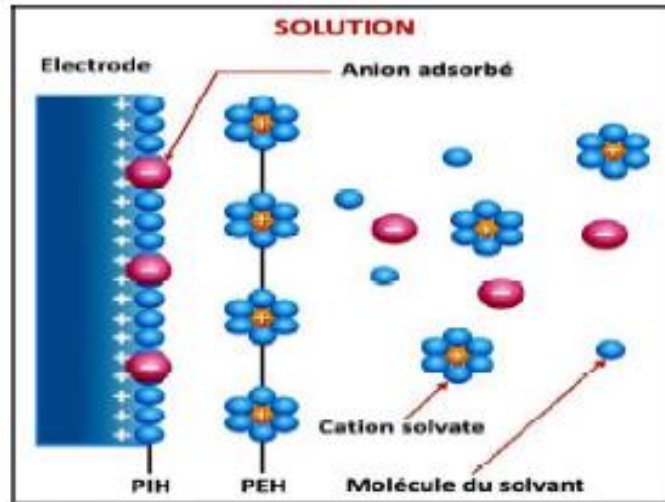


Figure II.14. Structure de la double couche.

❖ **Résistance de transfert de charge R_{tc}**

L'impédance électrochimique traduit la contribution électrochimique du système à la réponse électrique observée [38], elle comprend toujours une résistance au transfert d'ions et d'électrons impliquée dans la dissolution, appelée résistance de transfert de charge R_{tc} ,

❖ **Impédance de Warburg**

L'impédance de Warburg est l'impédance résultant de la diffusion d'une espèce de la solution à l'électrode. C'est le premier élément électrochimique qui a été présenté dans la description de l'impédance de la diffusion semi-infinie. Cette impédance dépend de la fréquence de la perturbation, du potentiel appliqué et de la concentration des espèces qui diffusent. L'expression de l'impédance de Warburg est donnée par l'expression suivante :

$$Z_w = \sigma \mathbf{1} - \mathbf{j} \omega^{-0.5} \quad (\text{Equation II.8})$$

Avec σ est le coefficient de Warburg.

II.4.1.2. Modélisation de l'impédance

Les spectres d'impédance obtenus pour n'importe quelle interface, peuvent être modélisés par un circuit électrique équivalent. Les paramètres du modèle peuvent être obtenus en ajustant la courbe expérimentale avec la courbe théorique. De façon générale, vis-à-vis d'une faible excitation sinusoïdale, une cellule électrochimique équivaut simplement à une impédance qui peut être représentée par un circuit électrique équivalent. Le modèle de Randles est le circuit le plus couramment utilisé pour décrire une cellule électrochimique [39]. Il se compose de quatre éléments : une résistance représentant la résistance due à la chute ohmique (**R_s**), un condensateur représentant la capacité de double couche (**C_{dl}**), une résistance de transfert de charge (**R_{ct}**), et l'impédance de Warburg (**Z_w**) représentant le phénomène de diffusion des espèces redox.

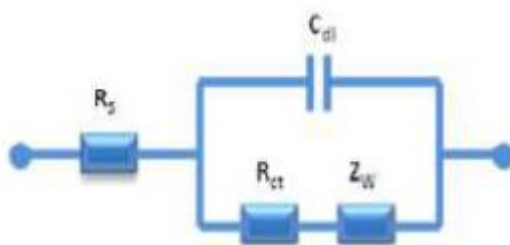


Figure II.15. Circuit équivalent de Randles

II.4.2. La voltamétrie

La voltamétrie est une technique d'électroanalyse basée sur la mesure du flux de courant résultant de la réduction ou de l'oxydation des composés, présents dans la solution sous l'effet d'une variation contrôlée de la différence de potentiel appliquée entre deux électrodes spécifiques. Elle permet d'une part d'identifier un grand nombre de composés (cations, certains anions, composés organiques) et de déterminer leurs concentrations d'autre part, sans oublier son rôle dans l'étude cinétique des réactions mises en jeu.

II.4.2.1. Composants et principes des techniques voltamétriques

Les unités de base d'un analyseur voltamétrique sont illustrées par (figure 16). Elles sont composées par :

- ❖ Une cellule électrochimique de mesure comportant trois électrodes immergées dans la solution à analyser.

- ❖ Un circuit électronique, appelé potentiostat, permettant de modifier le potentiel et d'enregistrer le courant.

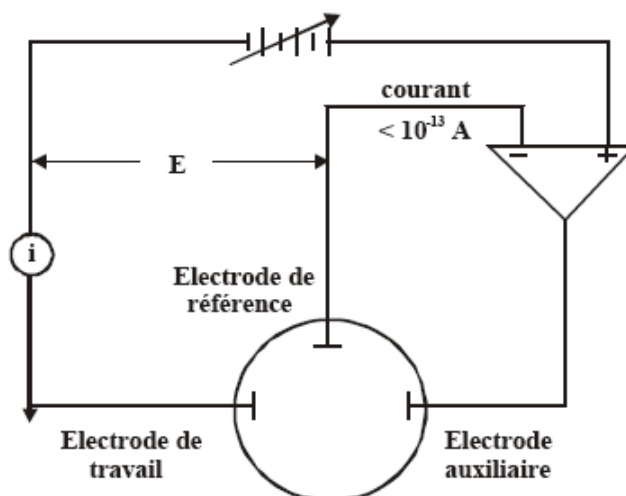


Figure II.16. Représentation schématique du circuit électronique d'un potentiostat.

II.4.2.2. Analyses voltamétriques [40]

Les techniques voltamétriques sont basées sur l'enregistrement du courant I , qui passe entre une électrode de travail (WE) et une électrode auxiliaire (AE), dû à la réduction ou à l'oxydation de l'élément à analyser.

Les différentes techniques voltamétriques découlent des innovations portant sur la façon dont le signal $E=f(t)$ est imposé et le signal $i=f(E)$ mesuré, qui ont été développées dans le but d'obtenir un rapport $i(\text{Faradique}) / i(\text{capacitif})$ maximal, afin d'augmenter la sensibilité.

En voltamétrie, le potentiel E appliqué à l'électrode de travail varie en fonction du temps selon la relation :

$$E = E_i \pm vt \quad (\text{Equation II.9})$$

Où v est la vitesse de variation de potentiel, $v = dE/dt$, t est le temps et E_i le potentiel de départ. Le courant i est mesuré en fonction du potentiel E . Les courbes $i=f(E)$ obtenues sont appelées des voltammogrammes.

La variation du potentiel E peut être linéaire ou modulée, donnant lieu à des techniques possédant des caractéristiques différentes. Le courant i dans le circuit est principalement la somme de deux courants : le courant faradique, i_f , et le courant capacitif.

La technique voltamétrique utilisée dans ce travail est :

❖ La voltamétrie cyclique :

Le principe de la voltamétrie cyclique est comparable à la voltamétrie linéaire, mais le balayage des potentiels s'effectue de façon cyclique. Par exemple, après avoir balayé vers les valeurs de potentiel anodiques et réalisé une oxydation, on inverse le sens de variation du potentiel effectué pour une exploration vers les potentiels cathodiques. On enregistre donc sur le voltammogramme les courbes de polarisations anodiques et cathodiques du système. Cette méthode consiste à analyser le comportement électrochimique d'un système en appliquant à une électrode un balayage de potentiel variant avec le temps et enregistré $I(E)$, ceci revient à construire une surface tridimensionnelle $[I, E, t(E(t))]$.

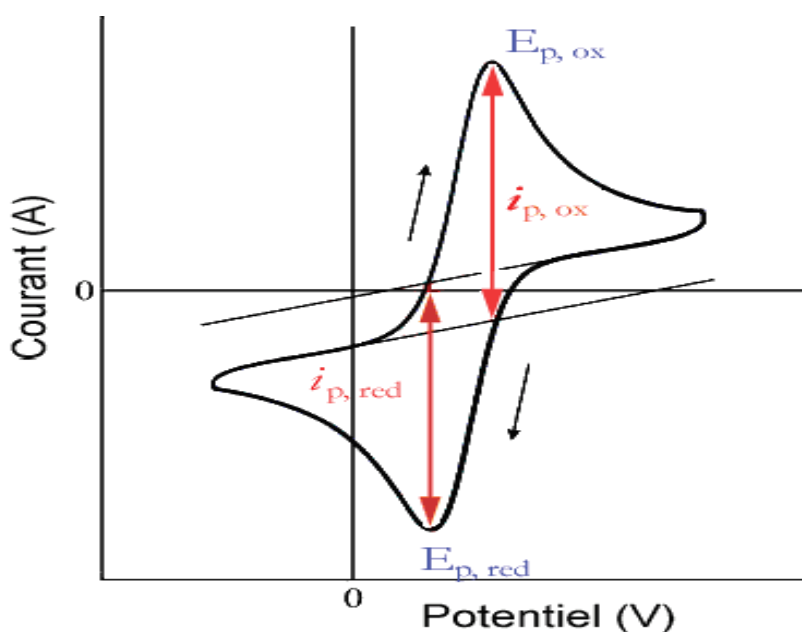


Figure II.17. Représentation typique d'un voltammogramme

Le signal électrique est fourni par un générateur qui délivre une tension en « dents de scie », les balayages anodiques et cathodiques sont alors réalisés à la même vitesse. Mais il est également possible d'effectuer un balayage allé lent et revenir rapidement.

La voltamétrie est largement utilisée sur le plan fondamental par des chimistes inorganiciens, des physico-chimistes et des biochimistes qui étudient le mécanisme et la cinétique des réactions d'oxydation et de réduction dans divers milieux, et celui du processus d'adsorption et de transfert électronique sur des surfaces chimiquement modifiées.

Conclusion

A travers ce chapitre, nous avons décrit dans une première partie les principales méthodes d'immobilisation des biomolécules d'intérêt à la surface de transducteurs ainsi que les avantages et inconvénients liés à chacune de ces techniques. En effet, si il existe des techniques dites douces, telle que l'adsorption, celles-ci n'assurent pas une bonne sélectivité et une bonne immobilisation dans le temps. A l'inverse, le greffage chimique, par formation d'une liaison covalente, assure une bonne adhésion du biorécepteur mais peut dénaturer ce dernier. Nous avons également pu voir que la technique d'immobilisation utilisée dépend fortement de l'état de surface du transducteur et de sa nature chimique. Il faut donc prendre en compte ces différents aspects afin d'utiliser la technique en adéquation avec le but visé.

Nous avons traité dans la deuxième partie des différents nanomatériaux d'intérêt pouvant apporter un plus dans la conception de biocapteurs.

Enfin, nous avons présenté les différentes techniques électrochimiques utilisées au cours de cette thèse.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographiques

- [1] S.B. Nimse, K. Song, M.D. Sonawane, D.R. Sayyed, T. Kim, Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications, *Sensors*. 14 (2014) 22208–22229.
- [2] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech*. 3 (2013) 1–9.
- [3] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 489–511.
- [4] A. Bratov, N. Abramova, J. Munor, C. Domínguez, S. Alegret, J. Bartrolí, *Anal. Chem* 1995, 67, 3589-3595.
- [5] Wan. K, Chovelon. J. M, Jaffrezic-Renault. N, Soldatkin. A.P, *Sens. Actuators B*, 1999, 58, 399- 408.
- [6] Besombes .J. L, Cosnier. S, Labbe. P, *Talanta*,1997, 44, 2209- 2216.
- [7] Lei. Y, Chen. W, Mulchandani. A. *Anal. Chim. Acta* 2006, 568, 200-210.
- [8] I. Migneault, C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, K.C. Waldron, Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques*. 37 (2004) 790–802.
- [9] V.I.A. David R. Walt, The Chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, *TrAC Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 425–430.
- [10] M.-C. Radulescu, B. Bucur, M.-P. Bucur, G.L. Radu, Bi enzymatic biosensor for rapid detection of aspartame by flow injection analysis, *Sensors*. 14 (2014) 1028–1038.
- [11] M. Sheliakina, V. Arkhypova, O. Soldatkin, O. Saiapina, B. Akata, S. Dzyadevych, Urease-based ISFET biosensor for arginine determination, *Talanta*. 121 (2014) 18–23.
- [12] S.A. Bhakta, E. Evans, T.E. Benavidez, C.D. Garcia, Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: a review, *Anal. Chim. Acta*. 872 (2015) 7–25.

Références bibliographiques

- [13] C. Yang, M.E. Denno, P. Pyakurel, B.J. Venton, Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review, *Anal. Chim. Acta.* 887 (2015) 17–37.
- [14] F.F. Tao, Z. Ma, Water-gas shift on gold catalysts: catalyst systems and fundamental studies, *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP. 15 (2013) 15260–15270.
- [15] L.E. Cole, R.D. Ross, J.M. Tilley, T. Vargo-Gogola, R.K. Roeder, Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography, *Nanomed.* 10 (2015) 321–341.
- [16] H. Daraee et al, Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery, *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* (2014) 1–13.
- [17] M.S. Khan, G.D. Vishakante, null Siddaramaiah H, Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 199-200 (2013) 44–58.
- [18] Juan Zhang Lihua Wang Dun Pan Shiping Song Freddy Y. C. Boey Hua Zhang Chunhai Fan Visual Cocaine Detection with Gold Nanoparticles and Rationally Engineered Aptamer Structures ;_31 July 2008
- [19] V.K.K. Upadhyayula, Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents: a review, *Anal. Chim. Acta.* 715 (2012) 1–18.
- [20] W. Putzbach, N.J. Ronkainen, Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review, *Sensors.* 13 (2013) 4811–4840. d
- [21] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, Nanomaterials for biosensing applications: a review, *Front. Chem.* 2 (2014) 63.
- [22] S. Kruss, A.J. Hilmer, J. Zhang, N.F. Reuel, B. Mu, M.S. Strano, Carbon nanotubes as optical biomedical sensors, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1933–1950.
- [23] T. Sarkar, Y. Gao, A. Mulchandani, Carbon nanotubes-based label-free affinity sensors for environmental monitoring, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170 (2013) 1011–1025.
- [24] Ma W, Yang C, Gong X, Lee K, Heeger AJ. *Adv Funct Mater* 2005;15:1617-1622.
- [25] Yu MF, Lourie O, Dyer MJ, Moloni K, Kelly TF, Ruoff SR. *Science* 2000;287:637-640.

Références bibliographiques

- [26] Hirsch, A. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1853–1859.
- [27] Liu, Y.; Wang, M.; Zhao, F.; Xu, Z.; Dong, S. The Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase and Glucose Biosensor Based on Carbon Nanotubes/chitosan Matrix. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 984–988.
- [28] Liu, Y.; Tang, J.; Chen, X.; Xin, J. H. Decoration of Carbon Nanotubes with Chitosan. *Carbon* **2005**, 43, 3178–3180.
- [29] Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog Polym Sci* 2006; 31:603–32.
- [30] Kurita K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Mar Biotechnol* 2006; 8:203–26.
- [31] Badot P-ε, Crini G, Guibal É. Chitine et chitosane: Du biopolymère à l’application. Presses Univ. Franche-Comté; 2009. ISBN 978-2-84867-249-6.
- [32] Mochizuki M, Kadoya Y, Wakabayashi Y, Kato K, Okazaki I, Yamada M, Sato T, Sakairi N, Nishi N, Nomizu M. Laminin-1 peptide-conjugated chitosan membranes as a novel approach for cell engineering. *FASEB J* 2003; 17:875–7.
- [33] Jaworska M, Sakurai K, Gaudon P, Guibal E. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties. *Polym Int* 2003; 52:198–205.
- [34] Dimitrios Karpouzias. G, Singh. K.B, *Adv Microb Phys* 2006 51, 134-137.
- [35] Kumar. J, D’Souza. S. F, *Biosens. Bioelectron* 2011, 26, 4289 - 4293.
- [36] Amokrane. S, Badiali. J. P, *Plenum press* 1992, 22, 1– 91.
- [37] Bousse. L, De Rooij. N.F, Bergveld. P, *IEEE Trans. Electron Devices* 1983, 30, 1263-1270.
- [38] : DAVID LOVEDAY, PETE PETERSON, BOB RODGERS. Evaluation of Organic Coatings with Electrochemical Impedance Spectroscopy part 1: fundamental of electrochemical impedance spectroscopy. *JCT Coatings Tech.*
- [39] Randles. J, *Discuss. Faraday Soc* 1947, 1, 11.
- [40] H.H. Girault, *Electrochimie : physique et analytique*, 2001.

CHAPITRE III :

*Elaboration d'un biocapteur
à base d'aptamère pour la
détection de cadmium*

Introduction

Nous présenterons dans ce chapitre les résultats expérimentaux sur l'application de biocapteur électrochimique à base d'aptamère pour la détection de cadmium. Nous décrirons tout d'abord le protocole d'immobilisation de biorecepteur à la surface de transducteur. Ensuite, nous présenterons les résultats de caractérisation par la CV et EIS. Nous poursuivrons en exposant les résultats expérimentaux obtenus pour la détection de cadmium aussi la sensibilité, limite de détection et la sélectivité.

III.1 Matériels et méthodes

III.1.1 Réactifs

Les nanotubes de carbone CNTs ont été préparés dans (laboratoire de biologie moléculaire Constantine). Ces CNTs sont fonctionnalisés avec des groupements carboxyles (COOH) ; chitosan (CS) ; glutaraldehyde (0.25%) ; PBS (pH=4.5) ; H₂AuCl₄ ; Na₂SO₄ ; sulfate de cadmium ; ont été achetés auprès de Sigma – Aldrich France. L'aptamère du cadmium a été synthétisé et acheté par Microsynth (Suisse). La séquence spécifique de l'aptamère était la suivante: Séquence d'aptamère (5' modifiée en amino): 5'-ACC GAC CGT GCT GGA CTC TGG ACT GTT GTG GTA TTA TTT TTG GTT GTG CAG TAT GAG CGA GCG TTG CG-3'.

III.1.2 Transducteur

Dans ce travail, nous avons utilisé une électrode en carbone vitreux, avec un diamètre de (3mm) comme électrode de travail dans laquelle les processus électrochimique à explorer. le carbone vitreux est considéré comme un bon matériau pour différentes applications en raison de ces propriétés physiques et chimiques telle que sa haute résistance aux températures élevées (jusqu'à 3.000 °C sous gaz inerte). Il est même plus résistant à température élevée qu'à température ambiante. Il présente également une extrême résistance à l'oxydation, à la corrosion et aux attaques chimiques [1].



Figure III.1. Electrode de travail en carbone vitreux.

III.1.3 Mesures électrochimique

Toutes les mesures électrochimiques de spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) et de la voltammétrie cyclique (CV) ont été réalisées avec un potentiostat (Biologic EC-Lab SP-300) (figure 2). Toutes les expériences ont été mesurées à la température ambiante. La modélisation des données EIS obtenues a été réalisée par le logiciel EC-Lab utilisant la méthode Randomize + Simplex. Ici, randomize a été arrêté sur 100 000 itérations et l'ajustement sur 5000 itérations.



Figure III.2. Potentiostat/galvanostat utilisé pour les mesures.

Elaboration d'un biocapteur a base d'aptamère pour la détection de cadmium

La cellule électrochimique de (25cm³) utilisée consiste de trois électrodes (figure 3):



Figure III.3. Cellule électrochimique.

- **L'électrode de travail :**

Electrode de travail (est encore nommée électrode indicatrice) ou s'effectué la réaction redox, est une électrode sur laquelle on examine les différents processus électrochimiques à explorer, lavée avant chaque enregistrement avec l'acétone et l'eau distillée et nettoyée par un papier abrasif.

- **Contre électrode**

L'électrode auxiliaire un fil de platine de 1mm de diamètre, permettant au courant de traverser la cellule sans endommager l'électrode de référence et d'autre part de minimiser les effets de la chute ohmique.

- **Électrode de référence**

Pour les solutions aqueuses, l'électrode de référence adoptée par convention internationale pour exprimer les potentiels d'électrode relatifs est l'Électrode Normale à Hydrogène (ENH), correspondant au système électrochimique:



Dans la pratique, l'ENH étant d'une utilisation difficile, on lui préfère des électrodes de référence «opérationnelles» basées sur d'autres systèmes électrochimiques. Pour les solutions aqueuses, les deux principales sont:

- ✓ Hg/Hg₂Cl₂/KCl saturé, électrode de référence au calomel (ECS).

Elaboration d'un biocapteur a base d'aptamère pour la détection de cadmium

- ✓ Ag/AgCl/KCl saturé, électrode de référence au chlorure d'argent (Ag/AgCl)

Enfin, l'électrode de référence sert uniquement à mesurer des variations de potentiel car elle reste à un potentiel fixe grâce à une concentration maintenue constante en ions en son sein.



Figure III.4. Électrode de référence (a) et contre électrode (b).

III.1.4 Protocole de nettoyage d'électrode de travail

La propreté du milieu ainsi que le matériel utilisé est une étape préliminaire pour réussir les manipulations. Le nettoyage de l'électrode se fait en deux étapes ; la première étape l'électrode a été nettoyée en utilisant un papier de polissage. Ensuite ; dans une deuxième étape l'électrode a été nettoyée électrochimiquement avec une solution NaOH (0,5M), dont la surface de carbone vitreux est alors activée en milieu basique en imposant une série de balayages en potentiel de (-0.8V à +0.8V) à une vitesse de 50mV/s pendant 10 cycles, ce qui permet de produire de l'hydrogène à la surface par l'électrolyse de l'eau dans la soude et conduit à une surface propre et réduite, la stabilisation du voltamogramme indique la fin du nettoyage et que toute les impuretés sont désorbées.

III.2. Préparation du biocapteur

•Préparation du film

5mg de nanotubes de carbone ont été dispersés dans 10ml d'une solution de chitosan (0.2%) (figure5).

Elaboration d'un biocapteur a base d'aptamère pour la détection de cadmium

*La solution de chitosan à été préparée par dissolution d' 1mg de chitosan dans 40ml d'une solution tampon d'acétate, ensuite soumis 30 mn d'ultrason, puis filtrée avec un papier filtre de 11 μ m de diamètre.

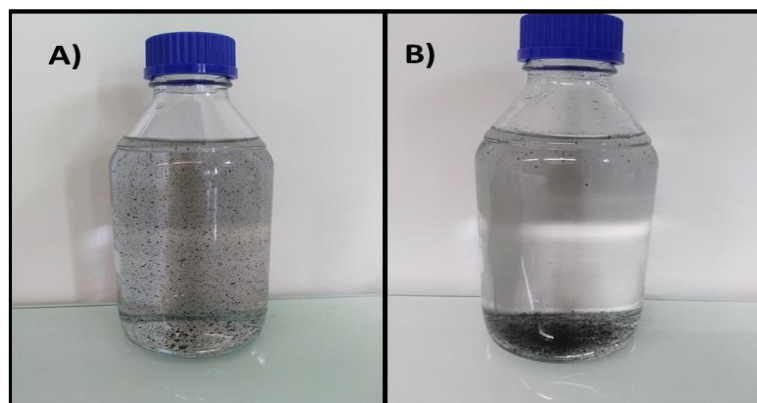


Figure III.5. Photos de la suspension de nanotubes de carbone dans le chitosan soumise à 30 min d'ultrasons, A) avant repos et B) après 24h de repos.

Le GCE à été modifié avec une goutte de 6 μ l de la solution de (CS-CNTs 0.5mg.ml⁻¹). Après avoir été séchée à l'air, l'électrode à été immergée dans une solution de Na₂SO₄ (0.2M) contenant 0.1mM de HAuCl₄; Les AuCl₄⁻ adsorbés sur le film de (CS-CNTs) ont été converti en nanoparticules d'or avec électrodéposition potentiostatique à l'aide de chronoampéromètre pendant 400s à -0.2V [2] (Figure 6).

Après le dépôt des NPs d'or ; l'électrode à été lavée doucement avec l'eau distillée et séchée à l'air à température ambiante.

• Immobilisation d'aptamer

Une goutte de 6 μ l de solution de chitosan (0.2%) à été abandonnée sur le film (Au NPs-CNTs-CS) et séché à l'air à température ambiante. Puis l'électrode modifiée à été incubée dans une solution de glutaraldehyde de (0.25%) pendant 2h [2]. Après avoir été lavée à l'eau et séchée, l'électrode à été incubée dans l'aptamer (0.75 μ M) pendant une nuit. Ensuite lavée avec PBS (pH=4.5). L'aptamère est préalablement activé à 90°C pour 10mn ensuite 30mn à T°ambiante

Elaboration d'un biocapteur a base d'aptamère pour la détection de cadmium

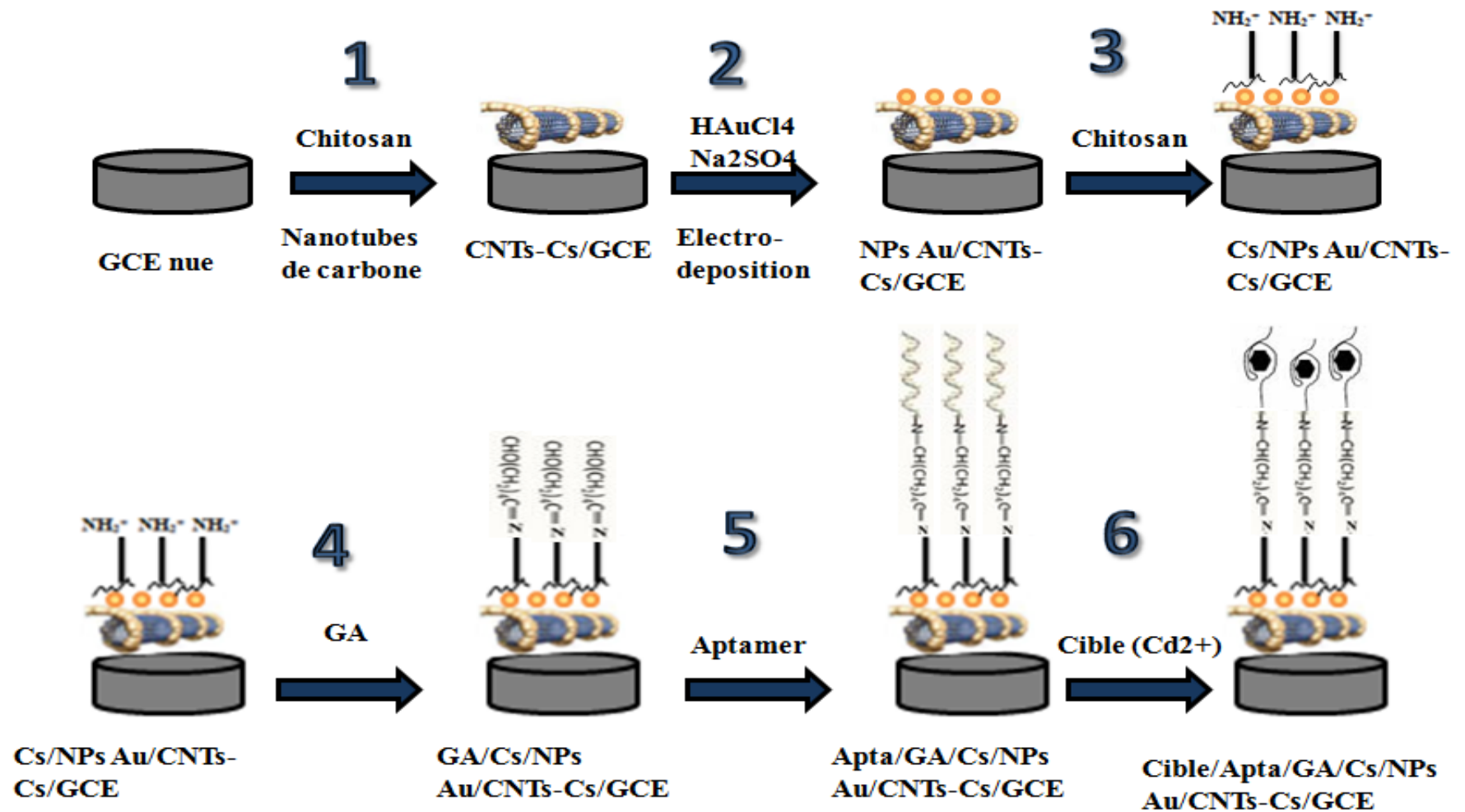


Figure III.6. Représentation schématique des différentes étapes de la conception du biocapteur pour la détection de cadmium.

III.3. Résultats et discussions

III.3.1. Caractérisation des nanotubes de carbone

Les échantillons de NTCs (MWCNT) et NTCs-COOH (MWCNT-COOH) synthétisé ont été caractérisés par différentes techniques physico-chimiques comme, la diffraction a rayon X (DRX) et La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). L'association ces deux technique permet de caractériser les différentes fonctions présentes ainsi la structure avant et après la fonctionnalisation des NTCs-brut avec un groupe carboxyle (-COOH) par traitement dans le mélange d'acide (HNO_3 : H_2SO_4)

III.3.1.1. Caractérisation par spectroscopie à infrarouge

Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau donc Le FTIR est généralement utilisé comme technique qualitative pour l'estimation des groupes fonctionnels.

La Figure 7 Montre les spectres infrarouges de réflexion totale atténuée NTCs (MWCNT) (S_0), NTCs-COOH (MWCNT-COOH) oxydé par le mélange avec H_2SO_4^+ HNO_3 (S_1).

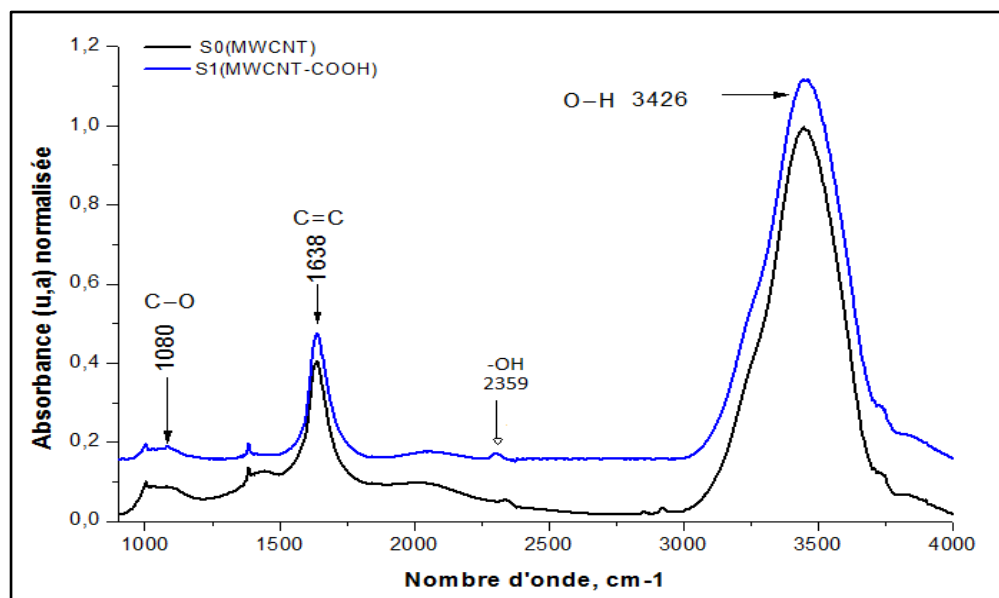


Figure III.7. Spectre FTIR correspondant à (S_0) nanotubes de carbone pure, (S_1) nanotubes de carbone fonctionnalisés par un acide (HNO_3 : H_2SO_4).

Elaboration d'un biocapteur a base d'aptamère pour la détection de cadmium

Les spectres obtenus se situaient dans une plage de 400 à 4000 cm^{-1} . On note un large pic présent pour les deux échantillons à environ 3 445 cm^{-1} , ce qui correspond à la vibration d'élongation (stretching) des liaisons O-H du groupe hydroxyle à partir de groupes carboxyle ($\text{O} = \text{C}-\text{OH}$ ou $\text{C}-\text{OH}$). La présence de groupes carboxyle à la surface NTCs (MWCNT) peut être due à l'humidité ou à l'oxydation partielle au cours de la purification par le fabricant [3].

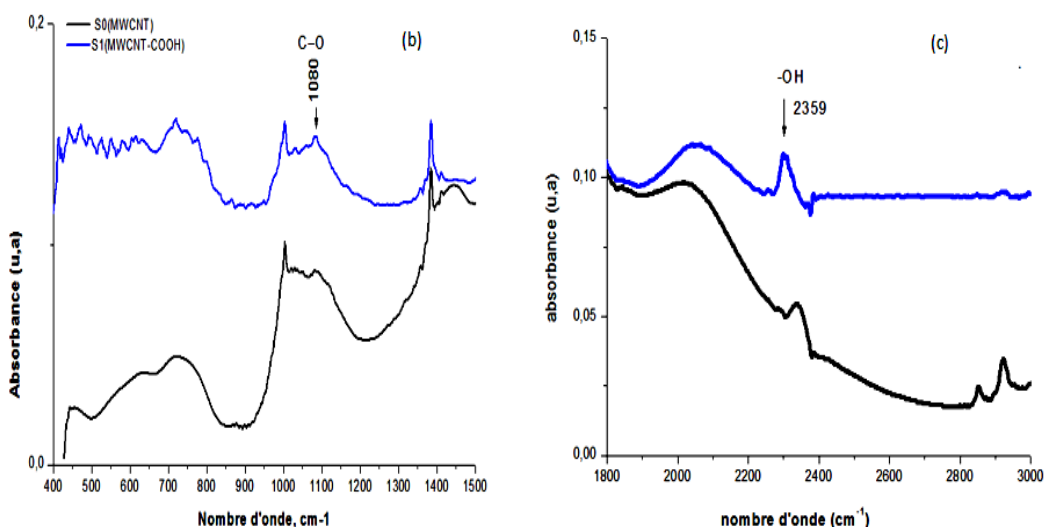


Figure III.8. Spectre FTIR correspondant à (S_0) nanotubes de carbone pure, (S_1) nanotubes de carbone fonctionnalisés par un acide (HNO_3 ; H_2SO_4) : (b) bande 400-1500 cm^{-1} (c) bande 1800-3000 cm^{-1}

le spectre de (S_1) (figure 8, (b)) fait apparaître un pic à 1080 cm^{-1} , qui est une bande typique de la liaison C-O dans les groupes (-COOH) alors que un autre pic à 2359 cm^{-1} [4] (figure 8, (c)) peut être associé à la vibration d'élongation O-H à partir de -COOH fortement lié à l'hydrogène [5]. La diminution d'intensité d'absorption de bande de liaison C=C (1634 cm^{-1}) pour NTCs-COOH (S_1) par rapport au NTCs-pure pourrait être dû au traitement oxydatif, la liaison C=C dans les NTCs a été fracturée par la corrosion et l'ajout de groupes fonctionnels COOH [6].

III.3.1.2. Caractérisation par diffraction des rayons X

Afin de confirmer que la fonctionnalisation des NTCs n'a pas affecté les caractéristiques structurales déjà décrit c'est vue nécessaire de réaliser une analyse complémentaire avec la DRX.

La DRX est une technique utilisée pour identifier la nature et la structure des produits permettant l'identification de l'état cristallin, c'est-à-dire un arrangement périodique et ordonné d'atomes dans des plans réticulaires tridimensionnels. Cette méthode permet aussi nettement de distinguer entre les produits amorphes et les produits cristallisés [7].

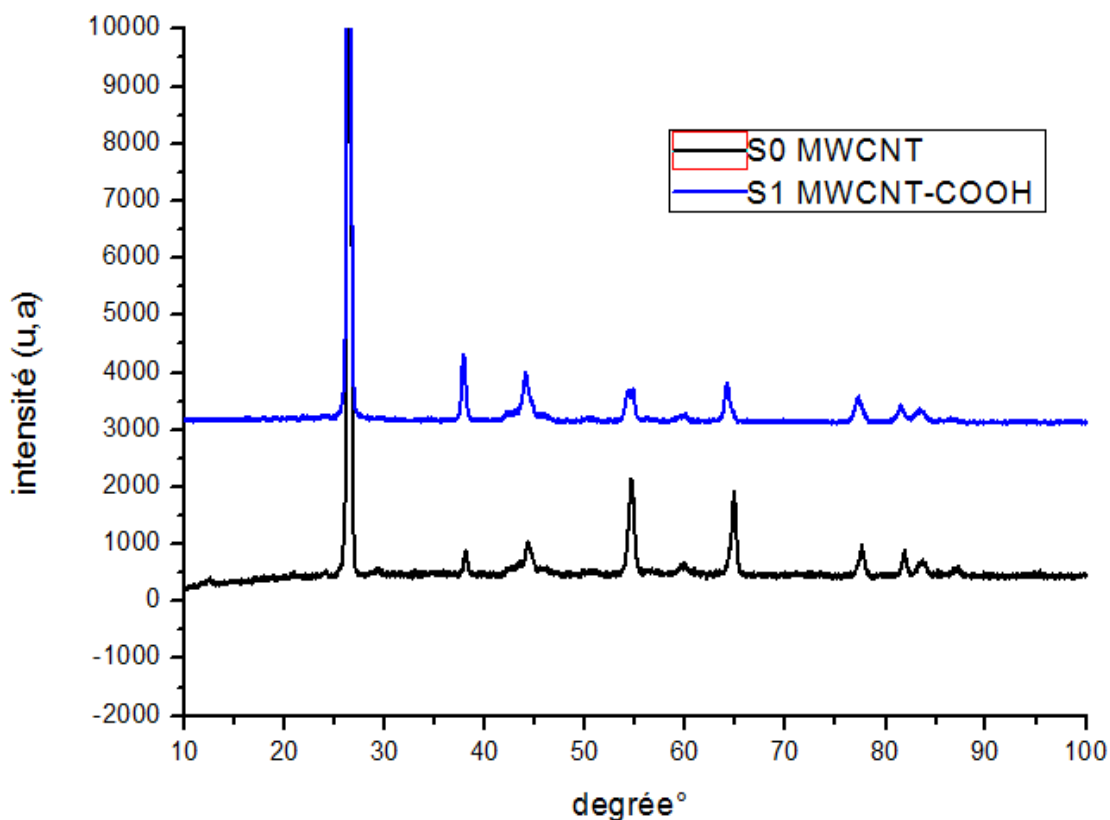


Figure III.9. Spectre de diffraction des rayons X de NTCs (S_0) et NTCs-COOH (S_1).

Les profils de DRX des NTCs-pure (S_0) et NTCs-COOH (S_1) sont illustrés à la Figure 9. Les échantillons révèlent la présence des pics très similaires principalement le pic $25,70^\circ$ aux plans (002) des atomes de carbone avec espacement des couches (34 nm) [8]. Donc Il n'y a pas de changement radical dans la position des pics caractéristiques des NTCs et celle de NTCs-COOH, ce qui suggère que les NTC-COOHs ont conservés avec leur structure cristalline de départ d'origine après leur fonctionnalisation.

Les deux analyses confirment que le traitement chimique effectué pour la fonctionnalisation et les gains des fonctions carboxyles sur la paroi des NTCs est obtenu avec succès avec le maintien de propriétés structurales intéressantes des NTCs.

III.3.2 Caractérisation par la voltamétrie cyclique (VC)

La voltammétrie cyclique d'une espèce électroactive telle que $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ est un outil précieux pour tester la barrière cinétique et l'échange électrochimique à l'interface. La barrière cinétique entrave le processus de transfert d'électrons et devient de plus en plus grande quand l'épaisseur augmente et que la densité des défauts de la barrière diminue.

La figure 10 présente la caractérisation électrochimique par la voltamétrie cyclique de l'électrode de carbone vitreux nue et modifiée, en présence de couples redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, le potentiel a été balayé entre -1V et 1V, avec une vitesse de balayage de 50 mV/s. Comme il est clair dans les voltamogrammes, les pics d'oxydation et de réduction du couple redox sont visibles en raison du fort taux d'échange avec l'électrode de carbone vitreux nue (fig 7a). (fig 7b) ; présente l'effet voltamétrique du ferricyanure sur l'électrode modifiée par les CNTs / CS. Les nanotubes de carbone ayant une surface catalytique active, ils peuvent augmenter la surface active de l'électrode modifiée [9]. Mais les pics d'oxydation et de réduction du couple redox ont été diminués par rapport au GCE nue en raison du comportement bloquant du CS [10]. Pour les AuNPs / CNTs-CS /GCE, les pics ont augmenté et la ΔE_p est devenue plus petite par rapport à l'électrode modifiée par les CNT /CS (fig 7c). Les résultats ont indiqué que les AuNPs ont joué un rôle dans l'augmentation de la surface catalytique électroactive. Lorsque le film composé de AuNPs /CNT-CS a été utilisé pour modifier l'électrode, le pic était le plus élevé en raison de la grande surface spécifique de l'électrode modifiée et de l'action synergique de l'activité électro-catalytique des NPs et CNTs.

Les pics au niveau Apt/ AuNPs/ CNTs-CS/ GCE (fig 7d) ont considérablement diminué par rapport à celle au niveau du AuNPs / CNTs-CS /GCE et le ΔE_p est devenu plus petit. Cela implique que la plus grande partie de la surface de l'électrode est recouverte d'aptamère [11]. Cette observation démontre que l'immobilisation de l'aptamère a été réalisée avec succès. L'incubation d'électrode modifiée dans une solution PBS (pH=4.5) contenant 0.1mM de cadmium Cd^{2+} pendant 30mn a entraîné une nouvelle diminution de pic et une augmentation de la ΔE_p (fig 7e). Cela signifie que les Cd^{2+} ont été adsorbés sur la surface de l'électrode ce qui entrave considérablement le transfert d'électrons entre la surface de l'électrode et les couples redox en solution du fait de l'ouverture de la partie tige d'aptamère et la formation du complexe Cd^{2+} - aptamère [11].

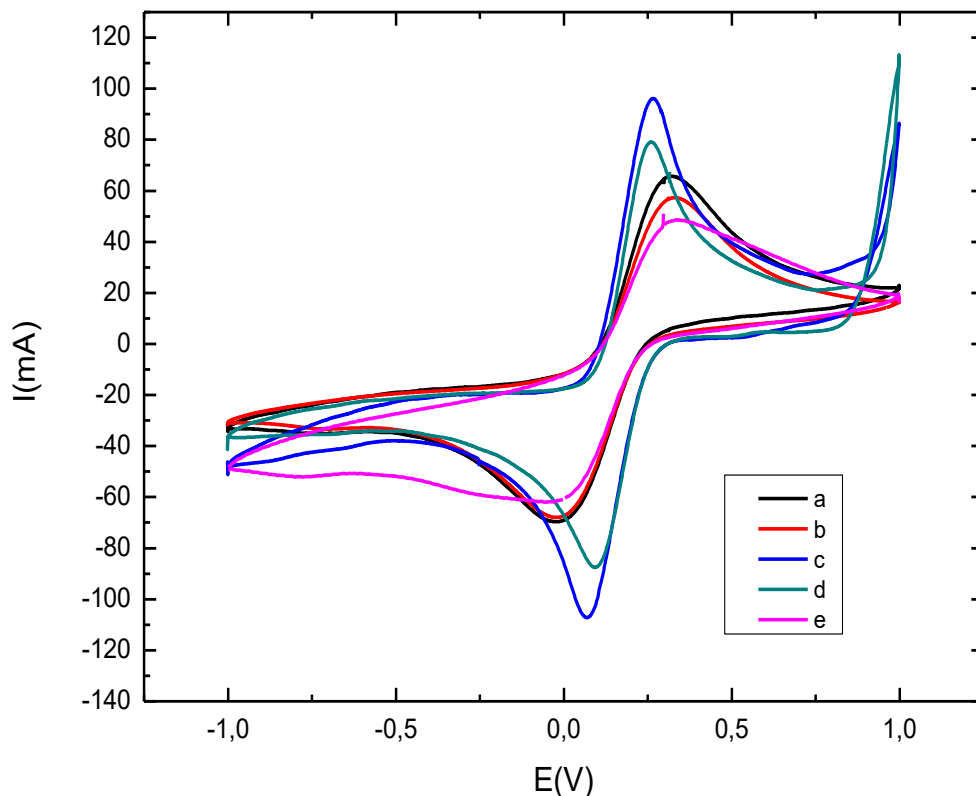


Figure III.10. Voltammogrammes cycliques en présence de $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-/4-}$, de l'électrode nue (a), Cs-CNTs/GCE (b), AuNPs/Cs-CNTs/GCE (c), Apta/AuNPs/Cs-CNTS/GCE, Cd^{2+} /Apta/AuNPs/Cs-CNTS/GCE. Vitesse de balayage 50 mV/s.

III.3.3 Caractérisation par spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE)

Les diagrammes d'impédance de l'électrode nue et de l'électrode modifiée ont aussi été déterminés en appliquant un potentiel de -0,5V et en faisant varier la fréquence dans la gamme de 10 kHz à 100 mHz. Ce potentiel a été choisi parce qu'il présente la plus basse résistance de transfert de charge de la dernière couche de l'élaboration de biocapteurs, qui est l'immobilisation de l'aptamère. Les résultats montrent une petite augmentation du diagramme d'impédance après la modification de GCE par les CNTs-CS (fig 8b) qui correspond à une augmentation de la résistance de transfert de charge à l'interface électrode/électrolyte, après la déposition des nanoparticules d'or, une diminution de diagramme d'impédance à été remarquer (fig 8c) ce qui signifie une augmentation de conductivité. Ensuite ; après l'immobilisation d'aptamère, le diagramme montre une petite

augmentation (fig 8d) qui correspond une augmentation de R_{tc} ce qui implique que la surface d'électrode est recouverte d'aptamère.

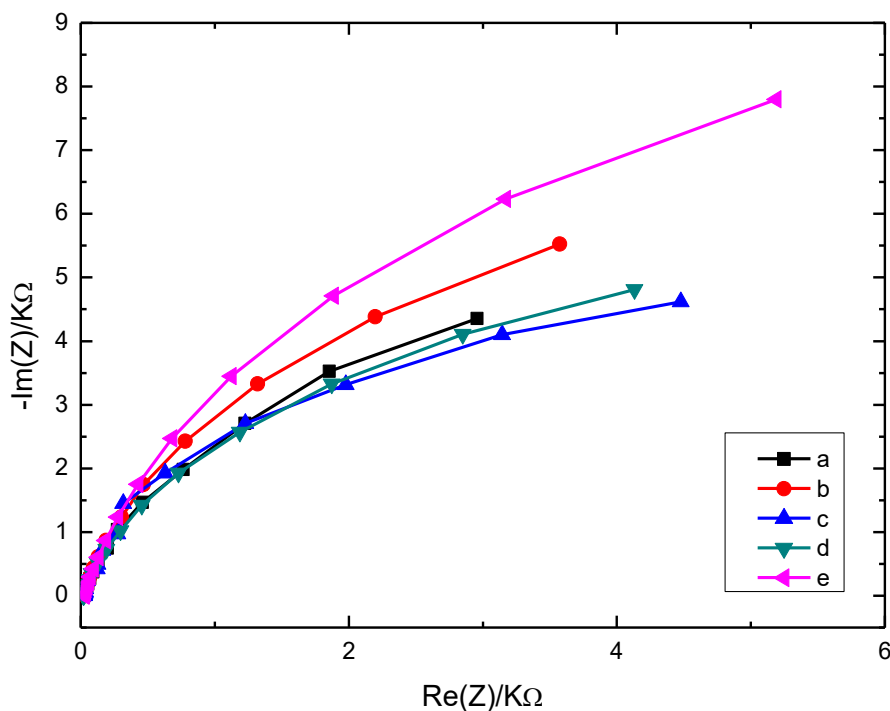


Figure III.11. Diagrammes de Nyquist de l'électrode nue (a), Cs-CNTs/GCE (b), AuNPs/Cs-CNTs/GCE (c), Apta/AuNPs/Cs-CNTs/GCE, Cd^{2+} / Apta/AuNPs/Cs-CNTs/GCE. Les mesures ont été effectuées dans un tampon PBS pH 4.5 à -0.5V.

Le comportement électrique de ce système électrochimique et les modifications apportées à l'interface électrode/électrolyte, peuvent être représentés de façon analogue par un circuit électrique équivalent (figure 12). Ce circuit équivalent est appliqué pour ajuster les données expérimentales et extraire les informations nécessaires sur les paramètres électriques traduisant la variation impédimétrique. Les spectres obtenus ont été modélisés par le circuit équivalent de Randles, qui est la combinaison d'une résistance représentant la résistance due à la chute ohmique (R_s) (correspond à la valeur sur l'axe Z_r du premier point du demi-cercle), une résistance de transfert de charge (R_{ct}) (se lit sur l'axe Z_r et équivaut au diamètre du demi-cercle) et Q_2 (élément à phase constante modèle équivalent de la capacité à double couche).

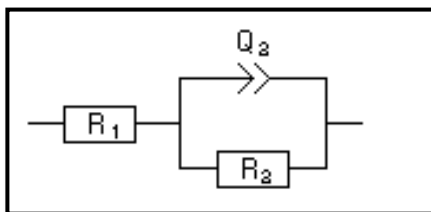


Figure III.12. Circuit équivalent de Randles.

III.3.4. Détection de Cadmium

Une fois l'aptamère immobilisé à la surface de l'électrode, le biocapteur a été testée pour la détection de cadmium. Pour cela, différentes concentrations croissantes de cadmium dans du tampon (pH 4.5) (Figure 13) ont été incubées à la surface de l'électrode pendant 30. Des mesures d'impédance ont été effectuées pour chaque concentration de cadmium. La sensibilité et la linéarité du biocapteur ont été caractérisées dans une gamme allant de 10^{-13} à 10^{-4} g.mL⁻¹.



Figure III.13. Concentrations croissantes de cadmium (10^{-13} – 10^{-4}) dans un PBS (pH=4.5).

Les valeurs de résistance de transfert de charge (R_{ct}) ont été améliorées en augmentant la concentration de Cd^{2+} de manière logarithmique. Le premier demi-cercle du graphique de Nyquist correspond à la surface d'électrode modifiée par l'aptamère avant l'addition de cadmium. Après incubation avec des concentrations croissantes de la cible, les demi-cercles de la parcelle de Nyquist continuent à augmenter, indiquant l'interaction entre le cadmium et son aptamère spécifique.

Elaboration d'un biocapteur a base d'aptamère pour la détection de cadmium

Les demi-cercles de la courbe de Nyquist ont été ajustés à l'aide du modèle de circuit équivalent de Randles (figure 12), dans lequel R_s (résistance de la solution), R_{ct} (résistance de transfert de charge) et Q_1 (élément à phase constante, modèle équivalent de la capacité à double couche). La partie réelle de l'impédance ($Re(Z)$) a augmenté en fonction de la concentration en cadmium. L'équation de régression linéaire a été normalisée à $R_{ct} = R_{ct}(\text{aptamère-cadmium}) - R_{ct}(\text{aptamère})$ en tant que logarithme de fonction de la concentration en cadmium. $R_{ct}(\text{aptamère-cadmium})$ est la valeur de la résistance au transfert d'électrons après liaison de Cd^{2+} à l'aptamère immobilisé à la surface modifiée de l'électrode. Une relation linéaire constante entre les concentrations de R_{ct} et de cadmium a été trouvée dans une gamme de concentrations allant de 10^{-13} à 10^{-4} M, avec un bon coefficient de corrélation de ($R^2 = 0.985$) et une sensibilité de $1.2 \text{ K}\Omega \cdot \text{M}^{-1}$ par décennie de concentration de cadmium la limite de détection était de $2.011 \cdot 10^{-14} \text{ M}$

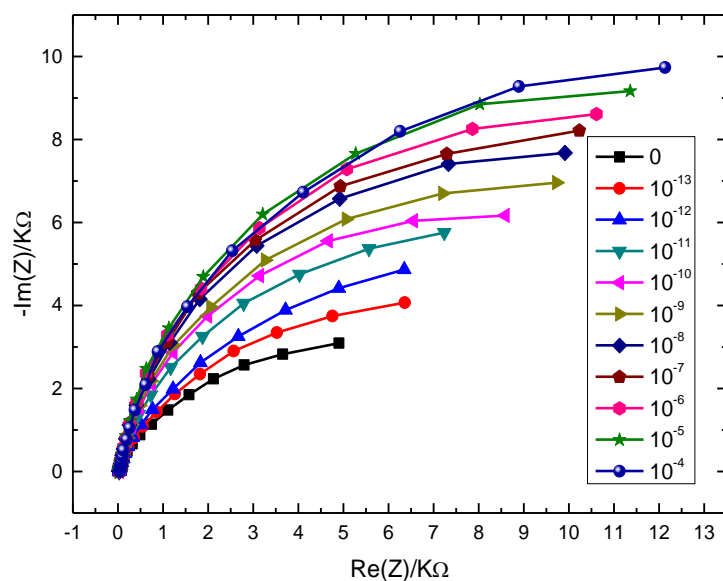


Figure III.14. Influence de la concentration de cadmium sur la réponse du biocapteur impédimétrique . Mesures effectuées dans PBS (pH 4.5), à un potentiel de -0.5V et une gamme de fréquence de 10kHz- 100mHz

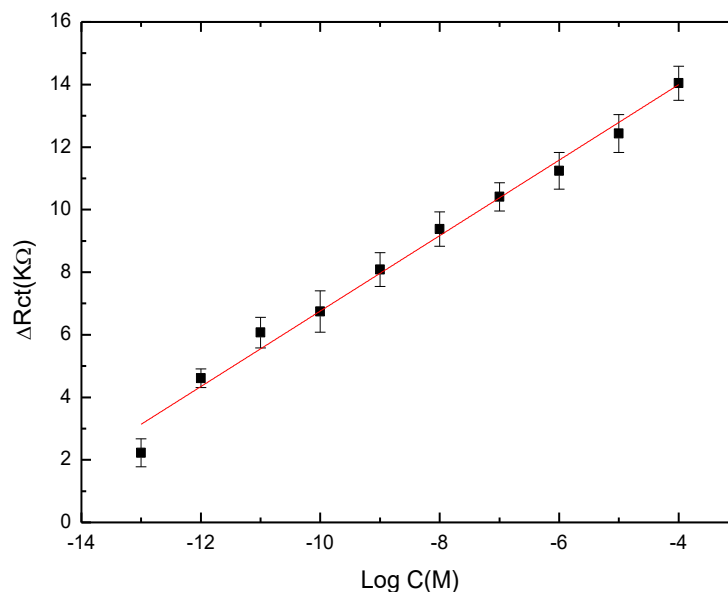


Figure III.15. Courbes de calibration du biocapteur impédimétrique.

III.3.5. Sélectivité

La sélectivité est un critère important pour n'importe quel outil analytique. Pour cela, nous avons réalisé une étude d'interférence avec d'autres métaux lourds; le zinc, le plomb et le mercure. L'étude a été réalisée en utilisant le biocapteur à base d'aptamère, pour des concentrations de 10^{-8} à 10^{-6} des interférents. Comme on peut le voir sur (la figure16), Les réponses d'impédance montrent clairement que le biocapteur était hautement sélectif vis-à-vis du cadmium par rapport aux autres métaux lourds testés. Aucun signal significatif n'a été enregistré en présence de Pb^{2+} , Zn^{2+} sauf pour Hg^{2+} ; ce qui peut être attribué à la paire de bases non appariée spéciale (T – Hg – T) entre Hg^{2+} et Cd- aptamère [12].

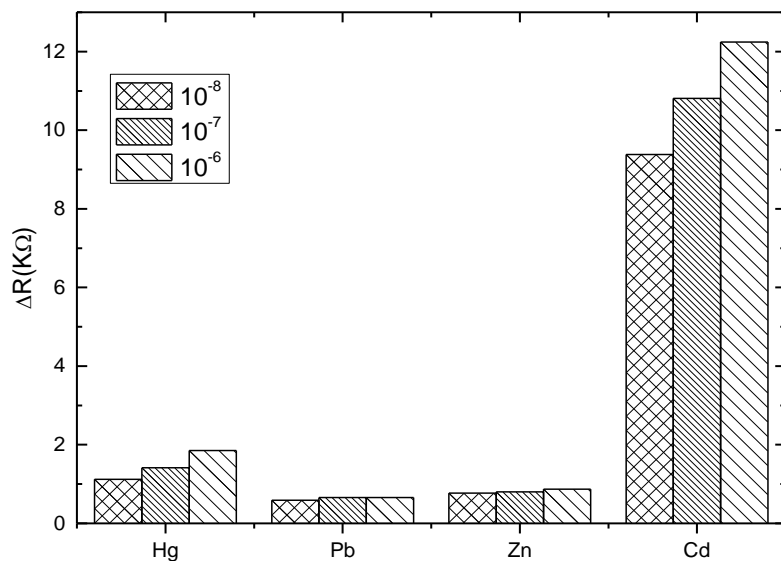


Figure III.16. Comparaison des réponses du biocapteur obtenues en présence d'éventuelles substances interférentes. Les mesures ont été réalisées dans un tampon PBS (pH 4.5).

Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons développé un biocapteur à base d'aptamère pour la détermination du Cadmium. Ce biocapteur a permis une détection sensible et très stable de Cd avec une limite de détection très basse de 0.02 pM. La méthode proposée pour l'élaboration de biocapteur qui consiste à l'immobilisation de aptamère avec réticulation dans la matrice du biopolymère chitosan (CS) sur une électrode de carbone vitreux (GCE), ainsi qu'à l'utilisation des nanoparticules d'or et des nanotubes de carbone, a permis d'avoir des meilleurs performances analytiques, en particulier en termes de la limite de détection et de stabilité. La réponse obtenue est linéaire dans le domaine de $[10^{-13} - 10^{-4} \text{ M}]$.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUE

Références Bibliographiques

Références bibliographique

[1] Nathalie Mayer ; 1 ; disponible sur :

<https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/chimie-carbone-vitreux-16512/>

[2] Xinhuang Kang et al, A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan on a glassy carbon electrode modified with gold–platinum alloy nanoparticles/multiwall carbon nanotubes ; Elsevier ; 396 (2007) ;p3.

[3] .Azri, F. A., Sukor, R., Hajian, R., Yusof, N. A., Bakar, F. A., &Selamat, J. (2017). Modification Strategy of Screen-Printed Carbon Electrode with Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotube and Chitosan Matrix for Biosensor Development. *Asian Journal of Chemistry*, 29(1), 31–36.

[4] an Trinh, P., Anh, N. N., Tam, N. T., Hong, N. T., Hong, P. N., Minh, P. N., &Thang, B. H. (2017). Influence of defects induced by chemical treatment on the electrical and thermal conductivity of nanofluids containing carboxyl-functionalized multi-walled carbon nanotubes. *RSC Adv.*, 7(79), 49937–49946.

[5] M. A. Atieh, O. Y. Bakather, B. Al-Tawbini, A. A. Bukhari, F. A. Abuilawi, and M. B. Fettouhi, “Effect of carboxylic functional group functionalized on carbon nanotubes surface on the removal of lead from water,” *Bioinorganic Chemistry and Applications*, vol. 2010, Article ID 603978, 9 pages, 2010.

[6] Guan, Q., Li, Y., Chen, Y., Shi, Y., Gu, J., Li, B., ...Ning, P. (2017). Sulfonated multi-walled carbon nanotubes for biodiesel production through triglycerides transesterification. *RSC Advances*, 7(12), 7250–7258.

[7] N. SERGENT, dioxyde d'étain : synthèse, caractérisation et étude des interactions avec différents gaz polluants. application la catalyse de NOX, thèse de doctorat, Ecole Na

[8] Y. Cheng, W. Li, X. Fang, J. Liu. W. Xu and C. Yan, Modified Multi-walled carbon nanotubes/ Ag nanoparticle composites catalyst for oxygen reduction reaction in alkaline solution, *ElectrochimicaActa*, 11, 2013, 635.

[9] A john wiley & sons, carbon materials for catalysis, hoboken, New jersey, Philippe Serp et José Luis Figueirido,canada, p573

[10] A john wiley & sons, carbon materials for catalysis, hoboken, New jersey, Philippe Serp et José Luis Figueirido,canada, p573

Références Bibliographiques

[11] Ayemeh Bagheri Hashkavayiet al, Label-free and sensitive aptasensor based on dendritic gold nanostructures on functionalized SBA-15 for determination of chloramphenicol, anal Bioanal Chem,2009, 10.1007/s00216-016-9358-6,p6

[12] Li,L,Li,B,Qi,Y et al anal Bioanal Chem (2009) 393 : 2051 disponible sur : <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2640-0>

CONCLUSION

GENERALE

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était la conception d'un biocapteur à base d'aptamère pour la détection de cadmium.

Dans un premier temps, l'électrode de carbone vitreux a été modifiée avec des nanoparticules d'or (AuNPs) par électrodéposition à (-0.2 V pour 400s) sur des nanotubes de carbone (CNT) dans un film CS (CNT /CS). Par la suite l'aptamère a été stabilisé dans la matrice de biopolymère par une réticulation chimique avec le glutaraldéhyde entraînant la formation de liaisons covalentes stables (GCE/CS-CNTs/AuNPs/Aptamère).

Les nanotubes de carbone utilisés dans cette étude ont été analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et par diffraction des rayons X (DRX). Les deux analyses confirment que le traitement chimique effectué pour la fonctionnalisation et les gains des fonctions carboxyles sur la paroi des NTCs est obtenu avec succès avec le maintien de propriétés structurales intéressantes des NTCs.

Dans un deuxième temps, une gamme de concentration de cadmium de 10^{-13} à 10^{-4} M ont été testées par une technique électrochimique ; la spectroscopie d'impédance électrique, où nous assistons à une variation (augmentation) de la résistance de transfert de charge avec les injections des différentes concentrations de cadmium à un potentiel de -0,5V dans un tampon à pH 4.5.

Enfin notre biocapteur permet la détection de cadmium avec les caractéristiques suivant : une linéarité de 10^{-13} à 10^{-4} M ; avec une corrélation de 0.985 et une sensibilité de $1.2 \text{ K}\Omega \cdot \text{M}^{-1}$; une bonne sélectivité et la limite de détection était de 0.02pM

Concernant les nanomatériaux, des résultats nous ont permis de montrer l'intérêt potentiel d'intégrer des nanotubes de carbone et des nanoparticules d'or à la surface du capteur utilisé pour la biodétection.

Nous pouvons dire que ce biocapteur permet la détection de cadmium, malheureusement d'autres suites n'ont pas été réalisées faute de technique et du temps. De ce fait, nous recommandons des perspectives comme le test sur des échantillons réels (sérum et/ou eau), reproductibilité, temps de réponse.

ملخص

تم انشاء مستشعر بيولوجي جديد، يستند على تجميد الأبتامر بالتشابك مع مصفوفة بوليمر حيوي شيتوزان (CS) على قطب كهربائي من الكربون الزجاجي (GCE)، والذي تم تعديله باستخدام الجسيمات النانوية الذهبية (AuNPs) عن طريق الطلاء الكهربائي على الأنابيب الكربونية النانوية في فيلم البوليمر الحيوي. وذلك في ظل الظروف المثلى (ساعتين للتشابك، درجة الحموضة pH=4.5 و درجة حرارة 25°C، تركيز أبتامر 0.75 µM و 30 دقيقة وقت حضانة الإلكترود في المحاليل التي تحتوي على مختلف التركيزات المستهدفة). تم تحليل الأنابيب النانوية الكربونية المستخدمة في هذه الدراسة من خلال التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء فوربييه (FTIR) والطيف بالأشعة السينية (DRX). تم تحديد خصائص AuNPs/ CNTs / CS بواسطة قياس الجهد الدوري (CV) والتحليل الطيفي للمقاومة الكهروكيميائية (EIS). مع أبتامر الكادميوم، تم تصنيع مستشعر جديد. أظهر المستشعر البيولوجي أداءً ممتازاً لاستشعار الكادميوم المحتمل التطبيقي المنخفض (-0.5V)، مع حساسية عالية (1.2 KΩ.M⁻¹)، حد اكتشاف منخفض 0.02pM، نطاق خطي واسع (10⁻¹³–10⁻⁴ M) وكذلك انتقائية جيدة.

كلمات مفتاحية: أبتامر الكادميوم؛ أنابيب نانوية كربونية؛ جسيمات نانوية ذهبية؛ كيتوزان، طلاء كهربائي؛

مستشعر بيولوجي.

Résumé

Un nouvel aptacapteur a été élaboré, basé sur l'immobilisation de Cd-aptamère avec réticulation dans la matrice du biopolymère chitosan (CS) sur une électrode de carbone vitreux (GCE), ce dernier a été modifiée avec des nanoparticules d'or (AuNPs) par électrodéposition sur des nanotubes de carbone (CNT) dans un film CS (CNT / CS). Dans des conditions optimales (temps de réticulation de 2 heures, pH de travail de 4,5 et la température de 25 ° C, concentration en aptamère de 0,75 µM et 30mn temps d'incubation d'électrode dans des solutions contenant différentes concentrations de cible). Les nanotubes de carbone utilisés dans cette étude ont été analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et par diffraction des rayons X (DRX). Les propriétés des AuNPs / CNTs / CS ont été caractérisées par la voltamétrie cyclique (CV) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS). Avec Cd-aptamer, un nouvel aptacapteur a été fabriqué. Le biocapteur a montré d'excellentes performances pour le cadmium à faible potentiel appliqué (-0,5 V), avec une sensibilité élevée (1,2 KΩ.M⁻¹), une limite de détection basse 0.02pM, une large plage linéaire (10⁻¹³–10⁻⁴ M) et une bonne sélectivité.

Mots Clés : Cd-aptamer ; Nanotubes de carbone ; Nanoparticules d'or ; Chitosan Electrodeposition ; Biocapteur.

Abstract

A novel aptasensor was constructed, based on the immobilization of Cd-aptamer with cross-linking in the matrix of biopolymer chitosan (CS) on a glassy carbon electrode (GCE), which was modified with gold nanoparticles (AuNPs) by electrodeposition on multiwall carbon nanotubes (CNTs) in CS film (CNTs/CS). Under optimal conditions (2 hours cross-linking time, working pH of 4.5 and temperature of 25°C, aptamer concentration 0.75µM and 30mn incubation time of modified electrode in a solution containing different target concentrations). The multiwall carbon nanotubes used in this study were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction (XRD). The properties of AuNPs/CNTs/CS were characterized by cyclic voltammetry (CV), and electrochemical impedance spectra (EIS). With Cd-aptamer, a new aptasensor was fabricated. The biosensor exhibited excellent performances for cadmium at a low applied potential (-0.5 V) with a high sensitivity (1.2 KΩ.M⁻¹), a low detection limit 0.02pM, a wide linear range (10⁻¹³–10⁻⁴ M) and good selectivity.

Keywords: Cd-aptamer; Carbon nanotubes; Au nanoparticles; Chitosan; Electrodeposition; Biosensor