

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABBESLAGHROUR-KHENCHELA
FACULTE DES SCIENCES ET DE TECHNOLOGIE
Département de Génie industrielle



جامعة عباس لغرور خنشلة
كلية العلوم و التكنولوجيا
قسم: الهندسة الصناعية

Domaine : Science et Technique
Filière : Génie des procédés
Spécialité : Génie des procédés/ environnement

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le 24/01/2021

Par

Rabai Selma

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Abbes Laghrou-Khenchela

Thème

Élaboration et caractérisation de biocapteurs et de biopuces à ADN électrochimiques sélectifs pour la détection du cadmium dans les eaux de surface

Soutenu devant la commission d'examen composée de :

Prof.	Beicha Abdellah	U. Khenchela	Président
Prof.	Messaoud Benounis	U. Khenchela	Directeur
Prof.	Rochdi Kherrat	U. Annaba	Examineur
Prof.	Ferkhi Mosbah	U. Jijel	Examineur
Dr.	Rhouati Amina	CRBt Constantine	Examineur
Dr.	Mekhlouf Abdessameil	U. Khenchela	Examineur

Dédicaces

Je remercie tout d'abord notre dieu qui m'a donné la force et la puissance pour terminer ce modeste travail

• J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

*A ma très chère **mère**, qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi. A la mémoire de mon **père** que dieu est pitié de*

Son âme et L'accueil dans son vaste paradis

*Mon cher mari **Rabah** et cher fils **Anes** Pour tout l'encouragement, le respect et l'amour que tu m'as offert, Je te dédis ce travail, qui n'aurait pas pu être achevé sans ton éternel soutien et optimisme*

*A mes frères **ABED ALHALIM, ALI, TAHAR, ABED ALMALEK***

*A mes sœurs **Fatiha Hanane***

*et ses maries **HOSSINE, ABED ALHAMID** et ces Très belle enfants*

*A ma petite sœur **SIHEM***

A Mes tante, mes oncles ainsi que leurs familles.

*A tous mes amis surtout **Khawla, Arare Halla, Amina, Souad***

A Tous ceux que j'aime et je respecte.

Remerciements

Je tiens à vous remercier infiniment "ALLAH "

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire LCIP de l'université de kenchela.

Je tiens à remercier, en tout premier lieu, Pr : Benounis Messaoud directeur de ce mémoire.

C'est un grand plaisir d'exprimer ma gratitude à mon encadreur, Pr : Benounis Messaoud directeur de laboratoire LCIP de m'avoir fait confiance de mener à terme cette recherche sous sa direction.

C'est grâce à lui, que j'ai pu, en effet, découvrir le monde de la recherche et vivre cette expérience très riche sur le plan scientifique et humain. Je suis très reconnaissant de sa méthode

Je tiens également à remercier chaleureusement Mme Amina RHOUATI, Maître de conférences (A) à l'École Nationale Supérieure de Biotechnologie (ENSB) 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 attentive et de ses qualités qui m'ont été d'un grand soutien.

Je remercie vivement Mme Nicole Jaffrezic- Renault de m'avoir accueilli durant deux mois de stage au sein de son équipe et de m'avoir permis de travailler dans de bonnes conditions. Je tiens aussi à remercier infiniment Monsieur Abdoullatif Baraket pour ses conseils, son suivi, son professionnalisme et la bonne humeur dont il a fait preuve à mon égard durant ce stage.

Je remercie également tous les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail

Mes remerciements et ma grande gratitude s'adressent particulièrement à S.

ATAILIA pour son aide et ses conseils judicieux.

J'adresse aussi toute ma gratitude au chef département de génie industrielle.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	XII
<i>Chapitre 01</i>	<i>1</i>
GENERALITES SUR LES BIOCAPTEURS A BASE D'APTAMERE	1
1.1. Introduction	1
1.2. Généralité sur le cadmium	1
1.2.1. Historique.....	1
1.2.2. Propriétés du cadmium	2
1.2.3. Utilisation du cadmium.....	2
1.2.4. Toxicité du cadmium.....	3
1.2.5. Principales sources de pollution.....	3
1.2.6. Conséquences sanitaires	4
1.3. Les biocapteurs.....	4
1.3.1. Historique.....	4
1.3.2. Définition	5
1.3.3. Les performances des biocapteurs	6
1.3.4. Domaines d'application des biocapteurs.....	6
1.3.5. Classification des biocapteurs.....	8
1.4. Aptamère.....	11
1.4.1. Anticorps versus Aptamère.....	12
1.4.2. Sélection des aptamères.....	15
1.4.3. Applications	16
1.5. Biocapteurs pour la détection de cadmium.....	16
1.6. Méthodes d'immobilisation de biorécepteur	23
1.6.1. Adsorption.....	23
1.6.2. Liaison covalente.....	24
1.6.3. Le piégeage.....	24
1.6.4. Réticulation et co-réticulation	25
1.7. La modification de la surface d'électrode par des monocouches auto assemblées et des sels de diazonium.....	26
1.7.1. Les monocouches auto assemblés (SAMs) ; modification chimique de la surface.....	26
1.7.2. Les sels de diazonium ; modification électrochimique de la surface.....	28
1.8. Intégration de nanomatériaux dans l'élaboration de biocapteurs	29
1.8.1. Les nanoparticules d'or	29
1.8.2. Les nanotubes de carbone	31
1.9. Conclusion	36

<i>Chapitre 02</i>	42
--------------------------	----

TECHNIQUES ELECTROCHIMIQUES42

2.1. Introduction :	42
2.2. Voltampérométrie cyclique :	42
2.2.1. La loi de nernst.....	43
2.2.2. Principe de voltampérométrie cyclique.....	44
2.2.3. Composants	44
2.2.4. Expression mathématique du courant et du potentiel de pic :.....	45
2.2.5. Critères de discrimination entre les différents systèmes et mécanismes, électrochimiques :.....	46
2.2.6. Les avantages de la Voltampérométrie cyclique :	47
2.2.7. Application de la voltampérométrie cyclique dans le domaine de capteur chimique.....	47
2.3. Laspectroscopied'impédanceélectrochimique (SIE).....	47
2.3.1. Généralités	47
2.3.2. Théorie.....	48
2.3.3. Principes de base.....	49
2.3.4. Equilibre du système	50
2.3.5. Impédance de déférents phénomènes pouvant se produire à l'interface électrode/électrolyte :	51
2.3.6. Les avantages et les inconvénients de la méthode :.....	54
2.3.7. Application de la spectroscopie d'impédance électrochimique.....	55
2.4. Conclusion :	55

<i>Chapitre 03</i>	59
--------------------------	----

DEVELOPPEMENT D'UN APTACAPTEUR ELECTROCHIMIQUE BASE SUR L'ELECTRODEPOSITION DE DIAZONIUM: APPLICATION A LA DETECTION DU CADMIUM DANS L'EAU59

3.1. Introduction	59
3.2. Matériel et méthodes.....	59
3.2.1. Réactifs	59
3.2.2. Mesures électrochimiques.....	60
3.2.3. Préparation du biocapteur	61
3.2.4. Analyse d'échantillons réels	61
3.3. Résultats et discussion.....	62
3.3.1. Préparation électrochimique de l'aptacapteur	62
3.3.2. Caractérisation de la surface fonctionnalisée de l'électrode en Or	63
3.3.3. Optimisation de la concentration de l'aptamère.....	65
3.3.4. Caractéristiques analytiques de l'aptacapteur.....	66

3.3.5. Application dans des échantillons d'eau par la méthode des ajouts dosés.....	69
3.4. Conclusion	70
<i>Chapitre 04</i>	<i>74</i>
ELABORATION D'UN APTACAPTEUR SELECTIF AU CADMIUM A BASE D'ELECTRODE DE CARBONE MODIFIEE PAR DES NANOPARTICULES D'OR (AUNPS) ET NANOTUBES DE CARBONE (CNT)	74
4.1. Introduction	74
4.2. Matériels et méthodes.....	74
4.2.1. Réactifs	74
4.2.2. Les électrodes	75
4.2.3. Mesures électrochimiques.....	76
4.2.4. Préparation du biocapteur	77
4.3. Immobilisation d'aptamère-Cadmium.....	78
4.4. Résultats et discussions	79
4.4.1. Caractérisation par la Voltamétrie cyclique (VC)	79
4.4.2. Caractéristiques analytiques de l'aptacapteur	81
4.4.3. Sélectivité	83
4.5. Conclusion	84
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	86

Liste des figures

Figure 1-1 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur	5
Figure 1-2: Principales applications des biocapteurs.....	7
Figure 1-3 : Principe de mesure potentiométrique : accumulation de charges électriques à la surface de l'électrode indicatrice.....	8
Figure 1-4: Schéma de principe des mesures conductimétrique : Transfert d'électron, migration d'ions.....	9
Figure 1-5: Schéma du principe de l'ampérométrie.....	10
Figure 1-6 : Les différents types de biorécepteurs	11
Figure 1-7 : Caractéristiques structurales des acides nucléiques, adapté de Hermann et al.[34].....	12
Figure 1-8 : 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.	16
Figure 1-9: Immobilisation des biomolécules par adsorption.....	23
Figure 1-10: Immobilisation des biomolécules par liaison covalente.	24
Figure 1-11: Immobilisation des biomolécules par piégeage.....	25
Figure 1-12: Immobilisation des biomolécules par réticulation et co-réticulation.	25
Figure 1-13: Schéma de base d'une couche SAM.	27
Figure 1-14 :Schématisation d'une nanoparticule d'or aux fonctionnalités multiples pour des applications diverses.....	31
Figure 1-15:Feuillette de graphène enroulée en cylindre	32
Figure 1-16: A) Images TEM et représentation schématique de la structure des SWCNT ; B) Image TEM et représentation schématique de la structure des MWCNT.....	32
Figure 1-17: 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 [81].	33
Figure 1-18 :Composite CNTs-Chitosan	34
Figure 1-19 : Structure chimique du N-acétyl-D-glucosamine (a), de D-glucosamine (b) et du chitosane (c) [84].	35
Figure 2-1L'allure de la courbe voltampérométrique et ces grandeurs caractéristiques.	43
Figure 2-2 : dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé	44
Figure 2-3 : Représentation d'un nombre complexe dans l'espace à deux dimensions	49
Figure 2-4 : Schéma de principe d'un montage à trois électrodes [26].	50
Figure 2-5.Schéma d'un système électrochimique non linéaire soumis à une perturbation	50
Figure 2-6(a,b). Représentation graphique des diagrammes de Nyquist et de Bode	53
Figure 2-7. Impédance du circuit équivalent de Randles: cas d'une couche de diffusion.....	54
Figure 3-1 : Montage expérimental utilisé pour les mesures électrochimiques	61

Figure 3-2: illustration schématique de la modification chimique de la surface de l'Or (ET) par CMA suivi d'un aptamère et d'une immobilisation pour la détection de Cadmium [12, 13] en utilisant électrode de référence (ER) et contre électrode (CE) intégrés.	63
Figure 3-3: voltammogrammes cycliques de (a) l'électrode en Or nue, (b) après dépôt de CMA (c) après immobilisation d'aptamère et (d) après la détection de 10^{-9} M de solution Cd^{2+} . (B) Voltammogrammes cycliques de l'électrodéposition de CMA d'un potentiel de -0,2 V à -1 V avec une vitesse de balayage de 80 mVs^{-1}	64
Figure 3-4: diagrammes de Nyquist de l'électrode en or nu (a), le CMA greffé électrochimiquement (b), après dépôt de l'aptamère (c) et après incubation d'Aptamère/CMA/Au dans 10^{-9} M Cd^{2+} (d) en présence de 5 mM de solution $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3- / 4-}$ dans une gamme de fréquences de 100 mHz - 200 kHz. La polarisation potentielle utilisée pour ces mesures a été optimisée à 128 mV.....	65
Figure 3-5: Optimisation de la concentration en Cd^{2+} -aptamère par SIE: (▲) 0,25 μM , (●) 0,5 μM et (■) 0,75 μM d'aptamère.	66
Figure 3-6: (A) Diagrammes de Nyquist de la surface Cd^{2+} -aptamer-ET(or) incubés avec des concentrations croissantes de Cd^{2+} allant de 10^{-3} à 10^{-10} M, (B) sensibilité de l'aptasensor par normalisation des données vers les différentes concentrations de cadmium . Encart: circuit équivalent utilisé pour l'ajustement des demi-cercles du tracé SIE Nyquist.	67
Figure 3-7: Etudes de la sélectivité de l'aptacapteur en présence de Hg, Pb et Zn.....	69
Figure 3-8: (A) courbes de l'impédance de Nyquist obtenues à partir de l'application sur un échantillon réel. (■) PBS; (□) Niveau 1 (correspondant à une addition de 0 M); (●) Niveau 2 (ajout de 10^{-8} M); (○) Niveau 3 (ajout de 10^{-7} M) et (▲) Niveau 4 (ajout de 2×10^{-7} M). (B) Courbe de sensibilité utilisée pour calculer la concentration d'analyte dans l'échantillon inconnu par la méthode des ajouts dosés. Les barres d'erreur représentent l'écart type relatif sur les mesures effectuées en triple.	70
Figure 4-1 : Electrode de travail en Carbone vitreux.....	75
Figure 4-2 : Électrode de référence (a) et contre électrode (b).....	76
Figure 4-3: (a) montage expérimental de la cellule électrochimique à trois électrodes connectée au (b) Potentio/Galvanostat SP300 utilisé pour les mesures électrochimiques.....	77
Figure 4-4: cellule électrochimique en verre à trois électrodes.....	77
Figure 4-5: représentation schématique des différentes étapes de la conception de l'aptacapteur pour la détection de Cadmium.	79
Figure 4-6: Voltammogrammes cycliques en présence de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3- / 4-}$ de l'électrode nue (a), Cs-CNTs/CV (b), AuNPs/Cs-CNTs/CV (c), Aptamère/AuNPs/Cs-CNTS/CV (d), Cd^{2+} / Aptamère/AuNPs/Cs-CNTS/CV (e) à une vitesse de balayage 50 mV/s	80
Figure 4-7: Circuit équivalent de Randles.....	81
Figure 4-8: (A) Diagrammes de Nyquist de la surface Cd^{2+} -aptamère-CV obtenus suite à l'incubation dans des concentrations croissantes de Cd^{2+} allant de 10^{-4} à 10^{-13} M, à un potentiel de -0.5V et une gamme de fréquence de 10kHz-100mHz. (B) La sensibilité de l'aptacapteur par normalisation des données vers les différentes concentrations du Cadmium.....	82
Figure 4-9: comparaison des réponses du biocapteur obtenues en présence d'éventuelles substances interférentes avec le Cadmium dans un tampon PBS à pH 4.5.	83

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Concentrations ubiquitaires en cadmium.....	4
Tableau 1-2 : Comparaison des aptamères aux anticorps.....	13
Tableau 1-3 : Exemples des Biocapteurs de cadmium.....	17
Tableau 3-1: Comparaison d'autres capteurs avec différentes méthodes de détection pour la détermination du Cd ²⁺	68
Tableau 3-2: détermination du Cd ²⁺ par les aptacapteurs proposés et la Spectroscopie d'Absorption Atomique (SAA) dans les échantillons d'eau et étude de récupération de l'aptasensor pour la détermination du Cadmium.	70

Listes des Acronymes et Symboles

ADN	Acide Désoxyribonucléique.
AFM	« Atomic Force Microscopy », microscopie à force atomique.
ARN	Acide ribonucléique
AuNPs	Nanoparticules d'or
CRSTRA	Centre de Recherche Scientifique et Technique sur les Régions Arides
ECV	Electrode de Carbone Vitreux
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbo-diimide
ENH	Électrode Normale à Hydrogène
GA	Glutaraldéhyde
LCIP	Laboratoire des Capteurs, Instrumentations et Procédés
LOD	Limite De Détection
LSA	Laboratoire de Sciences Analytiques
MWCNTs	Nanotubes de carbone multi parois
NHS	N-Hydro-xysuccinimide
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponoential enrichment
VC	Voltampérométrie Cyclique

Symboles

Symbole	Signification	Dimension usuelles
A	Aire de l'électrode	cm ²
C	Concentration de l'espèce en solution	mol .cm ⁻³
C _{Ox}	Concentrations des espèces oxydées en solution	mol .cm ⁻³
C _{dl}	Capacité de la double couche	μF.cm ⁻²
C _{red}	Concentrations des espèces réduites en solution	mol .cm ⁻³
D	Coefficient de diffusion	cm ² .s ⁻¹
E ₀	Potentiel standard	V
E _{P_c} , E _{P_a}	Potentiel de pic cathodique et anodique	V
E _{P_{c/2}} , E _{P_{a/2}}	Potentiel à mi-hauteur des pics cathodique et anodique	V
E _{eq}	Potentiel d'équilibre	V
F	Constante de Faraday	C .mol ⁻¹
G	Conductance	S
I	Intensité du courant	A
I _c	Courant capacitif	A

INTRODUCTION GENERALE

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 cancérigènes et peuvent induire beaucoup de types de cancer [1].

De nombreuses méthodes analytiques traditionnellement utilisées pour la détection des ions cadmium (II) ont été largement examinées dans la littérature; comme la spectroscopie d'absorption / émission atomique (AAS / AES) [2,3], la spectrométrie ultraviolette-visible [4], la voltamétrie de stripping anodique à onde carrée [5] et la spectrométrie de fluorescence atomique (AFS) [6]. Malgré leurs performances, la plupart de ces méthodes sont souvent fastidieuses, prennent du temps et nécessitent de grandes quantités de solvants, de réactifs et d'appareils sophistiqués. Par conséquent, des techniques peu coûteuses, sensibles et sélectives sont très souhaitables pour la surveillance du cadmium.

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...) [7-11]. 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 [12].

Les aptamères sont des molécules d'ARN ou d'ADN avec des structures tridimensionnelles spécifiques, sélectionnées par un processus de sélection in vitro appelé évolution systématique des ligands par enrichissement exponentiel (SELEX) [13]. En raison de leurs conformations uniques, les aptamères peuvent se lier à un large éventail de cibles telles que de petites molécules, des protéines et même des cellules entières. Parmi leurs caractéristiques avantageuses, une stabilité élevée, leur synthèse chimique est simple et la possibilité de les modifier, en ont fait de puissants concurrents aux anticorps en analyse moléculaire [14-16]. Ils constituent donc de bons éléments comme matrices efficaces dans l'élaboration des capteurs chimiques. Quelques aptacapteurs ont été développés dans

la littérature pour la détection des ions Cadmium. Hamid et al [17] ont développé un capteur électrochimique de Cadmium utilisant un aptamère d'ADN, où le mécanisme de détection a été basé sur un changement conformationnel induit par la liaison de la cible. Le point critique de la technologie de fabrication d'un aptacapteur reste l'immobilisation de biomolécules actives sur la surface du transducteur. Parmi ces techniques, la fixation covalente à des surfaces de capteur chimiquement modifiées ; qui est une méthode prometteuse basée sur l'interaction d'un groupe de marquage et d'une surface chimiquement fonctionnalisée résultant en une couche de film ordonné d'aptamères. L'attachement covalent chimique peut augmenter la spécificité et la sélectivité de la stratégie de la détection via les aptamères [18].

Dans le but de détecter le Cadmium à des très faibles concentrations dans les eaux, nous avons levé un défi d'élaborer deux biocapteurs électrochimiques sur la base d'un aptamère spécifique au Cadmium.

Le premier biocapteur est à base d'une électrode en Or modifiée chimiquement par la réduction électrochimique du sel de Diazonium (CMA) avec de l'acide carboxylique. Ceci a été utilisé pour l'immobilisation de l'aptamère du Cadmium amino-modifié par réaction Carbodiimide.

Le second biocapteur s'est mis en place par la modification d'une électrode de Carbone vitreux, d'abord avec des Nanotubes de Carbone – Chitosan (CNTs-CS), puis avec des nanoparticules d'Or électro-déposées (AuNPs) sur les CNTs-CS, et enfin l'immobilisation de aptamère-Cadmium par la réticulation via le glutaraldéhyde.

Afin d'atteindre notre objectif, l'élaboration de ces biocapteurs a été le fruit du travail réalisé principalement au sein du Laboratoire des Capteurs, Instrumentations et Procédés (LCIP) de l'Université de Khenchela (Algérie) et en collaboration avec l'Ecole Supérieure Nationale de la Biotechnologie de Constantine (Algérie), le Laboratoire de Sciences Analytiques (LSA) de l'Université de Claude Bernard Lyon 1 (France) et le Laboratoire des Biocapteurs, Analyse et Environnement (BAE), de l'Université de Perpignan Via Domitia (France).

La présente thèse est subdivisée en quatre chapitres.

Le premier chapitre est consacré pour une bibliographie présentant des généralités sur les biocapteurs à base d'aptamère et une présentation détaillée des procédés d'immobilisation des aptamères

Le deuxième chapitre intitulé «les techniques électrochimiques» qui résume les différentes techniques électrochimiques appliquées dans ce travail.

Alors pour le troisième chapitre, nous présentons la détection du Cadmium en utilisant le premier biocapteur à base d'aptamère immobilisé sur une plateforme d'électrode d'Or modifiée par les sels de Diazonium .

Tandis qu'en quatrième chapitre, qui est dédié aussi à la détection du Cadmium par le second biocapteur via aptamère-Cadmium sur une matrice composée d'AuNPs/CNTs/CS – Electrode en Carbone vitreux.

Pour finir, nous donnons une conclusion générale qui résume toutes les démarches avec des perspectives.

Références.

- [1] M. Di Benedetto, Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation: métaux lourds, axe: génie des procédés, centre spin, école des mines de Saint-Etienne, (1997).
- [2] N.A. Kasa, D.S. Chormey, Ç. Büyükpınar, F. Turak, T.B. Budak, S. Bakırdere, Determination of cadmium at ultratrace levels by dispersive liquid-liquid microextraction and batch type hydride generation atomic absorptionspectrometry, *Microchem. J.* 133 (2017) 144–148.
- [3] K.S. Rao, T. Balaji, T.P. Rao, Y. Babu, G. Naidu, Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, *Spectrochim. Acta B Atom Spectrosc.* 57 (2002) 1333–1338.
- [4] D. Xu, W. Fan, H. Lv, Y. Liang, Y. Shan, G. Li, Z. Yang, L. Yu, Simultaneous determination of traces amounts of cadmium, zinc, and cobalt based on UV–Vis spectrometry combined with wavelength selection and partial least squares regression, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 123 (2014) 430–435.
- [5] L.C.S. Figueiredo-Filho, B.C. Janegitz, O. Fatibelilo-Filho, L.H. Marcolino-Junior, C.E. Banks, Inexpensive and disposable copper mini-sensor modified with bismuth for lead and cadmium determination using square-wave anodic stripping voltammetry, *Analytical Methods* 5 (2013) 202–207.
- [6] Y.-k. Lü, H.-W. Sun, C.-G. Yuan, X.-P. Yan, Simultaneous determination of trace cadmium and arsenic in biological samples by hydride generation-double channel atomic fluorescence spectrometry, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1525–1529.
- [7] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 386 (2006) 1025-1041.
- [8] L. Barthelmebs, C. Calas-Blanchard, G. Istamboulie, J.-L. Marty, T. Noguer, Biosensors as analytical tools in food fermentation industry, *Bio-Farms for Nutraceuticals*, Springer 2010, pp. 293-307.
- [9] N.A. Mungroo, S. Neethirajan, Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry—a review, *Biosensors*, 4 (2014) 472-493.
- [10] A.M. Skelley, J.R. Scherer, A.D. Aubrey, W.H. Grover, R.H. Ivester, P. Ehrenfreund, F.J. Grunthaler, J.L. Bada, R.A. Mathies, Development and evaluation of a microdevice for amino acid biomarker detection and analysis on Mars, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (2005) 1041-1046.
- [11] T.B. Tims, D.V. Lim, Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores directly from powders with an evanescent wave fiber-optic biosensor, *Journal of microbiological methods*, 59 (2004) 127-130.
- [12] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Pure and applied chemistry*, 71 (1999) 2333-2348.
- [13] X. Sun, F. Li, G. Shen, J. Huang, X. Wang, Aptasensor based on the synergistic contributions of chitosan–gold nanoparticles, graphene–gold nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes–cobalt phthalocyanine nanocomposites for kanamycin detection, *Analyst*, 139 (2014) 299-308.
- [14] W. Tan, M.J. Donovan, J. Jiang, Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications, *Chemical reviews*, 113 (2013) 2842-2862.
- [15] K. Sefah, J. Phillips, C. Wu, Cell-Specific Aptamers for Disease Profiling and Cell Sorting, *Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics*, Springer 2015, pp. 197-213.
- [16] K.-M. Song, S. Lee, C. Ban, Aptamers and their biological applications, *Sensors*, 12 (2012) 612-631.
- [17] H.R.L.Z. Zhad, Y.M.R. Torres, R.Y. Lai, A reagentless and reusable electrochemical aptamer-based sensor for rapid detection of Cd (II), *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 803 (2017) 89-94.
- [18] Z. Ling, W. Ming-Hua, W. Jian-Ping, Y. Zhun-Zhong, Application of biosensor surface immobilization methods for aptamer, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 39 (2011) 432-438.

Chapitre 01

GENERALITES SUR LES BIOCAPTEURS A

1.1. Introduction

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 dans la deuxième partie a traité plus en détail des différentes méthodes les plus couramment utilisées pour réaliser de telles fonctionnalisations de surface.

Nous avons décrit 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 ils existent 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.

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

1.2. Généralité sur le cadmium

1.2.1. 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 [1].

1.2.2. Propriétés du cadmium

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

a. 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.

b. 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.

1.2.3. 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).

1.2.4. 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 [2], pouvant provoquer 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.

1.2.5. Principales sources de pollution

Le cadmium présent dans l'atmosphère est la conséquence de phénomènes naturels et anthropiques.

Le cadmium contenu dans la croûte terrestre peut être dispersé dans l'air au cours des éruptions volcaniques. Cependant les activités industrielles, les incinérateurs d'ordures ménagères constituent les principales sources de contamination atmosphérique. Les fortes concentrations de cadmium dans l'air sont le lot des villes très industrialisées.

Dans l'eau le cadmium provient de l'érosion naturelle des sols et surtout des rejets industriels et miniers. Le cadmium présent dans les tuyaux des réseaux de distribution d'eau peut contaminer l'eau de consommation. Le taux de contamination par cette voie est fonction de la durée du séjour de l'eau dans le réseau de distribution.

La présence du cadmium dans les végétaux est le fait de l'absorption de ceux-ci à partir de sol contaminé.« Le **tableau 1.2** » donne les concentrations moyennes en cadmium dans différents milieux [3].

Tableau 1-1 :Concentrations ubiquitaires en cadmium

MILIEU	CONCENTRATION
Air	< 5 ng.m ⁻³
océans	< 1 ng.L ⁻¹
Sols limoneux	< 0,1 mg.Kg ⁻¹
Sols argileux	< 0,2 mg.Kg ⁻¹

1.2.6. Conséquences sanitaires

Environ un tiers du cadmium absorbé par un organisme humain sain provient de denrées d'origine animale et deux tiers d'aliments d'origine végétale. Les personnes sujettes au tabac ou exerçant une activité à risque sont susceptibles de présenter des teneurs en cadmium supérieures à celles admises pour l'organisme.

L'exposition chronique au cadmium provoque des œdèmes pulmonaires, un ramollissement généralisé des os et un dysfonctionnement des reins. Ces pathologies peuvent être irréversibles.

1.3. Les biocapteurs

1.3.1. 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].

1.3.2. 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.

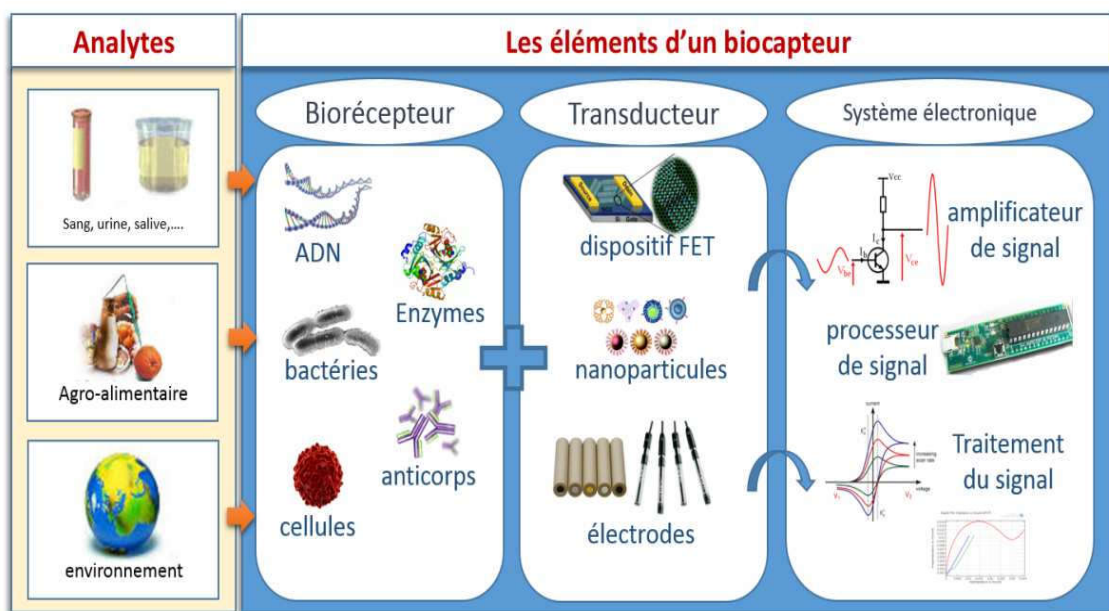


Figure 1-1 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur

La « **Figure 1.1** » 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.

1.3.3. Les performances des biocapteurs

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

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.

1.3.4. 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 1.2** ».



Figure 1-2: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.

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 [20], le glucose[21], les applications de diagnostic rapide en temps réel, de type « point-of-care », et la découverte de nouveaux médicaments.[22]

1.3.5. Classification des biocapteurs

Les biocapteurs sont classés selon le mode de transduction en 4 catégories : optique, thermique, piézoélectrique et électrochimique. Dans ce qui suit, nous nous intéressons à définir la transduction électrochimique qui sera utilisée comme mode de transduction des biocapteurs développés au cours de cette thèse.

1.3.5.1. Transduction électrochimique

Les capteurs électrochimiques peuvent être classés en quatre catégories selon leur mode de transduction: potentiométrique, ampérométrique, conductimétrique ou impédimétrique [23]. Le principe de base d'une mesure électrochimique repose sur le fait que certaines substances électroactives en solution (molécules ou ions) peuvent échanger des électrons avec une électrode, ceci dans des conditions analytiques bien définies en particulier par le potentiel auquel cet échange a lieu. Les différents principes exigent toujours une conception spécifique de la cellule électrochimique.

a. Potentiométrie

Le fonctionnement des capteurs potentiométriques est basé sur la mesure d'une différence de potentiel entre l'électrode sélective et une électrode de référence disposées dans la solution à analyser « **Figure 1.3.** ». Au cours d'une fluctuation d'activité de l'espèce à détecter, l'interface membrane –solution est le siège de phénomènes interfaciaux. Il s'établit consécutivement à ces phénomènes un équilibre de potentiels chimiques de part et d'autre de l'interface [24]

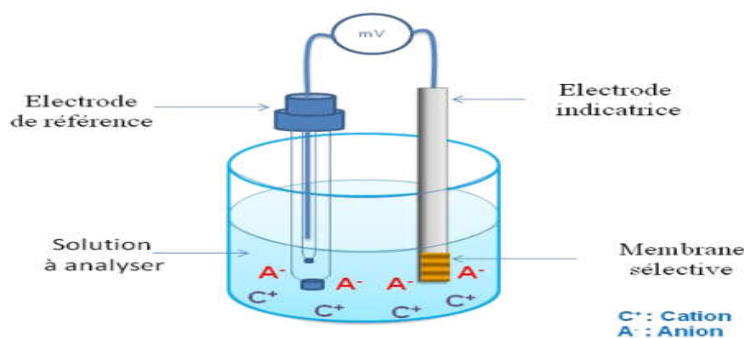


Figure 1-3 : Principe de mesure potentiométrique : accumulation de charges électriques à la surface de l'électrode indicatrice.

b. L'impédancemétrie

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est une excellente technique pour étudier les propriétés électriques interfaciales de n'importe quel matériau solide ou liquide connecté à un transducteur électrochimique. C'est une technique non invasive qui ne requiert pas d'instrumentation complexe permettant des applications courantes en laboratoire. Dans la dernière décennie, l'SIE a pris une importance croissante dans les domaines des technologies liées à la biophysique et aux biocapteurs [25]. Cette popularité est due à son aptitude à fournir un bon nombre d'informations. Elle permet une meilleure et plus complète compréhension d'un système électrochimique que les autres techniques électrochimiques.

c. La conductimétrie

La mesure de la résistance d'une solution permet la déduction de la concentration de charges entre deux électrodes. La conductance d'une cellule de conductivité est fonction de la surface de sa section ainsi que de sa longueur conformément à la loi de Pouillet, qui stipule:

$$G = k \frac{A}{l} \quad (1.1)$$

Ou :

G est la conductance (S).

K la conductance spécifique du corps (S/cm).

A la surface de sa section (cm²) et l sa longueur (cm).

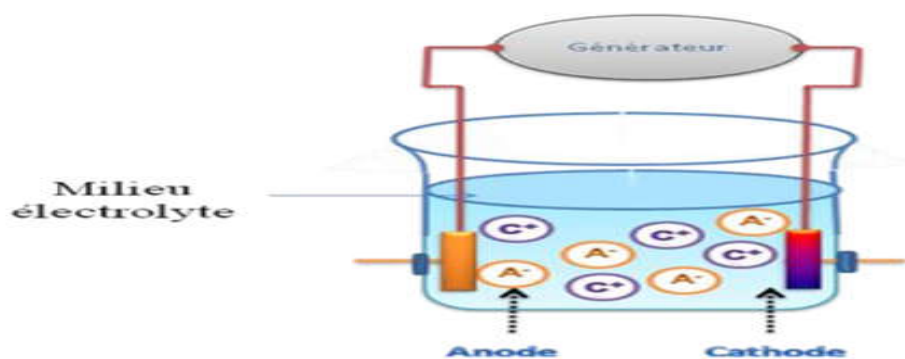


Figure 1-4:Schéma de principe des mesures conductimétrique : Transfert d'électron, migration d'ions.

La conductance de cellule est proportionnelle à la concentration de l'électrolyte dans laquelle elle est plongée. Un étalonnage préalable dans une solution de concentration connue est nécessaire. Les mesures sont effectuées à courant alternatif afin d'éviter des variations de résistance engendrées par la polarisation des électrodes à courant continu.

Dans un cas général, pour un électrolyte asymétrique (cas de fluides complexes), cette technique ne possède aucune sélectivité. C'est pourquoi elle est utilisée en conjonction avec des techniques de séparation, comme la chromatographie liquide à haute performance [27]

d. Amperométrie

Les méthodes ampérométriques exploitent des réactions d'oxydoréduction qui engendrent par l'application d'un potentiel spécifique de l'espèce électroactive, des échanges d'électrons entre un métal d'électrode et une solution. Le courant électrique induit par ces réactions chimiques est appelé "courant faradique" et dépend linéairement de la concentration de la cible dans l'analyte. Dans le cas des biocapteurs ampérométriques, les éléments de reconnaissance biologique qui réagissent sélectivement avec l'analyte d'intérêt sont principalement des réactions enzymatiques ou des mécanismes anticorps-antigène (biomolécules) [28]. Historiquement, nous pouvons distinguer trois générations de biocapteurs ampérométriques basés sur des réactions enzymatiques, définies selon les différents mécanismes liés au transport électronique [29]. Les biocapteurs de première génération sont basés sur l'électroactivité du substrat (ou produit) enzymatique. Ceux de deuxième génération utilisent des médiateurs redox, libres ou immobilisés sur la biomolécule. Enfin, la troisième génération est basée sur un principe de transfert électronique direct entre la biomolécule redox et la surface de l'électrode [30].

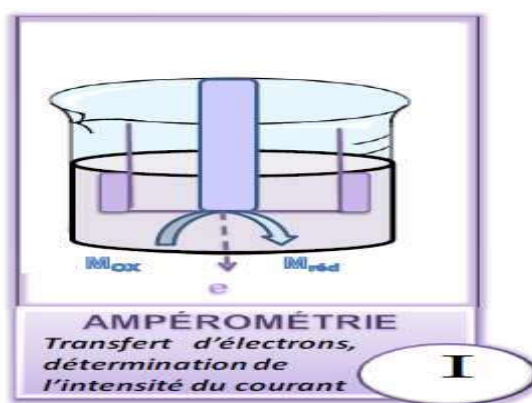


Figure 1-5:Schéma du principe de l'ampérométrie

1.3.5.2. 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 1.6** ». 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[31].

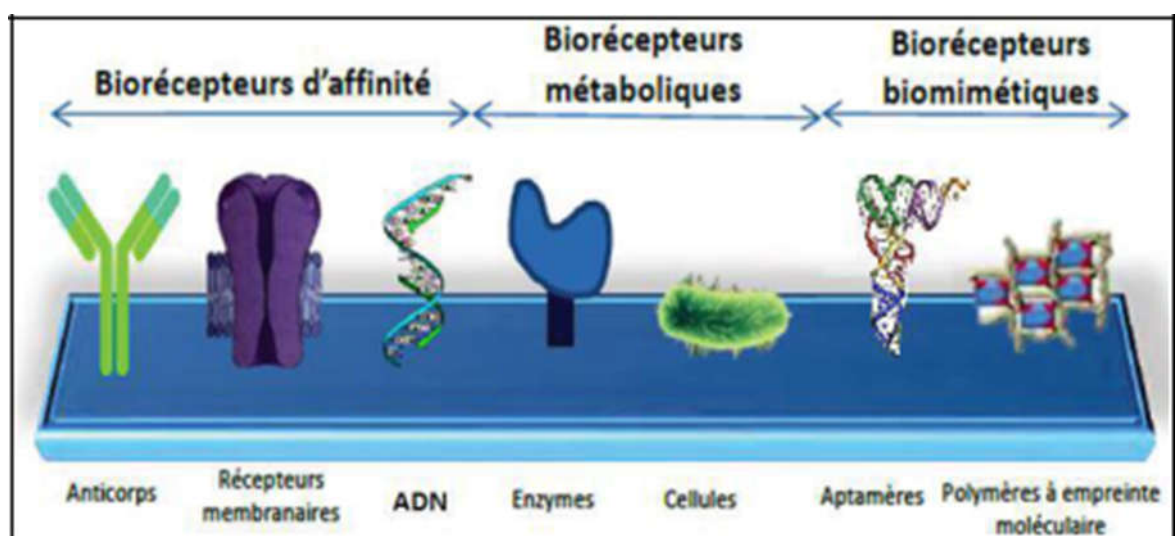


Figure 1-6: Les différents types de biorecepteurs

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.

1.4. 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 [32]. 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 [33]. 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.

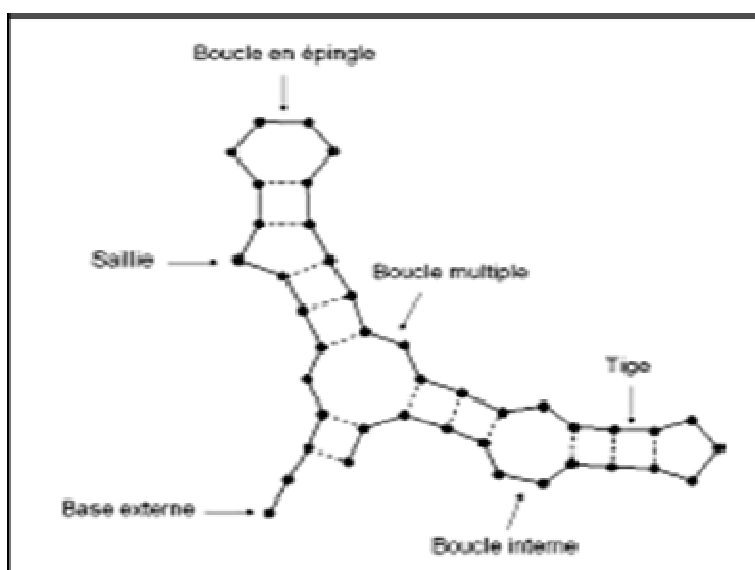


Figure 1-7 :Caractéristiques structurales des acides nucléiques, adapté de Hermann et al.[34]

1.4.1. 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 1.2** » :

Tableau 1-2 : 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 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 immunogènes sont difficiles à obtenir.	Des molécules cibles faiblement immunogènes 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.

1.4.2. 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 [35, 36], 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 1.8** ». 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.

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 [37].

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.

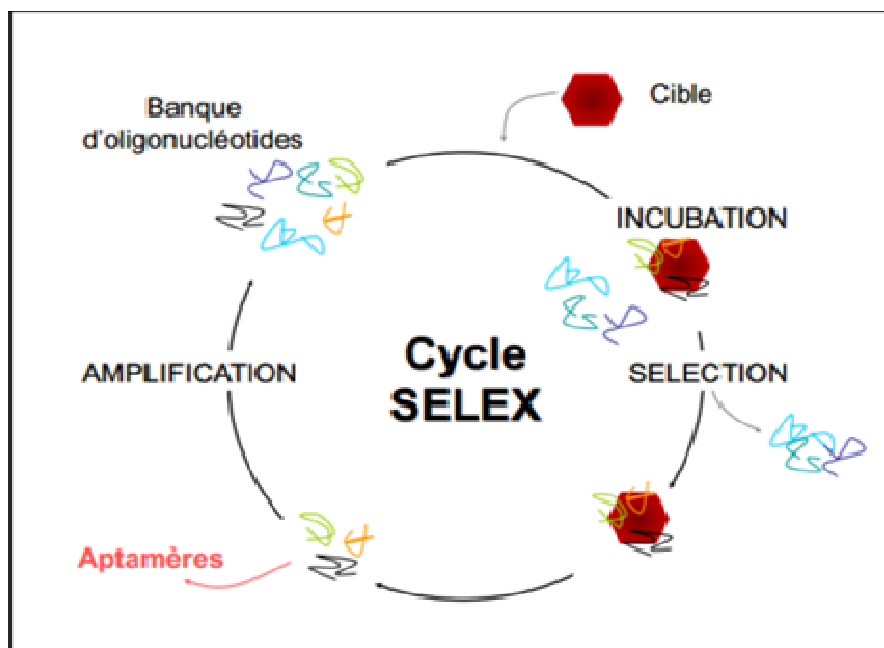


Figure 1-8 :Principe de la méthode SELEX. Chaque cycle de sélection est composé d'une étape d'incubation entre la cible et la banque d'oligonucléotides, une étape de sélection des séquences ayant présenté une affinité pour la cible et une étape d'amplification des séquences sélectionnées.

1.4.3. Applications

La découverte des aptamères et de leurs propriétés a ouvert la voie à de multiples applications . 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 [38] ainsi que Tombelli et al. [39] en résument les principales avancées.

1.5. 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 1.3** ». montre quelques exemples des biocapteurs pour la détection de cadmium

Tableau 1-3 :Exemples des Biocapteurs de cadmium

Molécule réceptrice sélective d'ions	Limite de détection (plage linéaire)	Mécanisme de capteur	Références
Levure	0,2 nM	Ampérométrie	Jarque et al.2016
Au NPs	3,5 nM (10–30 μ M)	Analyse colorimétrique à l'aide de NP Au et d'ascorbes fonctionnalisés à l'acide trithiocyanurique	Wang et al.2018
Colonne d monolithe en silice C18	0,8 nM (0,44 à 44 μ M)	Chromatographie liquide à haute performance en phase inversée	Thirumalai al. 2018
L-cysteine	0.12 M	Voltametrie cyclique et spectroscopie d'impédance utilisant une électrode en carbone vitreux modifiée avec graphène et chitosan.	Wenshu Zhou et al2015
Nanoparticul es de bismuth	20 nM	Nano composite de nanoparticules d'oxyde de graphène réduit – bismuth	Sahoo et al.2013
CNT	2,2 pM	Appareils d'analyse colorimétriques et électrochimiques à base de papier microfluidique utilisant des NTC multi-parois sérigraphiées.	Rattanarat 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
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
Electrodes à couche épaisse sérigraphiées	4,4 nM (0–1,3 μ M)	Couple électrochimique standard d'électrodes solides à couche épaisse de ferrocyanure de fer cyanure de potassium	Prášek et al. 2006

1.6. 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 [41], on distingue :

1.6.1. Adsorption

L'adsorption physique est la méthode la plus simple qui permet l'immobilisation de l'élément biologique sur le transducteur « **Figure 1.9** ». 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.

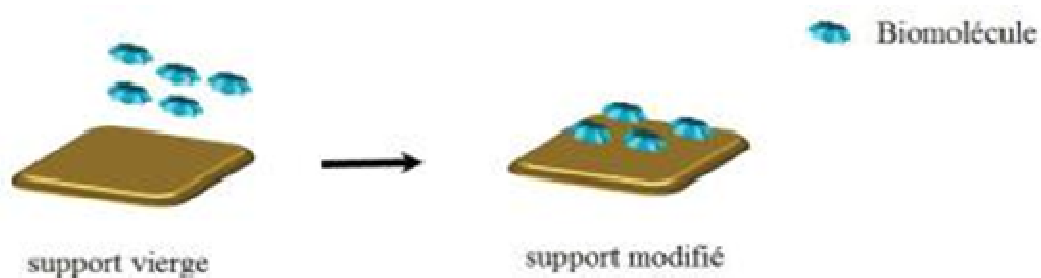


Figure 1-9:Immobilisation des biomolécules par adsorption.

1.6.2. 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 [42].

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 [43].

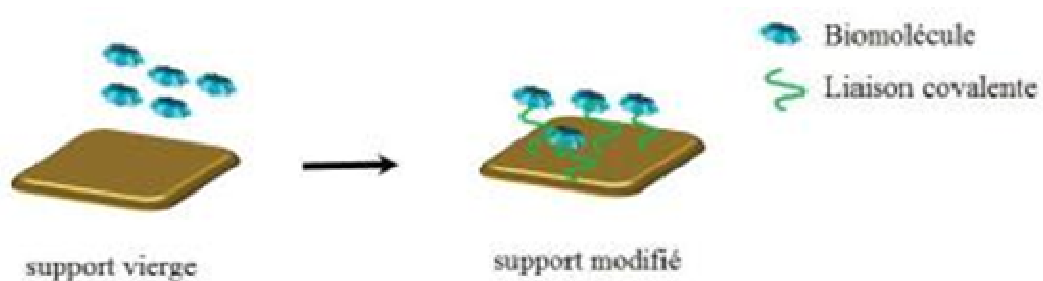


Figure 1-10: Immobilisation des biomolécules par liaison covalente.

1.6.3. Le piégeage

La méthode d'inclusion physique consiste à incorporer le biorécepteur dans une matrice organique (polymère) [44], ou inorganique (le chitosane, la gélatine, l'agarose) [45-46]. 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 [47]. 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.

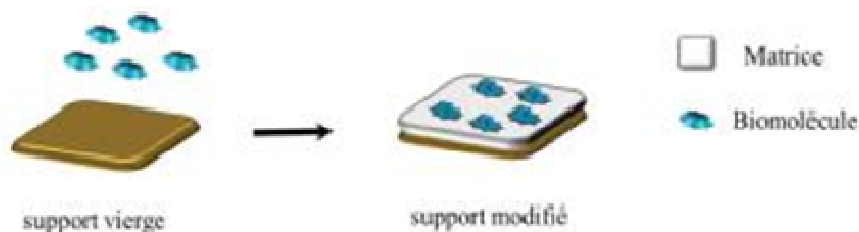


Figure 1-11: Immobilisation des biomolécules par piégeage.

1.6.4. 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) [48].

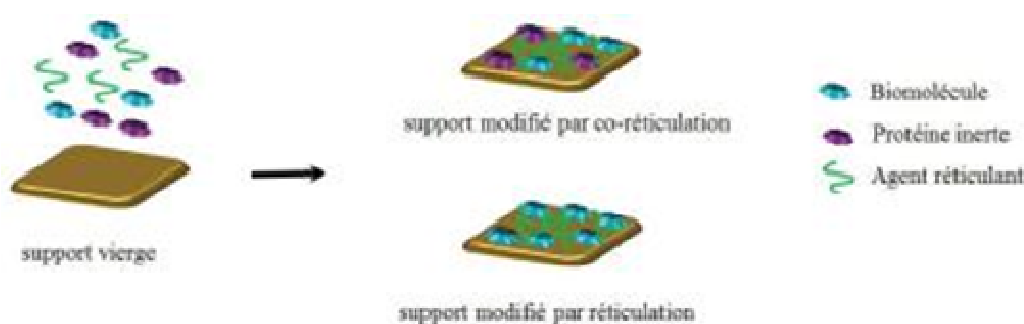


Figure 1-12: Immobilisation des biomolécules par réticulation et co-réticulation.

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 [49].

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 [50] ou gazeuse [51], pour l'immobilisation d'aptamère ou de cellules en vue du développement de biocapteurs.

1.7. La modification de la surface d'électrode par des monocouches auto assemblées et des sels de diazonium

1.7.1. Les monocouches auto assemblées (SAMs) ; modification chimique de la surface

L'auto-assemblage, au sens général du terme, c'est la formation spontanée des assemblages moléculaires, auto-organisés, par immersion d'un substrat dans un solvant organique contenant des molécules susceptibles d'interagir avec la surface du solide. Il existe une grande variété de groupements fonctionnels se liant à un métal, oxyde métallique et semiconducteurs spécifiques.

En général, une SAM est constituée de trois grandes parties.

Une tête réactive: cette première partie possède une grande affinité avec le substrat. Une réaction chimique (chimisorption) fortement exothermique se produit entre ces molécules et des sites spécifiques de la surface. La liaison peut être covalente, ionique ou pseudo-covalente, elle intervient dans l'arrangement des molécules SAMs. Les molécules vont chercher à occuper tous les sites disponibles à la surface du substrat, déplaçant, dans ce processus, les molécules qui pouvaient préalablement être adsorbées à la surface : c'est le phénomène de « self-cleaning ». Cet effet, spontané, implique une certaine mobilité des molécules à la surface du substrat, ce qui permet un assemblage dense et ordonné.

Un corps: c'est la partie centrale de la molécule, elle est constituée par des chaînes alkyles simples [52] qui peu inclure un ou plusieurs groupement fonctionnels comme, par exemple, la fonction amide ou la fonction phényle [53-54]. Lorsque les molécules sont suffisamment proches les unes des autres, suite au processus du chimisorption décrit précédemment, des interactions de Van Der Waals entre les chaînes interviennent. Si le corps de la molécule SAM comporte des groupements polaires, alors les interactions électrostatiques peuvent dominer. Ces forces contribuent à la formation d'un assemblage dense et ordonné de molécules. L'ordre et la stabilité des SAMs dépendent aussi de la longueur des chaînes : plus la longueur des chaînes croît, plus les SAMs sont ordonnées et stables.

Une queue: ou fonction terminale, cette partie est constituée d'un groupement fonctionnel ou polyfonctionnel, selon l'expérimentation visée et le domaine d'application ($R = CH_3, COOH, OH, NH_2$), les caractéristiques de ce groupement peuvent modifier l'organisation et les propriétés de la SAM [55-56].

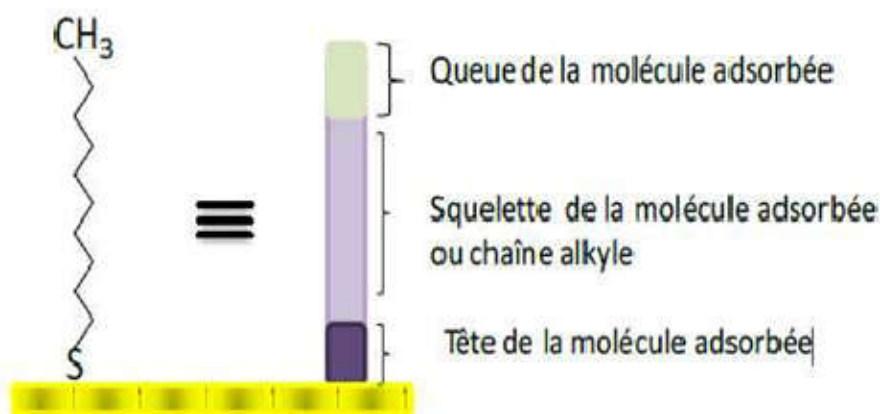


Figure 1-13: Schéma de base d'une couche SAM.

Les SAMs possèdent des propriétés remarquables telles que: la facilité à préparer des monocouches ordonnées, stables et reproductibles, qui peuvent être facilement utilisées pour la fixation de biomolécules comme les enzymes et permettant d'augmenter leur activité [57]. De plus, les SAMs donnent la possibilité d'étudier certaines interactions comme l'adsorption des protéines, l'interaction anticorps-antigène, immobilisation d'enzyme et l'hybridation d'ADN en utilisant des

techniques de microscopie à effet de tunnel et de microscopie à force atomique. Ces particularités des SAMs les rendent largement utilisées dans l'élaboration de biocapteurs.

Ces dernières années, de nombreux biocapteurs ont été développés utilisant les monocouches auto assemblées pour des applications variées. A titre d'exemple ; la quantification de glucose dans le lait par un biocapteur de glucose oxydase [58], l'antigène D-Dimère a été utilisé avec un système SAM/ SWCNT pour une détermination sensible de thrombine [59]. De même, un immunocapteur impédimétrique a été développé pour la quantification de cytokine [60]. L'alcool oxydase et la glucose oxydase ont également été immobilisées sur des électrodes d'or afin de détecter l'éthanol et le glucose respectivement [61-62]. Aussi, un biocapteur à base de l'acétylcholinestérase a été développé pour permettre la quantification de malathion [63].

1.7.2. Les sels de diazonium ; modification électrochimique de la surface

Les sels d'aryle ou alkyldiazonium sont un groupe de composés organiques qui possèdent une structure caractéristique : $R-N_2^+ X^-$ telle que :

R : un résidu organique comme alkyl ou aryle.

X : un contre-anion tel que les halogènes.

Ces composés sont connus pour leur caractère stable et leur grande réactivité. Ils sont caractérisés par leur structure amphiphiles (tête polaire diazonium (N_2^+) hydrophile et un noyau aromatique (hydrophobe).

La modification des microélectrodes par le sel organique de diazonium a été introduite par Delamar et al en 1992 [64]. Cette alternative est prometteuse pour la modification des arrangements de microélectrodes, une électrode modifiée par une couche organique de diazonium voit son domaine d'électroactivité augmenter. De plus, la capacité à créer une surface diazonium-modifiée par l'application d'un potentiel permet une fonctionnalisation sélective de la surface des microélectrodes étroitement situées [65]. Dans cette approche la réduction d'un sel diazonium va créer un aryl radical centré après l'élimination spontanée de dinitrogène. Le radical aryl résultant peut alors former une liaison covalente avec une surface conductrice ou semiconductrice. Cette approche donne des surfaces bio-fonctionnelles très stables. De plus cette approche est très facile à manipuler vu la grande capacité à synthétiser des sels diazonium avec une vaste gamme de groupes fonctionnels. Ceci permet d'immobiliser plusieurs biomolécules (enzymes, anti-corps, ADN, etc). A titre d'exemple, Corgier et al ont démontré l'utilisation potentielle d'aryl diazonium pour l'électro-

immobilisation directe des protéines. Ils ont montré que les immunoglobulines de type G (IgG) covalamment couplées avec 4-carboxyméthylaniline (CMA) pourraient être greffées à la surface d'une électrode spécifique, par l'électro-réduction d'une fonction de diazonium produite in situ [66]. De même, Delmer et al, ont également immobilisée la glucose oxydase sur une électrode de carbone vitreux par une liaison

covalente avec 4- nitophenyldiazonium [67]. Un immunocapteur impédimétrique basé sur le greffage électrochimique de 4-nitrophenyl diazonium a été développé pour la détection de la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* [68].

1.8. 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 [69–70]. 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.

1.8.1. 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.

1.8.1.1. Applications des nanoparticules dans les biocapteurs

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 organique volatils pour la dépollution de l'air et de l'eau [71]. En médecine, les nanoparticules d'or ont favorisé l'évolution du domaine de l'imagerie [72]et du diagnostic [73,74]. 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 [75].Elles offrent l'avantage d'être biocompatibles, non cytotoxiques, et facilement fonctionnalisables[76] . 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 etl'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[77-78]. Les domaines d'applications des NPs d'or sont tres varies. Leurs possibilites d'applications sont non seulement liees aux proprietes intrinseques 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 1.14** ».

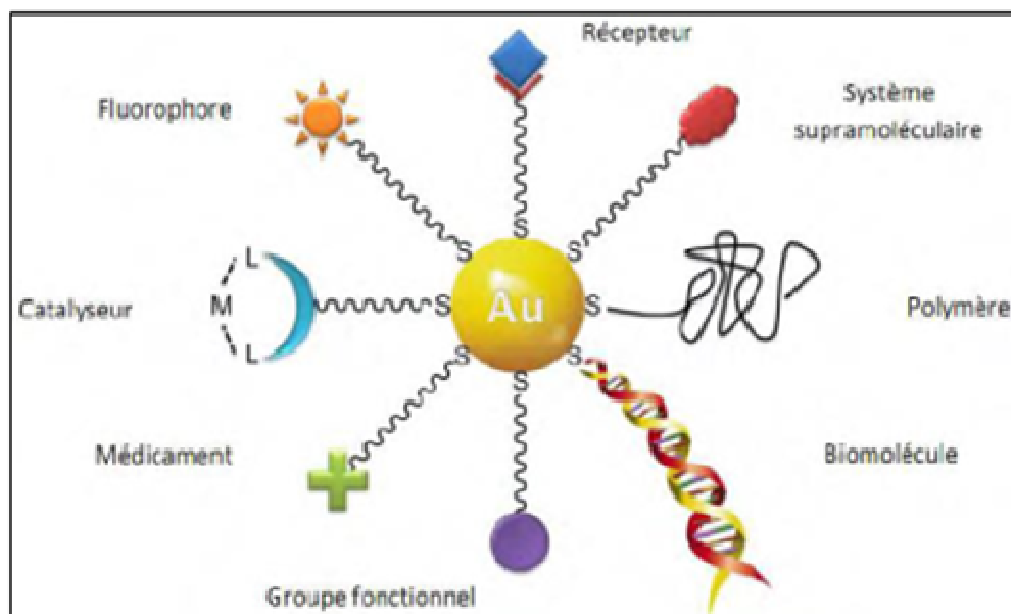


Figure 1-14 : Schématisation d'une nanoparticule d'or aux fonctionnalités multiples pour des applications diverses.

1.8.2. 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 1.15** ». 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) . 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 [79-80-70].

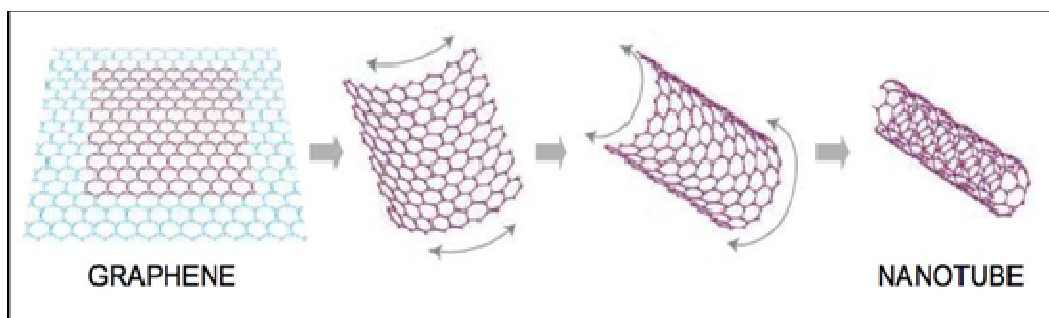


Figure 1-15: Feuille de graphène enroulée en cylindre

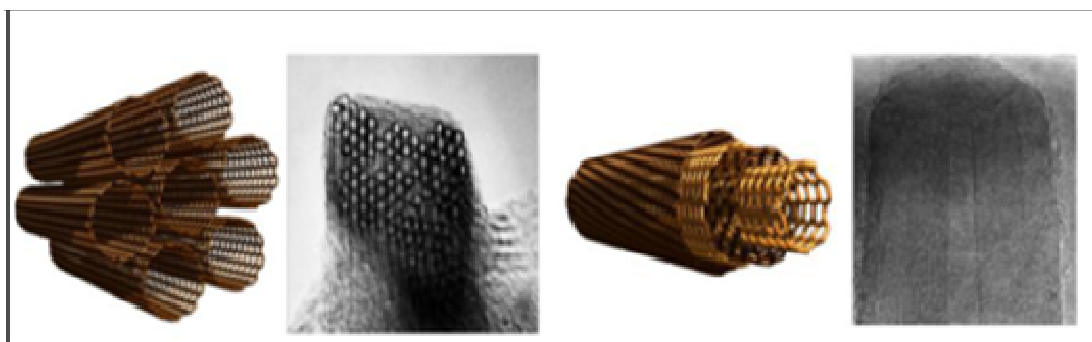


Figure 1-16: A) Images TEM et représentation schématique de la structure des SWCNT ; B) Image TEM et représentation schématique de la structure des MWCNT.

1.8.2.1. 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 1.17** » ci-dessous [81].

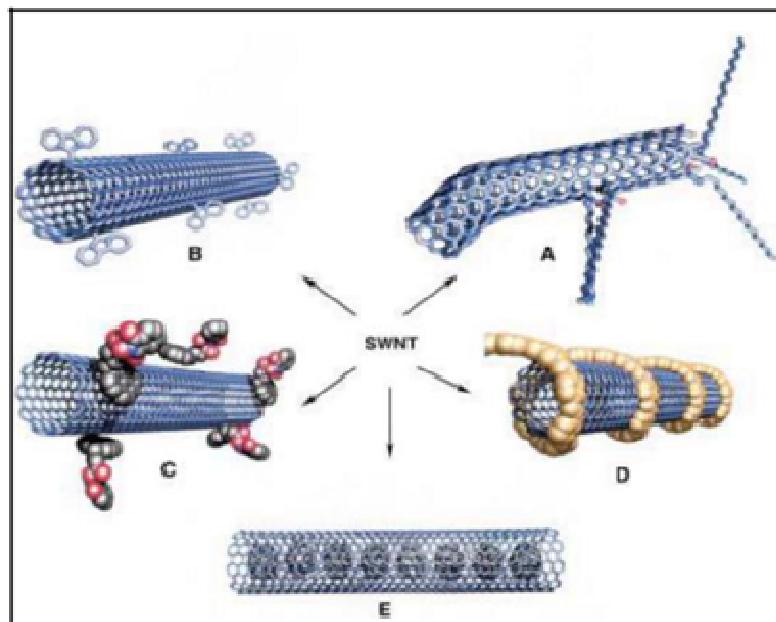


Figure 1-17: Exemple de fonctionnalisation des SWCNT avec A) la fonctionnalisation des défauts, B) la fonctionnalisation covalente, C) la fonctionnalisation non-covalente, D) la fonction par des polymères et E) la fonctionnalisation endoédrique. Reproduit de [81].

1.8.2.2. 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 recourt 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 [82-83] « **Figure 1.18** ». 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+}

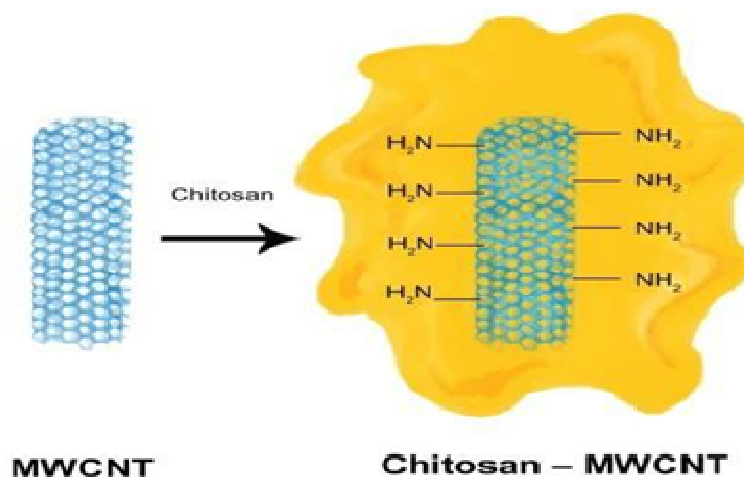


Figure 1-18 : Composite CNTs-Chitosan

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.

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 1.19** ».

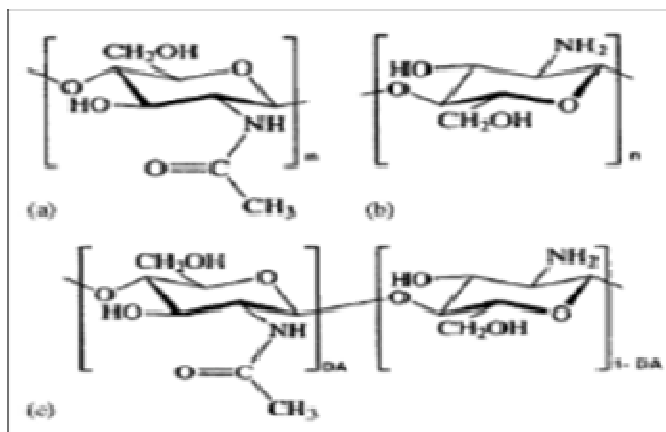


Figure 1-19 : Structure chimique du N-acétyl-D-glucosamine (a), de D-glucosamine (b) et du chitosane (c) [84].

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 (NH₂) pour le chitosane 100% désacétylé et acétamide (-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 [85,87]. 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 (NH₂) 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.

1.8.2.3. Applications des nanotubes dans les biocapteurs

L'utilisation de nanotubes de carbone pour le développement des biocapteurs suscite un intérêt croissant car il permet d'une part de minimiser le problème de diffusion, d'augmenter la surface de contact avec le milieu environnant ainsi que la densité de greffage des biomolécules et d'autre part, de maintenir la stabilité et l'activité de la biomolécule. En termes d'amélioration des performances des biocapteurs, les nanotubes de carbone permettent d'augmenter la sensibilité et d'abaisser le seuil de détection.

1.9. Conclusion

Dans ce chapitre est consacré aux biocapteurs, principe de fonctionnement, différents constituants, modes de transduction, techniques d'immobilisation des aptamères. Ces différentes parties seront illustrées par quelques exemples d'application.

Références.

- [1] L. Nakib, S. Mehennaoui, Mise au point d'une technique d'extraction des éléments traces métalliques dans les produits de la mer et leurs dosages par spectrophotométrie d'absorption atomique, (2009).
- [2] M. Chowdhury, E. Pane, C. Wood, Physiological effects of dietary cadmium acclimation and waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 139 (2004) 163-173.
- [3] M. MOKRANI, DETERMINATION DU NIVEAU DE CONTAMINATION PAR LES METAUX LOURDS DANS LES POISSONS D'IMPORTATION CAS DE LA CREVETTE ET FILET DE MERLAN.
- [4] L. Clark Jr, Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions, *ASAIO Journal*, 2 (1956) 41-48.
- [5] L. Clark Jr, Lyons C (1962) *Ann. NY. Acad. Sci.*, pp. 29-45.
- [6] G.G. Guilbault, J.G. Montalvo Jr, Urea-specific enzyme electrode, *Journal of the American Chemical Society*, 91 (1969) 2164-2165.
- [7] S. D'souza, Microbial biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 16 (2001) 337-353.
- [8] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and bioelectronics*, 16 (2001) 121-131.
- [9] E.B. Bahadır, M.K. Sezgintürk, Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics, *Talanta*, 132 (2015) 162-174.
- [10] M.L. Sin, K.E. Mach, P.K. Wong, J.C. Liao, Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases, *Expert review of molecular diagnostics*, 14 (2014) 225-244.
- [11] S. Rodriguez-Mozaz, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 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, *Bio-Farms for Nutraceuticals*, Springer2010, pp. 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. Ivester, P. Ehrenfreund, F.J. Grunthaler, J.L. Bada, R.A. Mathies, Development and evaluation of a microdevice for amino acid biomarker detection and analysis on Mars, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (2005) 1041-1046.
- [15] T.B. Tims, D.V. Lim, Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores directly from powders with an evanescent wave fiber-optic biosensor, *Journal of microbiological methods*, 59 (2004) 127-130.
- [16] D. DUPONT, Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire, *Techniques de l'ingénieur. Bioprocédés*, (2005).
- [17] L.D. Mello, L.T. Kubota, Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries, *Food chemistry*, 77 (2002) 237-256.
- [18] S. Rodriguez-Mozaz, M.-P. Marco, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378 (2004) 588-598.

- [19] I. Karube, Y. Nomura, Enzyme sensors for environmental analysis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10 (2000) 177-181.
- [20] S.K. Arya, M. Datta, B.D. Malhotra, Recent advances in cholesterol biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (2008) 1083-1100.
- [21] J. Mastrototaro, The MiniMed continuous glucose monitoring system (CGMS), *J Pediatr Endocrinol Metab*, 12 (1999) 751-758.
- [22] M. Keusgen, Biosensors: new approaches in drug discovery, *Naturwissenschaften*, 89 (2002) 433-444.
- [23] N. JAFFREZIC-RENAULT, C. MARTELET, P. CLECHET, Capteurs chimiques et biochimiques, *Techniques de l'ingénieur. Mesures et contrôle*, (1994) P360R420. 361-P360420. 360420.
- [24] H.H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, Surface plasmon resonance: a versatile technique for biosensor applications, *Sensors*, 15 (2015) 10481-10510.
- [25] B. Pejčic, R. De Marco, Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization, *Electrochimica acta*, 51 (2006) 6217-6229.
- [26] S. Helali, Conception et réalisation de matériaux biofonctionnels pour des dispositifs capteurs impédimétriques, *Ecully, Ecole centrale de Lyon*, 2005.
- [27] N. Jaffrezic-Renault, S.V. Dzyadevych, Conductometric microbiosensors for environmental monitoring, *Sensors*, 8 (2008) 2569-2588.
- [28] S. Borgmann, A. Schulte, S. Neugebauer, W. Schuhmann, Amperometric biosensors, *Advances in Electrochemical Science and Engineering*, 2 (2011).
- [29] W. Vastarella, Enzyme modified electrodes in amperometric biosensors, *Facolta A Discienze Matematiche Fisiche Naturail Dipartimentio Di Chimica*, (2001).
- [30] R.S. Freire, C.A. Pessoa, L.D. Mello, L.T. Kubota, Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity, *Journal of the Brazilian chemical society*, 14 (2003) 230-243.
- [31] J.P. Chambers, B.P. Arulanandam, L.L. Matta, A. Weis, J.J. Valdes, Biosensor recognition elements, *Texas Univ at San Antonio Dept of Biology*, 2008.
- [32] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *science*, 249 (1990) 505-510.
- [33] T. Hermann, D.J. Patel, Adaptive recognition by nucleic acid aptamers, *Science*, 287 (2000) 820-825.
- [34] T. Hermann, D.J. Patel, Stitching together RNA tertiary architectures, *Journal of molecular biology*, 294 (1999) 829-849.
- [35] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *nature*, 346 (1990) 818-822.
- [36] C. TUERK, L. GOLD, Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage, *Science*, 505-510.
- [37] J.-J. Toulmé, S. Da Rocha, E. Dausse, L. Azéma, I. Lebars, S. Moreau, Les aptamères: Du concept à l'outil, *Médecine Nucléaire*, 31 (2007) 478-484.
- [38] E. Luzi, M. Minunni, S. Tombelli, M. Mascini, New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 810-818.
- [39] S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, Analytical applications of aptamers, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2005) 2424-2434.
- [40] A.B. Iliuk, L. Hu, W.A. Tao, Aptamer in bioanalytical applications, *Analytical chemistry*, 83 (2011) 4440-4452.
- [41] S.B. Nimse, K. Song, M.D. Sonawane, D.R. Sanyal, T. Kim, Immobilization techniques for microarray: challenges and applications, *Sensors*, 14 (2014) 22208-22229.
- [42] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech*, 3 (2013) 1-9.
- [43] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnology advances*, 30 (2012) 489-511.

- [44] A. Bratov, N. Abramova, J. Munoz, C. Dominguez, S. Alegret, J. Bartroli, Photocurable polymer matrixes for potassium-sensitive ion-selective electrode membranes, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 3589-3595.
- [45] K. Wan, J. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, A. Soldatkin, Sensitive detection of pesticide using ENFET with enzymes immobilized by cross-linking and entrapment method, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 58 (1999) 399-408.
- [46] J.-L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbe, Improvement of poly (amphiphilic pyrrole) enzyme electrodes via the incorporation of synthetic laponite-clay-nanoparticles, *Talanta*, 44 (1997) 2209-2215.
- [47] Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, Microbial biosensors, *Analytica chimica acta*, 568 (2006) 200-210.
- [48] 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.
- [49] D.R. Walt, V.I. Agayn, *The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde*, Elsevier, 1994.
- [50] M.-C. Radulescu, B. Bucur, M.-P. Bucur, G.L. Radu, Bionzymatic biosensor for rapid detection of aspartame by flow injection analysis, *Sensors*, 14 (2014) 1028-1038.
- [51] M. Sheliakina, V. Arkhypova, O. Soldatkin, O. Saiapina, B. Akata, S. Dzyadevych, Urease-based ISFET biosensor for arginine determination, *Talanta*, 121 (2014) 18-23.
- [52] M.D. Porter, T.B. Bright, D.L. Allara, C.E. Chidsey, Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry, *Journal of the American Chemical Society*, 109 (1987) 3559-3568.
- [53] S. Sek, R. Bilewicz, Kinetics of long-range electron transfer through alkanethiolate monolayers containing amide bonds, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 509 (2001) 11-18.
- [54] K. Bandyopadhyay, V. Patil, M. Sastry, K. Vijayamohan, Effect of geometric constraints on the self-assembled monolayer formation of aromatic disulfides on polycrystalline gold, *Langmuir*, 14 (1998) 3808-3814.
- [55] V. Molinero, E.J. Calvo, Electrostatic interactions at self assembled molecular films of charged thiols on gold, *Journal of electroanalytical chemistry*, 445 (1998) 17-25.
- [56] J. Zhao, L. Luo, X. Yang, E. Wang, S. Dong, Determination of surface pKa of SAM using an electrochemical titration method, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 11 (1999) 1108-1113.
- [57] N.K. Chaki, K. Vijayamohan, Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications, *Biosensors and Bioelectronics*, 17 (2002) 1-12.
- [58] M. Eguílaz, R. Villalonga, J. Pingarrón, N.F. Ferreyra, G.A. Rivas, Functionalization of bamboo-like carbon nanotubes with 3-mercaptophenylboronic acid-modified gold nanoparticles for the development of a hybrid glucose enzyme electrochemical biosensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 216 (2015) 629-637.
- [59] S. Bourigua, M. Hnaïen, F. Bessueille, F. Lagarde, S. Dzyadevych, A. Maaref, J. Bausells, A. Errachid, N.J. Renault, Impedimetric immunosensor based on SWCNT-COOH modified gold microelectrodes for label-free detection of deep venous thrombosis biomarker, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 1278-1282.
- [60] A. Baraket, M. Lee, N. Zine, M. Sigaud, N. Yaakoubi, M.G. Trivella, M. Zabala, J. Bausells, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid, Diazonium modified gold microelectrodes onto polyimide substrates for impedimetric cytokine detection with an integrated Ag/AgCl reference electrode, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 189 (2013) 165-172.
- [61] E. Asav, E. Akyilmaz, Preparation and optimization of a bionzymic biosensor based on self-assembled monolayer modified gold electrode for alcohol and glucose detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2010) 1014-1018.
- [62] S.-K. Jung, M.-O. Namgung, S.-Y. Oh, B.-K. Oh, Fabrication of self-assembled oligophenylethylenethiol monolayer for electrochemical glucose biosensor, *Ultramicroscopy*, 109 (2009) 911-915.
- [63] D. Du, J. Ding, J. Cai, J. Zhang, L. Liu, In situ electrodeposited nanoparticles for facilitating electron transfer across self-assembled monolayers in biosensor design, *Talanta*, 74 (2008) 1337-1343.

- [64] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J.M. Saveant, Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts, *Journal of the American Chemical Society*, 114 (1992) 5883-5884.
- [65] P. Allongue, M. Delamar, B. Desbat, O. Fagebaume, R. Hitmi, J. Pinson, J.-M. Saveant, Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts, *Journal of the American Chemical Society*, 119 (1997) 201-207.
- [66] B.P. Corgier, C.A. Marquette, L.J. Blum, Direct electrochemical addressing of immunoglobulins: Immuno-chip on screen-printed microarray, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 1522-1526.
- [67] C. Bourdillon, M. Delamar, C. Demaille, R. Hitmi, J. Moiroux, J. Pinson, Immobilization of glucose oxidase on a carbon surface derivatized by electrochemical reduction of diazonium salts, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 336 (1992) 113-123.
- [68] A. Chrouda, M. Braiek, K.B. Rokbani, A. Bakhrouf, A. Maaref, N. Jaffrezic-Renault, An immunosensor for pathogenic staphylococcus aureus based on antibody modified aminophenyl-Au electrode, *International Scholarly Research Notices*, 2013 (2013).
- [69] 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, *Analytica chimica acta*, 872 (2015) 7-25.
- [70] C. Yang, M.E. Denno, P. Pyakurel, B.J. Venton, Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review, *Analytica chimica acta*, 887 (2015) 17-37.
- [71] F.F. Tao, Z. Ma, Water-gas shift on gold catalysts: catalyst systems and fundamental studies, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15 (2013) 15260-15270.
- [72] 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, *Nanomedicine*, 10 (2015) 321-341.
- [73] H. Daraee, A. Eatemadi, E. Abbasi, S. Fekri Aval, M. Kouhi, A. Akbarzadeh, Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44 (2016) 410-422.
- [74] M.S. Khan, G.D. Vishakante, H. Siddaramaiah, Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications, *Advances in colloid and interface science*, 199 (2013) 44-58.
- [75] J. Zhang, L. Wang, D. Pan, S. Song, F.Y. Boey, H. Zhang, C. Fan, Visual cocaine detection with gold nanoparticles and rationally engineered aptamer structures, *small*, 4 (2008) 1196-1200.
- [76] V.K. Upadhyayula, Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents: a review, *Analytica Chimica Acta*, 715 (2012) 1-18.
- [77] W. Putzbach, N.J. Ronkainen, Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review, *Sensors*, 13 (2013) 4811-4840.
- [78] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, Nanomaterials for biosensing applications: a review, *Frontiers in chemistry*, 2 (2014) 63.
- [79] S. Kruss, A.J. Hilmer, J. Zhang, N.F. Reuel, B. Mu, M.S. Strano, Carbon nanotubes as optical biomedical sensors, *Advanced drug delivery reviews*, 65 (2013) 1933-1950.
- [80] T. Sarkar, Y. Gao, A. Mulchandani, Carbon nanotubes-based label-free affinity sensors for environmental monitoring, *Applied biochemistry and biotechnology*, 170 (2013) 1011-1025.
- [81] M. Holzinger, J. Abraham, P. Whelan, R. Graupner, L. Ley, F. Hennrich, M. Kappes, A. Hirsch, Functionalization of single-walled carbon nanotubes with (R-) oxycarbonyl nitrenes, *Journal of the American Chemical Society*, 125 (2003) 8566-8580.
- [82] Y. Liu, M. Wang, F. Zhao, Z. Xu, S. Dong, The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix, *Biosensors and Bioelectronics*, 21 (2005) 984-988.
- [83] Y. Liu, J. Tang, X. Chen, J. Xin, Decoration of carbon nanotubes with chitosan, *Carbon*, 43 (2005) 3178-3180.
- [84] M. Rinaudo, Chitin and chitosan: properties and applications, *Progress in polymer science*, 31 (2006) 603-632.
- [85] G. Crini, Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application, *Presses Univ. Franche-Comté* 2009.

[86] M. Mochizuki, Y. Kadoya, Y. Wakabayashi, K. Kato, I. Okazaki, M. Yamada, T. Sato, N. Sakairi, N. Nishi, M. Nomizu, Laminin-1 peptide-conjugated chitosan membranes as a novel approach for cell engineering, *The FASEB journal*, 17 (2003) 1-20.

[87] M. Jaworska, K. Sakurai, P. Gaudon, E. Guibal, Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties, *Polymer International*, 52 (2003) 198-205.

Chapitre 02

TECHNIQUES ELECTROCHIMIQUES

2.1. Introduction :

L'électrochimie est une partie très importante de la physico-chimie moderne. Son objet est l'étude des transformations chimiques sous l'influence d'un champ électrique à l'interface liquide-solide.

On peut définir l'électrochimie comme l'étude de transports de charges électriques entre l'électrolyte et le solide à l'interface et les transformations chimiques qui les accompagnent. Son domaine d'étude s'étend de la corrosion, aux dépôts anodiques, à la détermination des états énergétiques de surface en s'intéressant aux flux du courant ou de la capacité en fonction du potentiel de polarisation. Ceci peut être fait en absence ou sous éclairage. L'étude théorique de cette interface fait appel à la thermodynamique et à la physique des solides. Du point de vue industriel, l'électrochimie représente une subdivision importante de génie chimique moderne [1]. Pour affronter les nouveaux défis liés aux problèmes analytiques, il y a un grand besoin d'effectuer plusieurs analyses simultanément et rapidement sur les mêmes échantillons, par une méthode analytique performante avec une haute sensibilité et une haute sélectivité [2]. Les techniques électrochimiques offrent l'avantage d'être rapides, sensibles et faciles à mettre en œuvre.

Ce chapitre présente le principe et la théorie de base d'électrochimie des techniques expérimentales, seules les techniques qui ont été utilisées seront détaillées. En l'occurrence, la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE), la voltampérométrie cyclique (VC)

2.2. Voltampérométrie cyclique :

La voltampérométrie cyclique est basée sur la mesure du courant résultant d'un balayage linéaire aller-retour du potentiel entre les limites E_{inf} et E_{sup} choisies par l'expérimentateur (balayage triangulaire)[3].

La Voltampérométrie cyclique permet d'apprécier le degré de réversibilité du processus électrochimique en appliquant un signal triangulaire à une électrode immobile dans une solution non agitée[4]. L'allure générale de la courbe voltampérométrique (voltampérogramme) ainsi que ces principales grandeurs ont représenté par « **Figure 2.1** ».

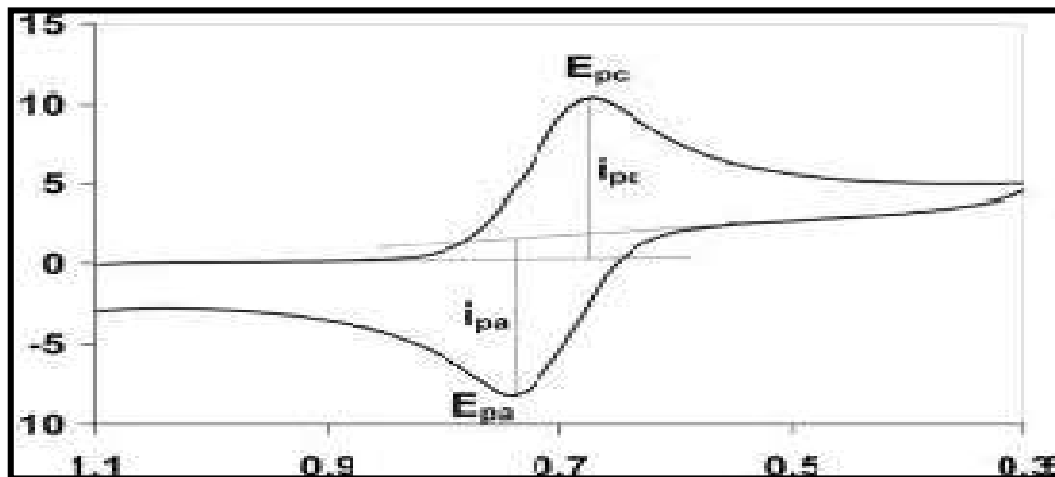


Figure 2-1L l'allure de la courbe voltampérométrique et ces grandeurs caractéristiques.

Les principales grandeurs d'un voltampérogramme cyclique sont :

Ip_a, Ip_c : courant des pics anodique et cathodique.

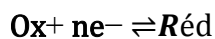
E_{pa}, E_{pc} : potentiel de pic anodique et cathodique.

E_{pa}/2, E_{pc}/2 : les potentiels à mi-hauteur des pics anodiques et cathodiques.

ΔEp : Différence de potentiel entre **E_{pa}** et **E_{pc}**[5].

2.2.1. La loi de Nernst

Elle s'applique pour un couple redox unique (Ox/Red) présent dans l'électrolyte et dont l'équilibre électrochimique entre les deux espèces s'écrit :



A l'équation de Nernst[6] relie le potentiel standard (E°) du couple redox mis en jeu avec le potentiel d'équilibre de l'électrode (E) et les activités des espèces respectives :

$$E_{eq} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{a_{ox}}{a_{red}} \right) \quad (2.1)$$

Avec :

E_{eq} : potentiel d'oxydoréduction du couple ox/réd en volts.

E[°] : potentiel standard du couple ox/réd.

n: nombre de charge de l'espèce .

R : constante des gaz parfaits ($R = 8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$).

T : température (en kelvin « K »).

F : constante de Faraday ($F = 96500 \text{ C.mol}^{-1}$).

a red(ox) : activité du réducteur (oxydant).

Si la force ionique de la solution reste inchangée au cours de l'expérience et que les composés comportent idéalement en solution. L'équation devient :

$$E_{eq} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_{Ox}}{C_{Red}} \right) \quad (2.2)$$

C_{Ox} et C_{Red} les concentrations des espèces Ox et Red en solution.

La relation de Nernst, à 25°C, s'écrit alors :

$$E_{eq} = E^\circ + \frac{0.059}{n} \text{Log} \left(\frac{[Ox]}{[Red]} \right) \quad (2.3)$$

2.2.2. Principe de voltampérométrie cyclique

La voltampérométrie cyclique est une méthode expérimentale qui consiste à mesurer les variations du courant en fonction de la tension appliquée entre l'électrode de travail et l'électrode de référence dans une cellule électrochimique. Cette méthode permet l'étude de la mise en évidence des composés intermédiaires peu stables. Elle est généralement utilisée pour la caractérisation des mécanismes réactionnels dans lesquels la diffusion est le seul mode de transport mis en jeu par la substance électroactive. Le potentiel est mesuré entre l'électrode de référence et l'électrode de travail et le courant est mesuré entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Ces données sont ensuite tracées comme l'intensité (i) fonction du potentiel (E) [7-8].

2.2.3. Composants

Les unités de base d'un analyseur voltamétrique sont:

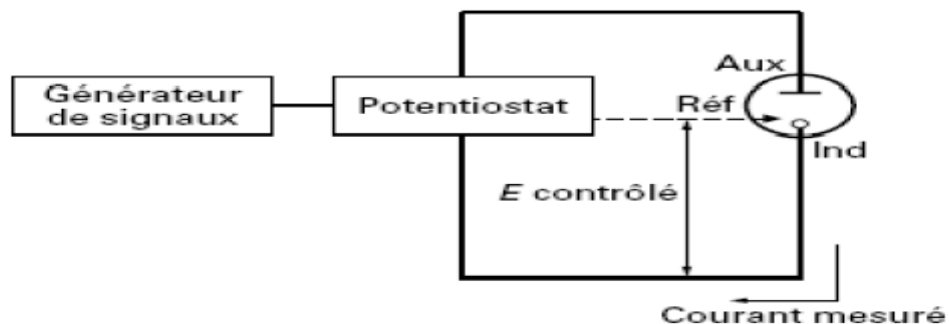


Figure 2-2 :dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé

- Une cellule basée sur un système à trois électrodes immergées dans la solution à analyser.
- Les trois électrodes sont:
- Une électrode de travail (parfois aussi appelée électrode indicatrice).
- Une électrode de référence.
- Une électrode auxiliaire (parfois aussi appelée contre-électrode).
- Un circuit électronique, appelé potentiostat, permettant de modifier le potentiel et d'enregistrer le courant du dispositif expérimental).

2.2.4. Expression mathématique du courant et du potentiel de pic :

2.2.4.1. Dans le cas transfert de charge rapide (réversible) :



Le courant de pic est donné par l'expression suivante

$$I_P = 0.269 A n^{3/2} D_R^{1/2} C_R V^{1/2} \quad (\text{mA}) \quad (2.5)$$

Le potentiel de pic est donné par :

$$E_p = E_p / 2 + 0.029 / n^{1/2} \quad (2.6)$$

La différence des potentiels de pic d'oxydation et de réduction s'exprime par :

$$E_{pa} - E_{pc} = 0.059 / n \quad (\text{V}) \quad \text{à } 25 \text{ } ^\circ\text{C} \quad (2.7)$$

2.2.4.2. Cas d'un transfert de charge semi rapide (quasi réversible).

Le courant de pic est donné par :

$$I_P = 0.269 A n^{3/2} D^{1/2} C_R K_S V^{1/2} \quad (2.8)$$

2.2.4.3. Quand la cinétique de transfert est lente (irréversible).

L'expression de courant devient :

$$I_P = 0.299 A n (\alpha n)^{1/2} D_R^{1/2} C_R V^{1/2} \quad (2.9)$$

D'où:

K_s : Constante de vitesse.

α : Coefficient de transfert apparent de la réaction.

D_R : Coefficient de diffusion de l'espèce électroactive (cm^2/s).

C_R : Concentration de l'espèce régissante au sein de l'électrolyte (mole/cm^3).

v : vitesse de balayage (V/s).

A : surface d'électrode (cm^2).

n : Nombre totale d'électron échangés.

I_p : Intensité de courant du pic (A).

2.2.5. Critères de discrimination entre les différents systèmes et mécanismes, électrochimiques :

L'étude des variations du courant et du potentiel de pic en fonction de la vitesse de balayage [$I_p=f(v^{1/2})$ et $E_p=f(\log(v))$] peut nous informer sur la nature de l'étape limitant dans un processus électrochimique et sur le mécanisme à l'électrode :

Si $I_p=f(v^{1/2})$ est une droite, la réaction est régie uniquement par diffusion.

Si $I_p=f(v^{1/2})$ est une courbe de concavité tournée vers l'axe des courants, le processus à l'électrode comporte un transfert de charge accompagné d'une absorption.

Dans le cas où la concavité est tournée vers l'axe de vitesse de balayage, cela signifie qu'une réaction chimique est associée au transfert de charge.

Si $E_p=f[\text{Log}(v)]$ est une droite :

De pente nulle, la réaction à l'électrode est rapide.

De pente différente de zéro et égale à $30/n\alpha$ (mV), il s'agit d'un transfert de charge lent.

Si $E_p=f[\text{Log}(v)]$ est une courbe et $I_p=f(v^{1/2})$ est une droite, on a affaire à un processus semi-rapide. On note que pour un processus qui est régi par la diffusion, le courant du pic est proportionnel à la concentration analytique de l'espèce électroactive.

2.2.6. Les avantages de la Voltampérométrie cyclique :

Parmi les principaux avantages de cette méthode on peut citer :

- L'étude de la réoxydation des produits formés à l'électrode.
- L'analyse des solutions et la détermination de la concentration des espèces présentes même à faible concentration.
- La possibilité de stopper une réaction en jouant sur l'étendue du potentiel balayé : ce qui permet d'éviter la détérioration des microélectrodes.
- La rapidité des mesures [8].

2.2.7. Application de la voltampérométrie cyclique dans le domaine de capteur chimique

La voltampérométrie cyclique s'applique avantageusement dans le domaine de capteurs chimique car elle permet d'obtenir des informations sur les mécanismes mis en jeu [9], et aussi pour fonctionnaliser la surface d'électrode de travail par électro-greffage (par exemple électrogreffage de sel de diazonium sur la surface d'électrode [10-12]). Cette technique non invasive qui ne requiert pas d'instrumentation complexe permettant des applications courantes en laboratoire. Il est possible d'employer cette technique non seulement pour caractériser le comportement et les propriétés des différentes couches fonctionnalisées sur la surface d'électrode de travail, mais également comme un moyen de transduction pour la détection des molécules cibles comme les métaux lourds [13-15], le brome [16] l'hydrazine [17], les nitrites [18], et ainsi que le phénol [19].

2.3. Laspectroscopied'impédanceélectrochimique (SIE)

2.3.1. Généralités

L'impédance électrochimique est généralement mesurée par application d'un potentiel alternatif à une cellule électrochimique et de mesurer le courant à travers la cellule. On applique une excitation sinusoïdale (potentiel). La réponse à ce potentiel est un signal de courant alternatif qui sera analysé en fonction du temps et des caractéristiques du signal appliqué (fréquence, amplitude,...) [20-22].

Cette technique non destructive adaptée à l'étude des propriétés électriques inter-faciales [23-24], permet de différencier les divers phénomènes susceptibles de se produire dans la cellule électrochimique en fonction de la fréquence : les phénomènes rapides se produisent à hautes fréquences, tandis que les phénomènes lents ont lieu à basses fréquences [25].

Différents processus électrochimiques sont observés à l'interface métal/électrolyte : le transfert de charge qui a lieu entre l'interface et le métal défini comme un phénomène rapide et le transport de

matière qui a lieu entre l'interface et l'électrolyte, défini comme un phénomène plutôt lent. L'interface est également le lieu où se retrouvent les produits de corrosion, des réactions chimiques conduisant à l'adsorption et à la désorption de molécules au niveau de l'interface

2.3.2. Théorie

La résistance électrique, c'est la capacité d'un élément à résister à la circulation du courant électrique. La loi d'Ohm définit en termes de résistance : le rapport entre la tension E , et le courant I .

$$R = \frac{E}{I} \quad (2.10)$$

Bien que cette loi explique le phénomène de la résistance, son utilisation est limitée à un seul élément de circuit (la résistance idéale).

Cependant, en réalité un circuit électrique contient des éléments qui présentent un comportement beaucoup plus complexe (capacité du condensateur, Inductance....). Ces éléments nous obligent à abandonner le concept simple de la résistance, et de le remplacer par l'impédance, un paramètre plus général du circuit électrique. Impédance vient du terme anglais « impede » signifiant faire obstacle.

Comme la résistance, l'impédance est une mesure de l'aptitude d'un circuit de résister à la circulation du courant électrique.

La définition d'impédance est une généralisation de la loi d'Ohm dans l'étude des circuits en courant alternatif.

Selon le vocabulaire et les notations normalisés par la Commission électrotechnique internationale (CEI), l'impédance d'un dipôle linéaire passif de bornes A et B est définie en régime sinusoïdal de courant et de tension par le quotient du nombre complexe image U , représentant la tension entre les bornes, par le nombre complexe image I , représentant le courant électrique à travers le dipôle.

$$Z = \frac{U}{I} \text{ en ohms } (\Omega) \quad (2.11)$$

Avec :

- U en Volte.
- I en ampère.

En toute rigueur, il convient de faire la différence entre impédance et résistance : la résistance est une grandeur réelle, alors que l'impédance fait appel aux nombres complexes, comportant une composante imaginaire.

Un nombre complexe est un ensemble de deux nombres réels **a** et **b** on écrit :

$$Z = a + i b \text{ (ou } Z = a + j b) \quad (2.12)$$

i est la partie imaginaire avec $i^2 = -1$ ou $i = \sqrt{-1}$

Le symbole habituellement utilisé en mathématique pour représenter un imaginaire pur est la lettre i . Les nombres complexes, notés habituellement z , peuvent ainsi être présentés de forme cartésienne d'une manière :

- algébrique : $z = x + iy$
- ou vectorielle : $z = (x, y)$

Le réel a est appelé partie réelle de z et se note $\text{Re}(z)$, le réel b est sa partie imaginaire et se note $\text{Im}(z)$ « Figure 2.3 ».

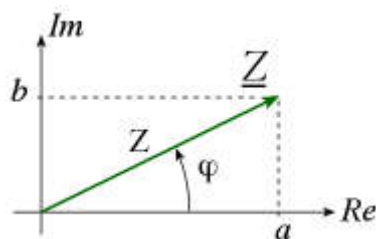


Figure 2-3 : Représentation d'un nombre complexe dans l'espace à deux dimensions

2.3.3. Principes de base

La technique de l'impédance électrochimique utilise un système de trois électrodes plongées dans un électrolyte support placé dans la cellule électrochimique.

Le montage utilisé pour le tracé des courbes de polarisation et des diagrammes d'impédance comprend les trois électrodes suivantes « **Figure 2.4** »:

- Electrode de travail
- Electrode auxiliaire dite aussi (contre électrode)
- Electrode de référence au calomel saturé.

Les trois électrodes sont reliées à un montage constitué de la chaîne de mesure, Potentiostat.

Le Potentiostat permet d'imposer un potentiel entre l'électrode de référence et l'électrode de travail et de mesurer le courant entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire.

Le générateur de réponse en fréquence permet d'obtenir la forme sinusoïdale du signal de perturbation. Le traitement du signal de réponse par l'analyseur en fréquence permet d'obtenir les valeurs réelles et imaginaires de l'impédance électrochimique du système. [26].

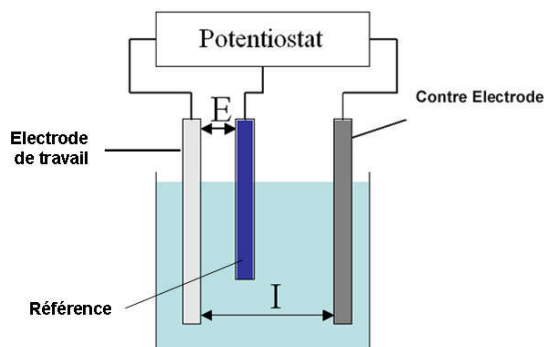


Figure 2-4 :Schéma de principe d'un montage à trois électrodes [26].

2.3.4. Equilibre du système

La mesure d'un spectre SIE prend du temps. Le système mesuré doit être à un état d'équilibre pendant tout le temps de mesure. Une cause fréquente de problèmes dans les mesures et l'analyse par SIE est la dérive dans le système mesuré.

En pratique, un état d'équilibre peut être difficile à atteindre. La cellule peut être modifiée par adsorption des impuretés de la solution, la croissance d'une couche d'oxyde, l'accumulation de produits de réaction dans la solution, la dégradation du revêtement, ou les changements de température, pour ne citer que quelques facteurs.

Les outils d'analyse de la SIE peuvent donner des résultats très imprécis sur un système qui n'est pas à l'état stationnaire.

Les systèmes électrochimiques étudiés n'étant généralement ni linéaires, ni stables dans le temps, un certain nombre de précautions s'impose. Il faut s'assurer que le système reste « quasi stable » sur toute la durée de la mesure, et que l'amplitude de la sinusoïde soit suffisamment faible pour que la fonction $I = f(E)$ soit linéaire dans le domaine perturbé « **Figure2.5** ».

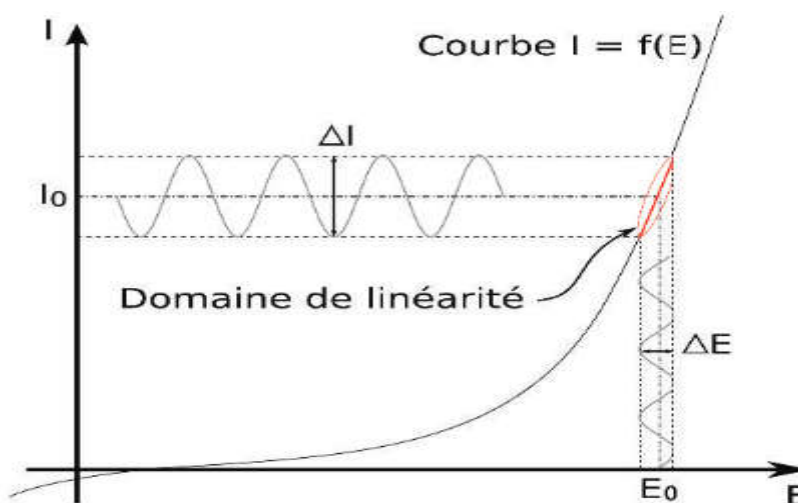


Figure 2-5.Schéma d'un système électrochimique non linéaire soumis à une perturbation

Le signal d'excitation, exprimée en fonction du temps, est de la forme

$$E_t = E_0 \sin(\omega t) \quad (2.13)$$

où E_t est le potentiel au temps t , E_0 est l'amplitude du signal, et ω est la fréquence radiale. La relation entre la fréquence ω radiale (exprimé en radians / seconde) et la fréquence f (exprimée en hertz) est:

$$\omega = 2\pi f \quad (2.14)$$

Dans un système linéaire, le signal de réponse, I_t , est décalé en phase (ϕ) et possède une amplitude différente de celle de I_0 .

$$I_t = I_0 \sin(\omega t + \phi) \quad (2.15)$$

Une expression analogue à la loi d'Ohm permet de calculer l'impédance du système en tant que:

$$Z = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)} \quad (2.16)$$

Il est possible d'exprimer l'impédance en fonction complexe. Le potentiel est décrit comme :

$$E_t = E_0 \exp(j\omega t) \quad (2.17)$$

Et la réponse de courant :

$$I_t = I_0 \exp(j\omega t - \phi) \quad (2.18)$$

L'impédance est alors représentée par un nombre complexe,

$$Z_{(\omega)} = \frac{E}{I} = Z_0 \exp(j\phi) = Z_0 (\cos \phi + j \sin \phi) \quad (2.19)$$

2.3.5. Impédance de différents phénomènes pouvant se produire à l'interface électrode/électrolyte :

Lors de la mise en contact d'une électrode et d'un électrolyte, différents phénomènes physiques et physico-chimiques s'amorcent, chacun suivant sa propre cinétique, et conduisent le système vers un équilibre thermodynamique.

Ces phénomènes vont dépendre en partie du potentiel de surface de l'électrode et de celui présent au sein de la solution.

Ceci a pour conséquence de créer une variation de potentiel et de courant dans l'électrolyte, qui conduit au concept de chute ohmique. La chute ohmique est classiquement décrite comme étant une résistance d'électrolyte R_e [27]. L'impédance de la chute ohmique est

$$Z_{R_e}(\omega) = R_e \quad (2.20)$$

2.3.5.1. Impédance de la double couche

Un autre phénomène observé à l'interface électrode/électrolyte est la formation d'une double couche d'ions [28]. L'application d'une perturbation sinusoïdale lors de la mesure d'impédance entraîne la charge et la décharge de cette couche qui se comporte alors comme un condensateur

électrique. La réponse de cette double couche génère d'un courant I_{dc} qui dépend de la fréquence de perturbation. 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 :

$$Z_C(\omega) = \frac{1}{j\omega C} \quad \text{Avec, } C = \epsilon\epsilon_0 \frac{A}{e} \quad (2.21)$$

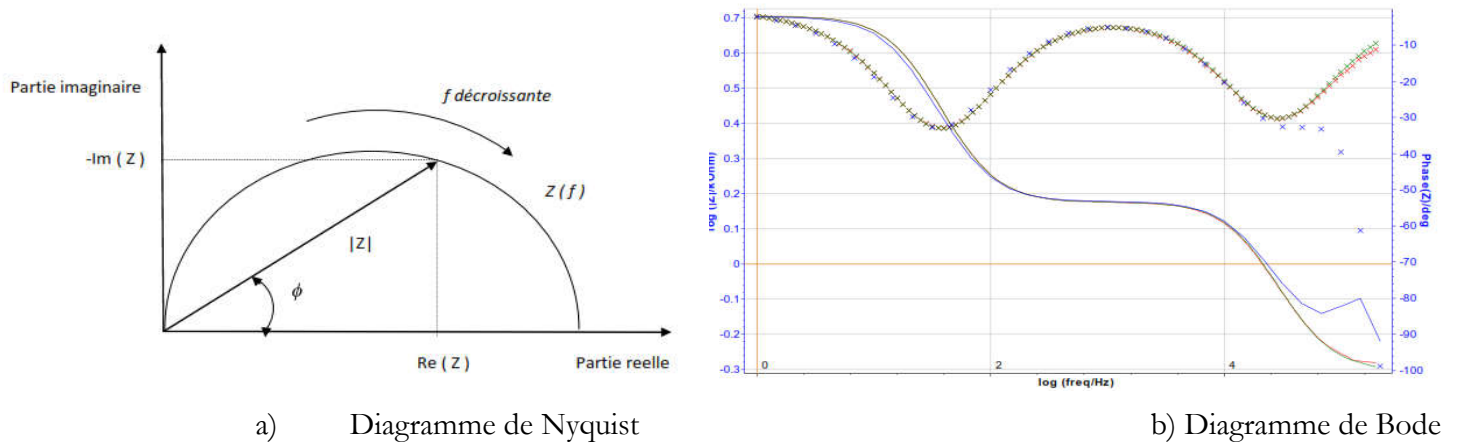
Où C est la capacité, ϵ la permittivité relative du diélectrique, ϵ_0 la permittivité diélectrique du vide, A l'aire de réaction et e l'épaisseur du diélectrique.

2.3.5.2. Résistance de transfert de charge R_{tc}

L'impédance électrochimique traduit la contribution électrochimique du système à la réponse électrique observée [29], elle comprend toujours une résistance au transfert d'ions et d'électrons impliquée dans la dissolution, appelée résistance de transfert de charge R_{tc} ,

2.3.5.3. Représentation traditionnelle des données

Habituellement, il existe deux modes de représentation des diagrammes d'impédance électrochimique. Ils peuvent être tracés en coordonnées cartésiennes dans le plan complexe de Nyquist en plaçant les valeurs $Z(\omega)$ en abscisse et $-Z(\omega)$ en ordonnée. La représentation de Bode est l'autre représentation classique pour visualiser les diagrammes. Dans ce cas, le module de l'impédance $|Z|$ (représenté en échelle logarithmique) et le déphasage ϕ_j sont tracés en fonction de la fréquence, elle aussi représentée en échelle logarithmique. Ces deux visions différentes d'un même résultat ne sont pas en compétition, elles sont complémentaires ; chacune d'entre-elles montre un aspect particulier du diagramme d'impédance. 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 2.6** ».



a) Diagramme de Nyquist

b) Diagramme de Bode

Figure 2-6(a,b). Représentation graphique des diagrammes de Nyquist et de Bode

Dans la construction de ces circuits électriques équivalents, certains composants utilisés sont identiques à de véritables composants électriques, comme la résistance R , la capacité C ou même l'inductance L dont l'impédance est donnée par la relation suivante :

2.3.5.4. Schémas électriques équivalents

L'impédance d'un système électrochimique, quel qu'il soit, peut être assimilée, par analogie, à une impédance électrique. Chaque phénomène physico-chimique se déroulant à l'interface électrode de travail/électrolyte peut être modélisé par un composant électrique (résistance, condensateur, bobine, etc...) placé en série ou en parallèle avec d'autres composants, constituant un circuit électrique équivalent. Ces circuits permettent d'ajuster les spectres d'impédance expérimentaux et d'extraire les paramètres (résistance R , capacité C , inductance L) associés aux phénomènes physico-chimiques observés [30-32].

$$Z_L = jL\omega \quad (2.22)$$

Qui peut servir dans le cadre d'impédance mesurée sur des systèmes complexes (batteries par exemple) [33].

D'autres composants sont spécifiques aux processus électrochimiques comme l'impédance de Warburg, qui caractérise les phénomènes de transport de masse (diffusion), qui apparaît lorsque le porteur de charge diffuse à travers un matériau.

La diffusion des espèces dans une solution d'électrolyte est un phénomène lent, donc mesurable à basse fréquence. Pour une perturbation sinusoïdale du potentiel, le phénomène de diffusion se traduit par l'intervention d'une résistance au transfert de masse et dont l'expression en fonction de la fréquence angulaire est :

$$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} - j \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} \text{ Ou } Z_W = \frac{\sqrt{2\sigma}}{\sqrt{j2\pi f}} \quad (2.23)$$

où σ désigne le coefficient de Warburg. L'impédance de Warburg est représentée dans le plan complexe, par une droite à 45° des axes « **Figure 2.7.** » [34].

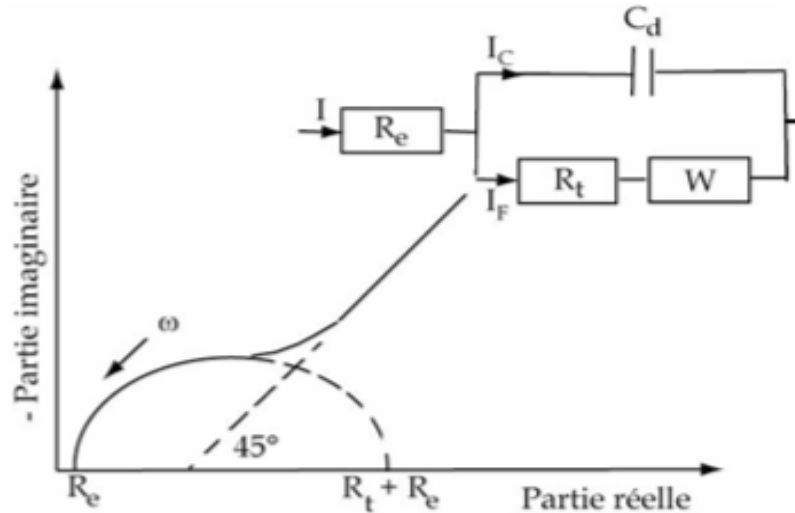


Figure 2-7. Impédance du circuit équivalent de Randles: cas d'une couche de diffusion

2.3.6. Les avantages et les inconvénients de la méthode :

Parmi les avantages de cette méthode d'analyse on peut citer:

La possibilité d'effectuer des mesures expérimentales de grande précision car la réponse peut être stable et être moyenne sur une longue période du temps.

Au moyen de cette méthode, on peut aussi identifier aisément à partir de la réponse du système, les contributions liées à l'électrolyte et celle liées à l'électrode.

Ces avantages ouvrent un champ d'application vaste tel que:

a) La mesure de la conductivité des électrolytes, dans les liquides ou dans des matériaux solides (polymères organiques conducteurs conjugués).

b) L'étude de la cinétique des réactions électrochimiques aux électrodes, (application à la corrosion, accumulateurs....) où les mécanismes réactionnels sont composés d'une séquence d'étapes, chimiques et électrochimiques et chacune est caractérisée par ses propres paramètres électriques [35].

L'inconvénient majeur de l'impédance électrochimique réside dans l'interprétation des résultats, parce qu'il est parfois difficile de trouver le circuit électrique équivalent qui correspond le mieux à l'interface électrode/solution [35].

2.3.7. Application de la spectroscopie d'impédance électrochimique

La spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) est la catégorie de la spectroscopie d'impédance qui a été largement utilisée dans de nombreux domaines de l'électrochimie, par exemple, pour étudier la cinétique des réactions aux électrodes, la double couche, les batteries, la corrosion, l'électrochimie à l'état solide. La SIE s'est montrée comme une technique intéressante pour la caractérisation, l'analyse et l'étude des piles à combustible [36], l'électrodéposition [37], les batteries [38, 39], et les phénomènes de corrosion [40]. Elle a été largement utilisée comme un outil pour étudier la cinétique d'électrode, les polymères conducteurs, les semi-conducteurs, les tissus d'origine animale et végétale, et le matériel en général [41]. Grâce à sa grande sensibilité pour sonder les propriétés interfaciales d'une surface d'électrode et sa capacité pour la caractérisation des interfaces électrode/électrolyte, la SIE a été largement appliquée aux biocapteurs aux cours des dernières années [42- 47].

En plus, de surveiller l'effet du processus de reconnaissance, la spectroscopie d'impédance électrochimique est une méthode utile pour rechercher l'état de la surface de l'électrode après modification [48-50]. Il s'agit d'un pas important dans le développement de différents types de capteurs électrochimiques basés sur des couches polymériques sur des surfaces de matériaux conducteurs [51-57]

2.4. Conclusion :

Les techniques électrochimiques permettent d'avoir accès aux transports de charges et de particules entre une électrode et une solution. Elles peuvent être utilisées aussi bien pour rechercher des données thermodynamiques sur une réaction, que pour la conception d'un nouveau générateur d'énergie électrique. Elles peuvent être divisées en méthodes à :

Charge statique : le passage de courant entre les électrodes sans chargement de la concentration des espèces dans la cellule électrochimique

Charge dynamique : le passage du courant entre les électrodes entraîné des réactions redox d'en découlent des changements de concentration d'espèces en solution.

Ces méthodes utilisent ce que l'on appelle un potentiostat.

Références.

- [1] M. Pourbaix, Atlas d'Equilibres Electrochimiques, Gauthier-Villars and C, Editeur, Paris, (1963) 286.
- [2] T. ATTAR, Dosage des éléments traces dans le sang humain par voltampérométrie à redissolution anodique et/ou cathodique, 2014.
- [3] T. Breton, Electrosynthèse organique: fonctionnalisation allylique et aromatisation électro-assistées d'oléfines par les radicaux aminoxyles, Poitiers, 2004.
- [4] M. BOUAOUD, Tenue à la corrosion en milieu acide d'un dépôt de Zn Sn sur acier inoxydable, 2015.
- [5] B. BOUZIDI, DEPOT PAR ELECTRODEPOSITION ET CARACTERISATION DE MATERIAUX DESTINES A LA FABRICATION DE CELLULES PHOTOVOLTAÏQUES A BASE DE COUCHES MINCES, 2018.
- [6] Y. Chatillon, Méthodes électrochimiques pour la caractérisation des piles à combustibles de type PEM en empilement, Université de Lorraine, 2013.
- [7] Y. MOULAY, Investigation Phytochimique de l'Acacia arabica Aux propriétés antioxydantes et inhibitrices, Université de Ouargla-Kasdi Merbah, 2012.
- [8] N. Mouats, Etude électrochimique des dérivés de l'acide 2-nitrophenyl sulfonyl acétique, Mémoire magistère. Université du, 20 (1955).
- [9] G. Cauquis, D. Serve, Quelques observations relatives aux voltammétries sur électrode de carbone vitreux dans les milieux aprotiques, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 34 (1972) A1-A6.
- [10] R. Bourgeois, A. Delay, R. Hazard, A. Tallec, Contribution de la voltammétrie à l'étude du comportement électrochimique sur électrode de mercure, de certains ortho-et para-nitrophenylazobenzènes, Electrochimica Acta, 22 (1977) 857-865.
- [11] N. Zehani, P. Fortgang, M.S. Lachgar, A. Baraket, M. Arab, S.V. Dzyadevych, R. Kherrat, N. Jaffrezic-Renault, Corrigendum to "Highly sensitive electrochemical biosensor for bisphenol A detection based on a diazonium-functionalized boron-doped diamond electrode modified with a multi-walled carbon nanotube-tyrosinase hybrid film" [Biosens. Bioelectron. 74 (2015) 830–835], Biosensors and Bioelectronics, 77 (2016) 1222.
- [12] A.A. İsbir-Turan, Z. Üstündağ, E. Kılıç, R. Güzel, Ö. Uçkan, A.O. Solak, 2-Benzo [c] cinnoline and 2-benzo [c] cinnoline 6-oxide modified glassy carbon electrodes: electrocatalytic reduction of dioxygen in aqueous media, Instrumentation Science and Technology, 39 (2011) 149-160.
- [13] N. Ruecha, N. Rodthongkum, D.M. Cate, J. Volckens, O. Chailapakul, C.S. Henry, Sensitive electrochemical sensor using a graphene-polyaniline nanocomposite for simultaneous detection of Zn (II), Cd (II), and Pb (II), Analytica chimica acta, 874 (2015) 40-48.
- [14] M. Yüce, H. Nazır, G. Dönmez, Using of Rhizopus arrhizus as a sensor modifying component for determination of Pb (II) in aqueous media by voltammetry, Bioresource technology, 101 (2010) 7551-7555.
- [15] W. Zhang, J. Yin, F. Min, L. Jia, D. Zhang, Q. Zhang, J. Xie, Cyclic voltammetry analysis of copper electrode performance in Na₂WO₄ solution and optical property of electrochemical synthesized CuWO₄ nanoparticles, Journal of Alloys and Compounds, 690 (2017) 221-227.
- [16] B. Bennett, J. Chang, A.J. Bard, Mechanism of the Br⁻/Br₂ redox reaction on platinum and glassy carbon electrodes in nitrobenzene by cyclic voltammetry, Electrochimica Acta, 219 (2016) 1-9.
- [17] H. Heydari, M.B. Gholivand, A. Abdolmaleki, Cyclic voltammetry deposition of copper nanostructure on MWCNTs modified pencil graphite electrode: an ultra-sensitive hydrazine sensor, Materials science and engineering: C, 66 (2016) 16-24.
- [18] A. Terbouche, S. Lameche, C. Ait-Ramdane-Terbouche, D. Guerniche, D. Lerari, K. Bachari, D. Hauchard, A new electrochemical sensor based on carbon paste electrode/Ru (III) complex for determination of nitrite: Electrochemical impedance and cyclic voltammetry measurements, Measurement, 92 (2016) 524-533.
- [19] B. Idbelkas, D. Takky, Traitement électrochimique d'eaux usées chargées de phénol: étude comparative sur des électrodes de dioxyde de plomb et de platine, Annales de Chimie Science des Matériaux, Elsevier, 2001, pp. 33-44.
- [20] S. Gastaud, Influence de l'état du revêtement hydrocarboné sur le risque de corrosion des canalisations enterrées de transport de gaz, Lyon, INSA, 2002.

- [21] C. Mendibide, Caractérisation de revêtements PVD nanostructurés à base de nitrure de métaux de transition pour application mécanique, Ecole doctorale matériaux de Lyon, (2003).
- [22] M. Bounoughaz, Contribution à l'étude de l'influence de l'argent et du sélénium sur la passivation des anodes de cuivre durant l'électroraffinage, (1993).
- [23] P.M. Monk, R.J. Mortimer, D.R. Rosseinsky, *Electrochromism: fundamentals and applications*, John Wiley & Sons 2008.
- [24] J.B. Allen, R.F. Larry, *Electrochemical methods fundamentals and applications*, John Wiley & Sons 2001.
- [25] C. Ribaut, Elaboration d'un biocapteur cellulaire impédancemétrique pour la mesure des changements physiologiques affectant la cellule parasitée, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2008.
- [26] B. NAIMA, Evaluation des performances des peintures par des techniques électrochimiques, Thèse de magister. Université de Boumerdes, 2008.
- [27] J. Newman, Frequency dispersion in capacity measurements at a disk electrode, *Journal of the Electrochemical Society*, 117 (1970) 198.
- [28] S. Amokrane, J. Badiali, *Modern aspects of electrochemistry*, chapitre Analysis of the capacitance of the metal-solution interface, Numéro, 22 (1992) 1-91.
- [29] D. Loveday, P. Peterson, B. Rodgers, Evaluation of organic coatings with electrochemical impedance spectroscopy, *JCT coatings tech*, 8 (2004) 46-52.
- [30] D. Landolt, *Corrosion et chimie de surfaces des métaux*, PPUR presses polytechniques 2003.
- [31] J.-P. Diard, B. Le Gorrec, C. Montella, *Cinétique électrochimique*, Hermann, Éditeurs des Sciences et des Arts 1996.
- [32] E.L. Din-Stirbu, Comportement à la corrosion des alliages d'aluminium utilisés dans l'industrie automobile pour la fabrication de radiateur de chauffage, Lyon, INSA, 2005.
- [33] O. Alao, P. Barendse, Characterization of Lithium NCM and Sealed Lead Acid Batteries using Electrochemical Impedance Spectroscopy, 2018 IEEE PES/IAS PowerAfrica, IEEE, 2018, pp. 166-171.
- [34] S. Larfaillou, Application de la spectroscopie d'impédance électrochimique à la caractérisation et au diagnostic de microbatteries tout solide, Paris 11, 2015.
- [35] M. Bounoughaz, Contribution à l'étude de l'influence de l'argent et du sélénium sur la passivation des anodes de cuivre durant l'électroraffinage (French text), (1994).
- [36] D. Malko, T. Lopes, E.A. Ticianelli, A. Kucernak, A catalyst layer optimisation approach using electrochemical impedance spectroscopy for PEM fuel cells operated with pyrolysed transition metal-NC catalysts, *Journal of Power Sources*, 323 (2016) 189-200.
- [37] S. Ramalingam, K. Balakrishnan, S. Shanmugasamy, A. Subramania, Electrodeposition and characterisation of Cu-MWCNTs nanocomposite coatings, *Surface Engineering*, 33 (2017) 369-374.
- [38] A. Ganesan, A. Varzi, S. Passerini, M.M. Shaijumon, Graphene derived carbon confined sulfur cathodes for lithium-sulfur batteries: electrochemical impedance studies, *Electrochimica Acta*, 214 (2016) 129-138.
- [39] I.J. Gordon, S. Grugeon, H. Takenouti, B. Tribollet, M. Armand, C. Davoisne, A. Débart, S. Laruelle, Electrochemical Impedance Spectroscopy response study of a commercial graphite-based negative electrode for Li-ion batteries as function of the cell state of charge and ageing, *Electrochimica Acta*, 223 (2017) 63-73.
- [40] S.B. Aoun, M. Bouklah, K. Khaled, B. Hammouti, Electrochemical impedance spectroscopy investigations of steel corrosion in acid media in the presence of thiophene derivatives, *Int. J. Electrochem. Sci*, 11 (2016) 7343-7358.
- [41] L.A.T. Kogel, E. Boschmann, J. Baur, LUBRICANT INDUCED METAL CORROSION-AN ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY APPROACH, *goriva i maziva*, 55 (2016) 131.
- [42] M.V. Riquelme, H. Zhao, V. Srinivasaraghavan, A. Pruden, P. Vikesland, M. Agah, Optimizing blocking of nonspecific bacterial attachment to impedimetric biosensors, *Sensing and bio-sensing research*, 8 (2016) 47-54.
- [43] M.S. Wiederoder, I. Misri, D.L. DeVoe, Impedimetric immunosensing in a porous volumetric microfluidic detector, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 234 (2016) 493-497.
- [44] E.B. Bahadır, M.K. Sezgentürk, A review on impedimetric biosensors, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44 (2016) 248-262.

- [45] Z.-H. Yang, Y. Zhuo, R. Yuan, Y.-Q. Chai, Amplified impedimetric aptasensor combining target-induced DNA hydrogel formation with pH-stimulated signal amplification for the heparanase assay, *Nanoscale*, 9 (2017) 2556-2562.
- [46] S.-A. Jin, S. Poudyal, E.E. Marinero, R.J. Kuhn, L.A. Stanciu, Impedimetric dengue biosensor based on functionalized graphene oxide wrapped silica particles, *Electrochimica Acta*, 194 (2016) 422-430.
- [47] A. Hushegyi, D. Pihíková, T. Bertok, V. Adam, R. Kizek, J. Tkac, Ultrasensitive detection of influenza viruses with a glycan-based impedimetric biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 79 (2016) 644-649.
- [48] F. Husairi, J. Rouhi, K. Eswar, C.R. Ooi, M. Rusop, S. Abdullah, Ethanol solution sensor based on ZnO/PSi nanostructures synthesized by catalytic immersion method at different molar ratio concentrations: An electrochemical impedance analysis, *Sensors and Actuators A: Physical*, 236 (2015) 11-18.
- [49] A. Sharma, J.K. Bhattarai, S.S. Nigudkar, S.G. Pistorio, A.V. Demchenko, K.J. Stine, Electrochemical impedance spectroscopy study of carbohydrate-terminated alkanethiol monolayers on nanoporous gold: Implications for pore wetting, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 782 (2016) 174-181.
- [50] J.K. Bhattarai, Y.H. Tan, B. Pandey, K. Fujikawa, A.V. Demchenko, K.J. Stine, Electrochemical impedance spectroscopy study of Concanavalin A binding to self-assembled monolayers of mannosides on gold wire electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 780 (2016) 311-320.
- [51] H. Bagheri, N. Pajooheshpour, A. Afkhami, H. Khoshsafar, Fabrication of a novel electrochemical sensing platform based on a core-shell nano-structured/molecularly imprinted polymer for sensitive and selective determination of ephedrine, *Rsc Advances*, 6 (2016) 51135-51145.
- [52] L. Mendecki, N. Callan, M. Ahern, B. Schazmann, A. Radu, Influence of Ionic Liquids on the Selectivity of Ion Exchange-Based Polymer Membrane Sensing Layers, *Sensors*, 16 (2016) 1106.
- [53] G. Evtugyn, T. Hianik, Electrochemical DNA sensors and aptasensors based on electropolymerized materials and polyelectrolyte complexes, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 79 (2016) 168-178.
- [54] B. Rezaei, M.K. Boroujeni, A.A. Ensafi, Development of Sudan II sensor based on modified treated pencil graphite electrode with DNA, o-phenylenediamine, and gold nanoparticle bioimprinted polymer, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 222 (2016) 849-856.
- [55] Y. Li, H. Song, L. Zhang, P. Zuo, B.-c. Ye, J. Yao, W. Chen, Supportless electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer modified nanoporous microrod for determination of dopamine at trace level, *Biosensors and Bioelectronics*, 78 (2016) 308-314.
- [56] J. Bai, X. Zhang, Y. Peng, X. Hong, Y. Liu, S. Jiang, B. Ning, Z. Gao, Ultrasensitive sensing of diethylstilbestrol based on AuNPs/MWCNTs-CS composites coupling with sol-gel molecularly imprinted polymer as a recognition element of an electrochemical sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238 (2017) 420-426.
- [57] Y. Hu, B. Liang, L. Fang, G. Ma, G. Yang, Q. Zhu, S. Chen, X. Ye, Antifouling zwitterionic coating via electrochemically mediated atom transfer radical polymerization on enzyme-based glucose sensors for long-time stability in 37 C serum, *Langmuir*, 32 (2016) 11763-11770.

Chapitre 03

DEVELOPPEMENT D'UN APTACAPTEUR ELECTROCHIMIQUE BASE SUR L'ELECTRODEPOSITION DE DIAZONIUM: APPLICATION A LA DETECTION DU CADMIUM DANS L'EAU

3.1. Introduction

Dans ce chapitre, un nouveau aptacapteur électrochimique a été élaboré sur la base d'un aptamère amino-modifié et qui a été immobilisé sur une électrode en Or sérigraphiée explorant le mécanisme de réaction de couplage des sels de Diazonium pour la détermination de Cd^{2+} . Pour cette étape, l'aptamère Cd^{2+} a été immobilisé sur des électrodes en Or à travers des molécules de 4-carboxyméthyl aryl diazonium (CMA) qui sont réduites électrochimiquement sur la surface de l'électrode. Contrairement aux méthodes de greffage conventionnelles, le dépôt électrochimique à base de sel de Diazonium implique des réactifs simples sans étapes d'isolement et de purification [1-4]. Les électrodes de travail en Or (ET) ont été caractérisées par Voltamétrie Cyclique (VC) et Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) avant et après les modifications chimiques de surface de (ET). La technique SIE a ensuite été utilisée pour surveiller l'étendue de la liaison entre le Cadmium et son aptamère de capture spécifique.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Réactifs

Nitrate de cadmium (II) [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$], acide 4-aminophénylacétique (4-Carboxy méthyl aniline CMA), Nitrite de Sodium (NaNO_2), alcool isopropylique (IPA) 96%, N-hydroxy succinimide (NHS) et N-(3 le chlorhydrate de -Diméthyl amino propyl) -N'-éthyl-carbodiimide (EDC) ont été obtenus de Sigma-Aldrich, France.

Les solutions tampons de phosphate PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et de chlorure de Potassium KCl contenant du ferricyanure $\text{K}_3 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$ et du ferrocyanure $\text{K}_4 [\text{Fe} (\text{CN})_6]$ ont été utilisés comme électrolytes. L'aptamère de Cadmium a été synthétisé et acheté par Microsynth (Suisse). La séquence spécifique de l'aptamère était la suivante: (5' amino-modifié): 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' [5].

3.2.2. Mesures électrochimiques

Les mesures électrochimiques ont été réalisées avec un Potentiostat (Biologic EC-Lab SP-300, France) connecté à un ordinateur pour le pilotage des appareils et l'acquisition et le traitement des données. Toutes les mesures électrochimiques ont été effectuées dans le PBS à pH 7,4 à température ambiante dans une cellule en verre électrochimique « **Figure 3.1** » contenant électrode de travail en or (ET), électrode de référence en argent / chlorure d'argent (ER) et contre électrode en platine (CE) intégrés ont été achetées de BVT (type AC1.W1.R2, BVT Technologies, Brno, Czech Republic) « **Figure 3.2** » [6].

Les mesures de la Voltamétrie Cyclique (VC) ont été menées avant et après les modifications chimiques de la surface de l'Or dans 5 mM de solution $[\text{Fe} (\text{CN})_6]^{3- / 4-}$ avec un potentiel de -0,2 V à + 0,6 V avec une vitesse de balayage de $80 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

La Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) a été utilisée pour étudier les propriétés de barrière de l'électrode modifiée [7, 8]. Les mesures SIE ont été effectuées à un potentiel de 128 mV sur les ET sur une gamme de fréquences entre 100 mHz et 200 kHz. Les données d'SIE ont été ajustées en utilisant un modèle de circuit équivalent de Randles. La modélisation des données SIE obtenues a été réalisée par le logiciel EC-Lab en utilisant la méthode Randomize + Simplex. Ici, la randomisation a été arrêtée sur 100 000 itérations et l'ajustement s'est arrêté sur 5 000 itérations.

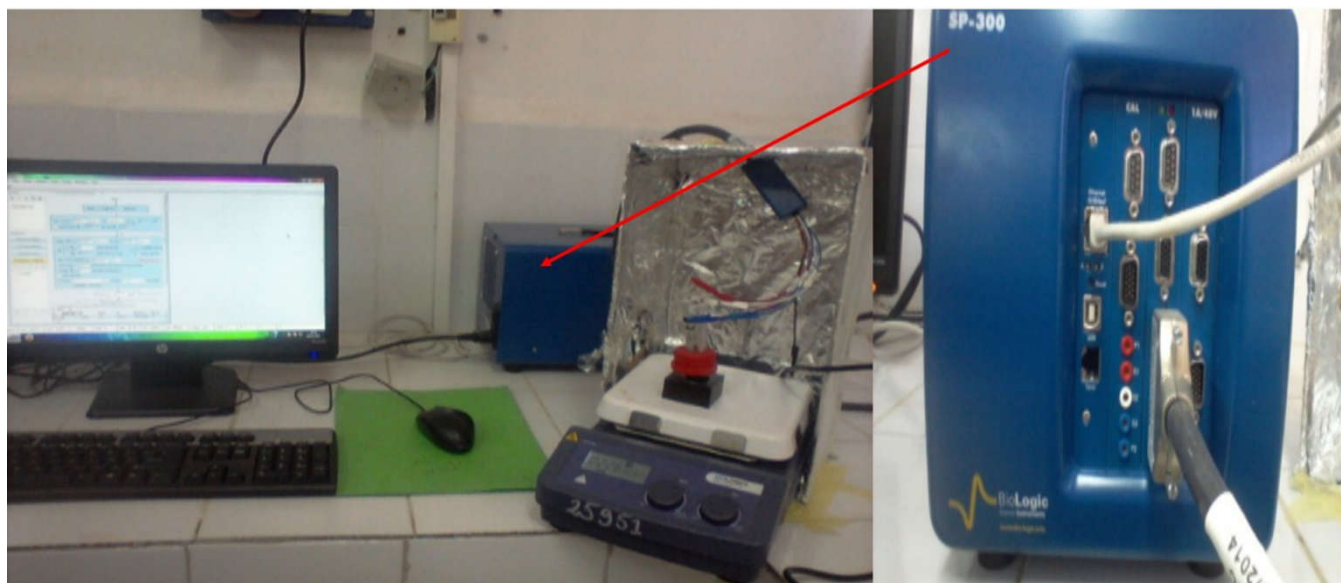


Figure 3-1 :Montage expérimental utilisé pour les mesures électrochimiques

3.2.3. Préparation du biocapteur

Fonctionnalisation de la surface de biocapteur a été réalisée par la réduction électrochimique du sel de diazonium. Pour se faire, le diazonium a été préparée dans un bécher par l'addition de 20 μ L NaNO₂ (1M) et de HCl (1M) dans une solution contenant 4ml CMA 4mM à 4°C.

Ensuite le mélange a été mis pendant 1 min dans un réfrigérateur avant la réduction électrochimique, en utilisant la voltammétrie cyclique avec une gamme de potentiel 0.3 à -1V. Après le dépôt électrochimique, électrode d'or a été rincée avec de l'eau distillé et immergée pendant 60 min dans une solution éthanol contenant 0.4 M EDC NHS 0.2M ; pour activer les groupes acides carboxyliques. Électrode d'or prétraitée a été rincée avec du PBS et séchée sous flux d'azote.l'électrode a été transférée dans la solution d'aptamère spécifique au Cadmium (0.75 μ mol) pendant une nuit. Ensuite, laver avec le PBS à pH 4.5. L'aptamère a été précédemment activé à 90°C pendant 10mn et ensuite à température ambiante pendant 30mn.

3.2.4. Analyse d'échantillons réels

Afin de valider et d'évaluer la précision et l'applicabilité de notre aptacapteur, des analyses ont été effectuées sur des échantillons réels d'une eau de rivière polluée par des déchets de travaux publics et contenant du Nitrate et du Cadmium [9, 10]. Cette rivière est traversée par une source d'eau volcanique de la vallée du Hammam Essalihine (Khenchela, Algérie) qui est riche en minéraux, tels que les Bicarbonates, les Sulfates, le Calcium et le Magnésium. Des prélèvements ont été effectués à partir de la rivière contenant du Cadmium et d'autres interférents potentiels.

Ces échantillons réels ont été testés par la technique SIE combinée avec la méthode des ajouts dosés. Cette méthode consiste à ajouter des quantités connues d'une solution étalon à un échantillon d'intérêt avec des concentrations inconnues. Ensuite, les signaux analytiques des solutions standards sont enregistrés en réponse à chaque ajout [11]. En bref, un volume constant (2,5 ml) d'échantillon réel d'eau a été ajouté à chaque flacon de 25 ml. Ensuite, dans le premier flacon, 22,5 ml de PBS ont été ajoutés aux 2,5 ml d'échantillons réels afin d'atteindre un volume final de 25 ml et ce ballon a été appelé niveau 1. La solution standard contenant l'analyte a ensuite été rajoutée dans des volumes croissants : 0,25, 2,5 et 5 mL, impliquant l'ajout de 10, 100 et 200 nM de Cd^{2+} aux flacons suivants 2, 3 et 4. Enfin ces flacons ont été réalisés au volume de 25 mL avec du PBS et correspondent au niveau 2, Niveau 3 et niveau 4 respectivement.

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Préparation électrochimique de l'aptacapteur

La « **Figure 3.2** » illustre le principe de la détection du Cd^{2+} en utilisant l'aptacapteur électrochimique. L'immobilisation de l'aptamère Cd^{2+} a été réalisée par la liaison covalente entre les groupements amines de l'aptamère et les groupements carboxyliques réactifs abondants sur la surface de l'or. La surface de l'électrode a d'abord été modifiée par un dépôt d'un film de sel de Diazonium et activation des groupements carboxyliques terminaux avec EDC/NHS. Ensuite, l'aptamère était lié à la surface de l'or via ses groupements carboxyliques activés. En présence de Cd^{2+} , une variation de la conformation de l'aptamère se produit d'une structure de bobine aléatoire à un complexe aptamère – Cd^{2+} [12, 13]. Cette interaction aptamère-cible entrave le transfert d'électrons, augmentant ainsi la résistance de la surface qui est proportionnelle à la concentration de Cadmium dans l'échantillon.

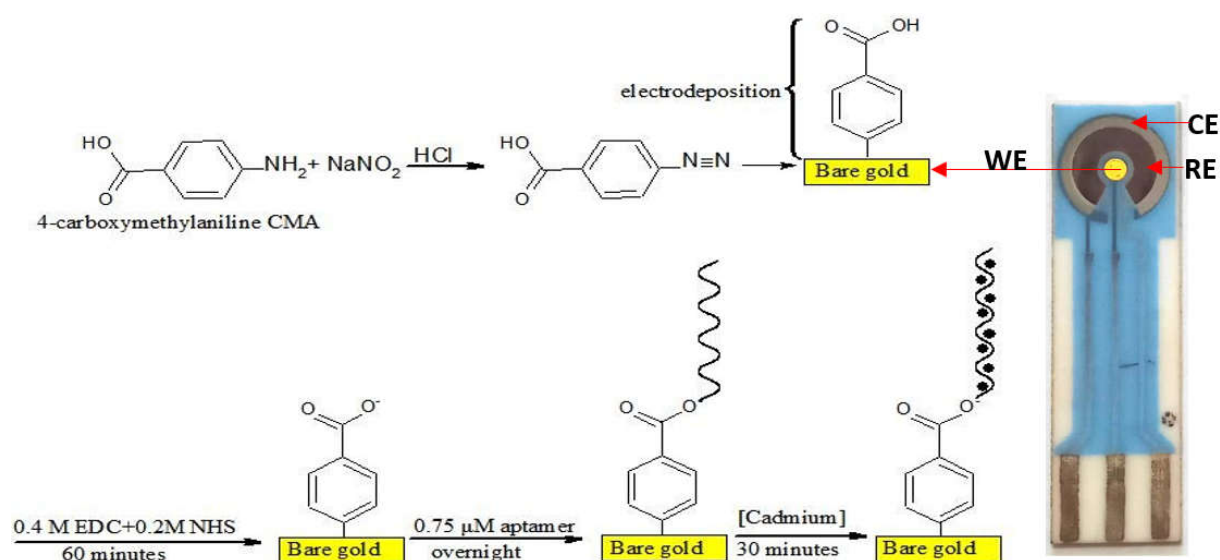


Figure 3-2: illustration schématique de la modification chimique de la surface de l'Or (ET) par CMA suivi d'un aptamère et d'une immobilisation pour la détection de Cadmium [12, 13] en utilisant électrode de référence (ER) et contre électrode (CE) intégrés.

3.3.2. Caractérisation de la surface fonctionnalisée de l'électrode en Or

3.3.2.1. Caractérisation par la Voltamétrie cyclique (VC)

Pour les études de voltamétrie cyclique, la « **Figure 3.3** » montre les différents voltamogrammes cycliques obtenus lors des étapes de la construction de cet aptacapteur. Les pics d'oxydo-réduction du couple redox sont visibles pour l'électrode de travail ou électrode nue. « **Figure 3.3 A(a)** » montre une paire de pics quasi-réversibles caractéristiques de l'oxydo-réduction avec un rapport de pic de courant cathodique et anodique d'environ un et pic- séparation à pic de 0,1V. Ensuite, une diminution significative du courant « **Figure 3.3 A (b)** » a été observée après le greffage électrochimique du sel de Diazonium « **Figure 3.3 B** ». Ici, la réduction électrochimique du sel de Diazonium généré in situ par une réaction de CMA avec NaNO_2 dans une solution de HCl, avec une vitesse de balayage de $80 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, et un potentiel variant de -0,2 à -1V. Dans le premier cycle, la variation de courant a montré une onde de réduction localisée à -0,6V. Ce courant correspond à la réduction du sel de Diazonium en solution qui conduit à la formation d'une radicale amine. Ensuite, nous avons remarqué à partir du deuxième cycle de la scrutation que le courant de réduction diminue remarquablement. Cela peut être attribué à la diminution du taux de transfert d'électrons qui a été créée par la couche de blocage CMA. Cela a été confirmé par une diminution significative du courant « **Figure 3.3 A (b)** ». Après l'immobilisation de l'aptamère, les pics à l'électrode ont considérablement augmenté par rapport à l'électrode de travail en Or modifiée par CMA « **Figure 3.3 A (c)** » Cela implique que la majeure partie de la surface de l'électrode a été recouverte

d'aptamère et démontre une immobilisation réussie de l'aptamère. Ensuite, l'électrode de travail d'Or modifiée a été incubée dans une solution de PBS contenant 1 nM de Cadmium Cd^{2+} pendant 30 min suivi d'une mesure VC « **Figure 3.3 A (d)** ». Ici, nous avons une autre diminution des pics VC, ce qui signifie que le Cd^{2+} a été adsorbé avec succès sur la surface de l'électrode en Or. L'adsorption de Cd^{2+} empêche ou diminue le transfert d'électrons entre la surface de l'Or et les couples redox en solution en raison de l'ouverture de la partie tige d'aptamère et de la formation du complexe Cd^{2+} – aptamère.

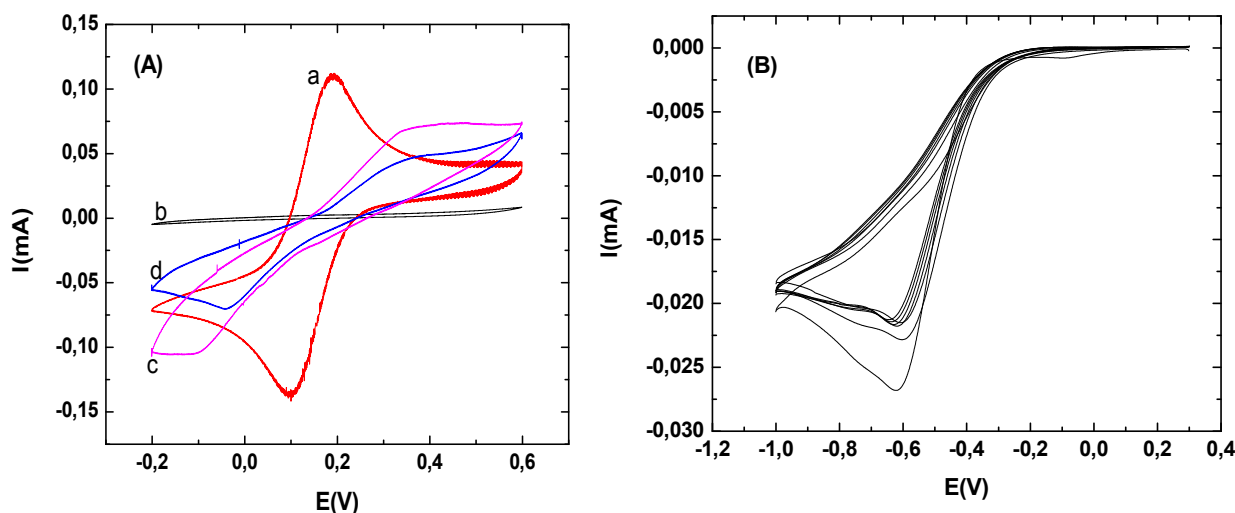


Figure 3-3: voltammogrammes cycliques de (a) l'électrode en Or nue, (b) après dépôt de CMA (c) après immobilisation d'aptamère et (d) après la détection de 10^{-9}M de solution Cd^{2+} . (B) Voltammogrammes cycliques de l'électrodéposition de CMA d'un potentiel de -0,2 V à -1 V avec une vitesse de balayage de 80 mVs^{-1} .

3.3.2.2. Caractérisation par la Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE)

Les spectres d'impédance devaient évaluer le comportement électrochimique de la fabrication d'aptacapteur et réalisés dans une solution de ferrocyanure de potassium ferrique. Les demi-cercles tracés de Nyquist permettent d'évaluer la résistance de la charge de transfert R_{ct} générée par toute modification à la surface des électrodes en Or. Plus la surface est passive, plus la valeur de résistance R_{ct} est élevée « **Figure 3.4** ». Ici, le premier demi-cercle de Nyquist au « **Figure 3.4 (a)** » correspond à l'Or nu qui présente une résistance négligeable R_{ct} . Ensuite, la formation d'une couche organique de CMA sur la surface de l'Or a augmenté le R_{ct} à $25\,290 \Omega$ « **Figure 3.4 (b)** ». Cela était dû à la couche CMA qui diminue le transfert d'électrons des groupements d'aptamère et les groupements carboxyliques réactifs abondants de CMA. L'immobilisation des aptamères a induit une forte augmentation du diamètre semi-circulaire, avec un R_{ct} de $28\,096 \Omega$ « **Figure 3.4 (c)** ». Enfin, l'aptacapteur développé a été testé pour la détection de Cadmium en incubant l'aptacapteur

dans une solution de Cd^{2+} à 10^{-9}M pendant 30 min. Nous avons observé une augmentation de R_{ct} à $42\,537\Omega$ « **Figure 3.4 (d)** » en raison des changements conformationnels induits par le changement de l'aptamère d'une structure de bobine aléatoire à un complexe aptamère-cible [12, 13].

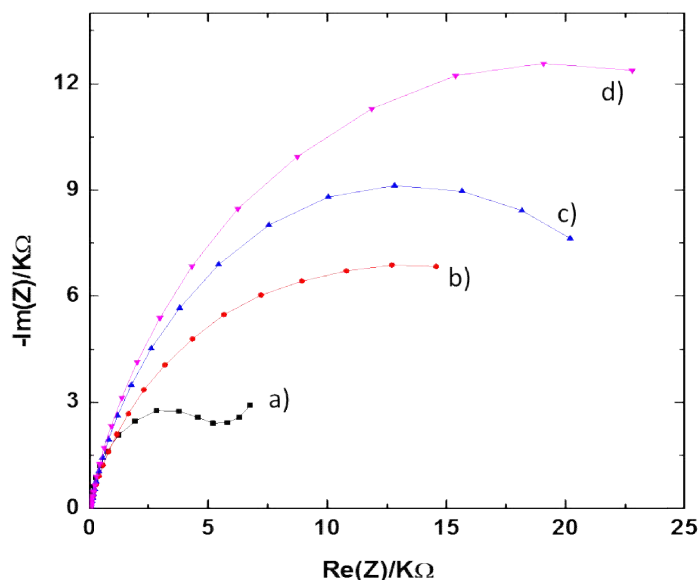


Figure 3-4: diagrammes de Nyquist de l'électrode en or nu (a), le CMA greffé électrochimiquement (b), après dépôt de l'aptamère (c) et après incubation d'Aptamère/CMA/Au dans 10^{-9}M Cd^{2+} (d) en présence de 5 mM de solution $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3- / 4-}$ dans une gamme de fréquences de 100 mHz - 200 kHz. La polarisation potentielle utilisée pour ces mesures a été optimisée à 128 mV.

3.3.3. Optimisation de la concentration de l'aptamère

La concentration d'aptamère détermine sa densité finale sur la surface de l'électrode en Or[14]. L'optimisation de la concentration d'aptamère est une étape cruciale qui affecte la détection des ions Cd^{2+} et les performances analytiques de l'aptacapteur. Par conséquent, trois concentrations différentes d'aptamère qui sont : 0,25, 0,5 et 0,75 μM ont été testées dans la plage de 10^{-10} à 10^{-3}M de Cadmium en utilisant l'SIE. La « **Figure 3.5** » montre la variation de R_{ct} en fonction de la concentration de Cd^{2+} pour les trois concentrations d'aptamère. Comme on peut l'observer en utilisant la concentration d'aptamère 0,25 μM , le R_{ct} était presque le même dans une gamme de 10^{-5} à 10^{-3} M de Cd^{2+} , en raison de la faible complexation de l'aptamère avec sa cible. De plus, cette concentration d'aptamère a généré un signal faible avec une pente (1.744 $\text{k}\Omega$), $R^2 = 0,927$. En parallèle, la concentration d'aptamère de l'ordre de 0,5 μM a abouti à une gamme étroite de linéarité avec une faible pente (3.891 $\text{k}\Omega$) avec une corrélation $R^2 = 0,911$. Enfin, en utilisant la concentration d'aptamère de 0,75 μM , le signal a été amélioré et la réponse analytique de

l'aptacapteur était linéaire dans la gamme de 10^{-9} à 10^{-4} M avec un LOD de $2,75 \cdot 10^{-10}$ M. De plus, la sensibilité a augmenté à 4.683 k Ω par rapport à celle obtenue avec les concentrations inférieures.

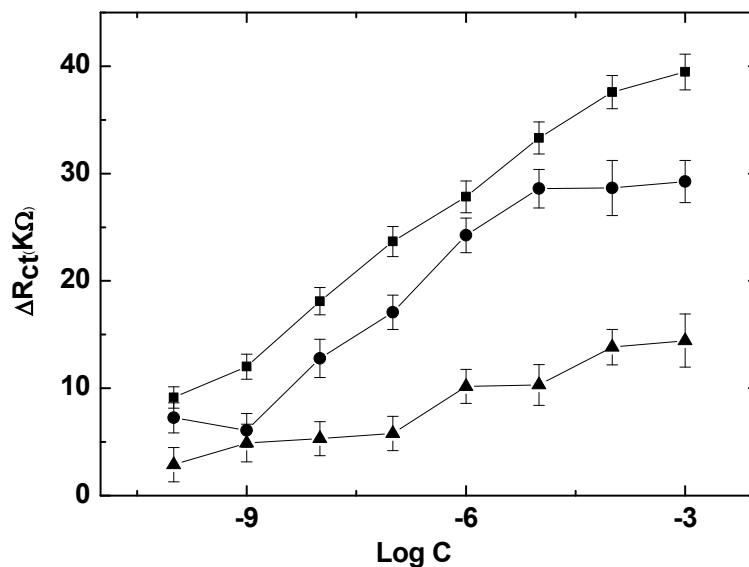


Figure 3-5: Optimisation de la concentration en Cd^{2+} -aptamère par SIE: (▲) 0,25 μM , (●) 0,5 μM et (■) 0,75 μM d'aptamère.

3.3.4. Caractéristiques analytiques de l'aptacapteur

Dans les conditions optimales, l'aptacapteur a été utilisé pour la détection du Cadmium dans un tampon PBS en utilisant la technique SIE. Pour y parvenir, la surface de l'aptamère-Or modifiée a été incubée avec différentes concentrations du Cadmium pendant 30 minutes. Les résultats expérimentaux ont montré une augmentation significative du diamètre des demi-cercles de Nyquist en augmentant la concentration de Cd^{2+} « Figure 3.6 (A) ». Le premier demi-cercle de Nyquist correspond à l'électrode d'Or modifié par l'aptamère avant l'ajout du Cadmium. Après l'incubation de l'aptacapteur avec des concentrations croissantes de la cible, les demi-cercles de la parcelle de Nyquist continuent d'augmenter indiquant l'interaction entre le Cadmium et son aptamère spécifique.

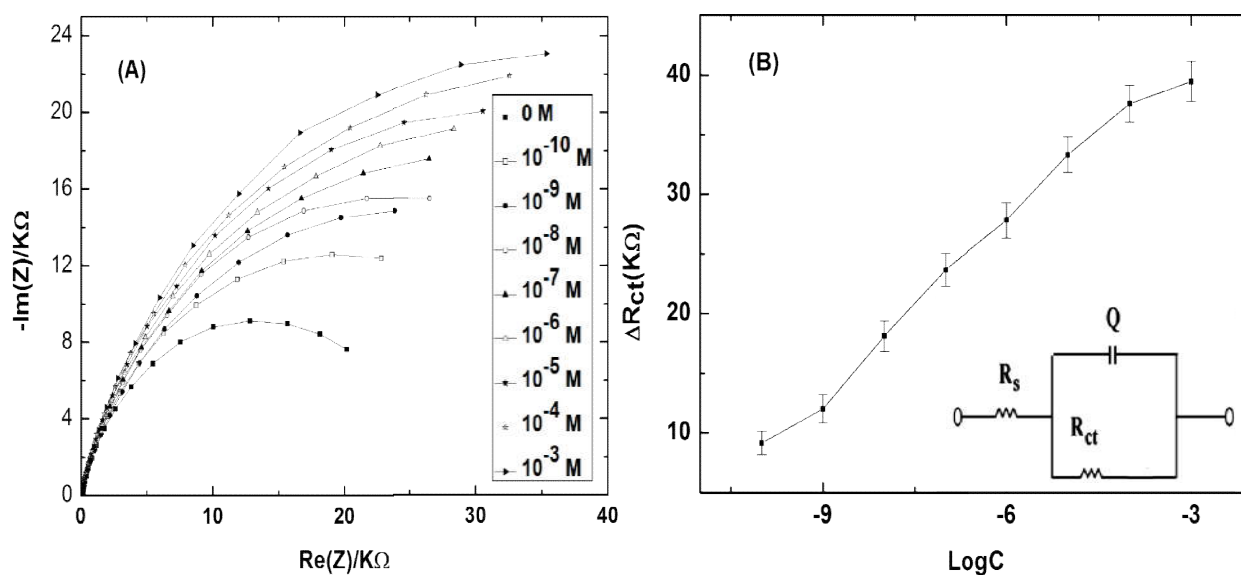


Figure 3-6: (A) Diagrammes de Nyquist de la surface Cd^{2+} -aptamer-ET(or) incubés avec des concentrations croissantes de Cd^{2+} allant de 10^{-3} à 10^{-10} M, (B) sensibilité de l'aptasensor par normalisation des données vers les différentes concentrations de cadmium. Encart: circuit équivalent utilisé pour l'ajustement des demi-cercles du tracé SIE Nyquist.

La résistance de charge de transfert R_{ct} a été extraite des demi-cercles des courbes de Nyquist en utilisant le circuit équivalent de la « **Figure 3.6 (B)** »[1], où R_s représente la résistance de la solution, R_{ct} ; la résistance de transfert de charge et Q ; l'élément de phase constante (un modèle équivalent de la capacité à double couche). La partie réelle de l'impédance ($\text{Re}(Z)$) a augmenté en fonction de la concentration du Cadmium. L'équation de régression linéaire a été normalisée à $\Delta R_{ct} = R_{ct}(\text{Aptamère-Cadmium}) - R_{ct}(\text{Aptamère})$ en fonction du logarithme de la concentration du Cadmium. $R_{ct}(\text{aptamère-cadmium})$ est la valeur de la résistance de transfert d'électrons après la liaison du Cd^{2+} à l'aptamère immobilisé sur la surface de l'électrode modifiée. $R_{ct}(\text{aptamère})$ représente la valeur de la résistance du transfert d'électron après l'immobilisation de l'aptamère sur la surface d'électrode modifiée CMA. La résistance de l'aptacapteur présentait une corrélation linéaire avec la concentration de cadmium dans la gamme de (10^{-10} - 10^{-4} M), avec un bon coefficient de corrélation de ($R^2 = 0,9954$) et une sensibilité de $4.683 \text{ k}\Omega$ par décade de concentration de cadmium. La limite de détection (LOD) de l'aptacapteur est la concentration de cadmium correspondant au rapport 3 fois «s / m», où «s» est l'écart type du signal d'impédance à blanc (trois répliquas) et «m» est la pente de la courbe d'étalonnage correspondante [15]. Ici, la limite de la détection (LOD) calculée était de $2,75 \cdot 10^{-10}$ M. La LOD obtenue dans ce travail était inférieure aux limites de détection des stratégies d'aptamère Cd^{2+} et d'autres méthodes «**Tableau 3.1**».

Tableau 3-1: Comparaison d'autres capteurs avec différentes méthodes de détection pour la détermination du Cd²⁺.

Méthodes de détection	Linéarité (nM)	Limite de détection (LOD) (nM)	Refs.
Aptacapteur fluorescent	0 to 1000	40	[16]
Aptacapteur fluorescent	7,19 to 200	2,15	[17]
Aptacapteur colorimétrique	10 to 400	4,6	[5]
Aptacapteur électrochimique	1to1000	0.337	[18]
Aptacapteur électrochimique	250 to 1000	92	[19]
Aptacapteur électrochimique	0.1to10 ⁶	0,27	Ce travail

Cet aptacapteur montre qu'un écart type de 4,49% a été calculé, indiquant une précision acceptable et une reproductibilité de fabrication.

La production de l'aptacapteur développé a été testée avec une précision intéressante. La précision intéressante a été évaluée en incubant trois électrodes, préparées indépendamment dans les mêmes conditions expérimentales avec une même concentration de cadmium de 10⁻⁶M. Un écart-type relatif de 4,49% a été calculé, indiquant une précision et une reproductibilité de fabrication acceptables.

Pour l'étude de spécificité, la « **Figure 3.7** » représente les changements d'impédance après incubation avec du Cd²⁺ et d'autres métaux lourds tels que Hg²⁺, Pb²⁺ et Zn²⁺ pendant 30 minutes. Trois concentrations ont été testées pour chaque analyte; 10⁻⁸, 10⁻⁷ et 10⁻⁶ M. A ce stade, l'interactivité de l'aptacapteur et la détection du cadmium ont été effectuées uniquement dans le tampon PBS. Comme on peut l'observer dans la « **Figure 3.7** »; les réponses de l'impédance montrent clairement que l'aptacapteur était très sélectif au Cadmium par rapport aux autres métaux lourds testés. Aucun signal significatif n'a été enregistré, même en présence de Pb²⁺ et Zn²⁺. Cependant, une légère réactivité croisée a été notée avec Hg²⁺, elle peut être attribuée à la paire de bases spéciale T – Hg – T mésappariée entre Hg²⁺ et Cd²⁺ - aptamère [20-22]. Ces résultats montrent que l'aptamère sélectionné immobilisé sur l'électrode la surface conserve son affinité et sa spécificité en réaction avec le Cadmium, ce qui donne une augmentation significative de ΔR_{ct} . Ceci peut être considéré comme une validation de la sélectivité des aptacapteurs proposés, car il permet la discrimination entre les métaux lourds testés dans toute la gamme sélectionnée.

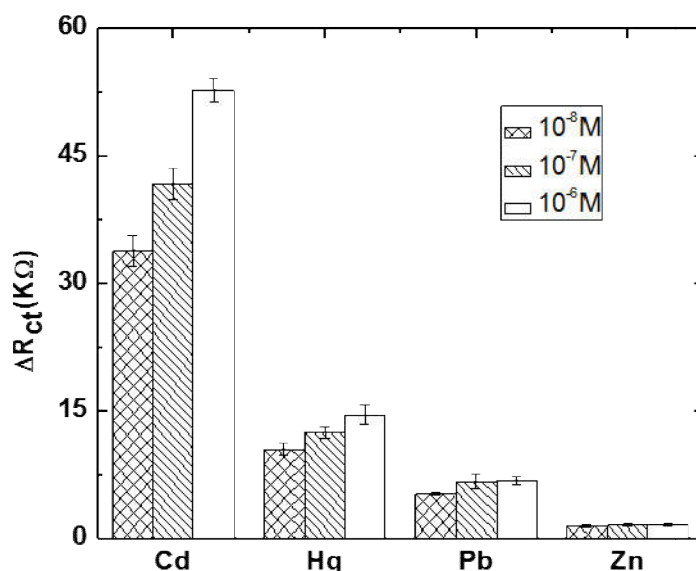


Figure 3-7: Etudes de la sélectivité de l'aptacapteur en présence de Hg, Pb et Zn

3.3.5. Application dans des échantillons d'eau par la méthode des ajouts dosés

L'aptacapteur développé a été appliqué pour la détection du Cadmium dans des échantillons d'eau de la rivière de Hammam Essalihine en utilisant la méthode des ajouts dosés comme décrit précédemment. Quatre flacons contenant les échantillons d'eau réels ont été préparés comme mentionné dans la partie expérimentale, puis analysés par des mesures SIE. La « **Figure 3.8** » représente la première courbe de Nyquist correspond à la surface de l'électrode de l'Or modifiée par l'aptamère avant l'addition du Cadmium, tandis que la seconde est attribuée à l'aptacapteur après avoir été incubée dans le premier niveau 1 pendant 30 min. Un décalage du demi-cercle par rapport au premier a été observé, il s'explique par l'augmentation de la résistance apportée par la réaction de l'aptamère avec le Cadmium. Le deuxième ballon, correspondant au niveau 2, a montré le même comportement que le premier ballon. L'analyse des autres flacons a été effectuée dans les mêmes paramètres. Une augmentation du diamètre semi-circulaire a été remarquée et a été absolument expliquée par l'augmentation de la quantité de cadmium dans les flacons. Afin de déterminer la concentration de Cd^{2+} dans l'échantillon réel, la pente (m) et l'ordonnée à l'origine (b) de la courbe d'étalonnage résultante ($R^2 = 0,987$) ont été utilisées, et la concentration inconnue Cd^{2+} de l'échantillon réel a été estimée être $4,29 \cdot 10^{-8} \text{M}$.

Tableau 3-2: détermination du Cd^{2+} par les aptacapteurs proposés et la Spectroscopie d'Absorption Atomique (SAA) dans les échantillons d'eau et étude de récupération de l'aptasensor pour la détermination du Cadmium.

Ion dans l'échantillon	AAS(C)	L'aptacapteur (Cs)	Récupération (%)
Cd^{2+}	$4.76 \cdot 10^{-8} \text{M}$	$4.29 \cdot 10^{-8} \text{M}$	90.12

Récupération % = $C_s/C \times 100\%$ [23]

Dans le but de valider notre aptasensor, l'échantillon testé a également été analysé par spectroscopie d'adsorption atomique (AAS) qui est une méthode de référence habituellement utilisée pour la détection du cadmium [24, 25]. Les résultats obtenus sont présentés dans « **Tableau 3.2** ». Ils sont en bon accord avec ceux obtenus par la méthode d'addition standard.

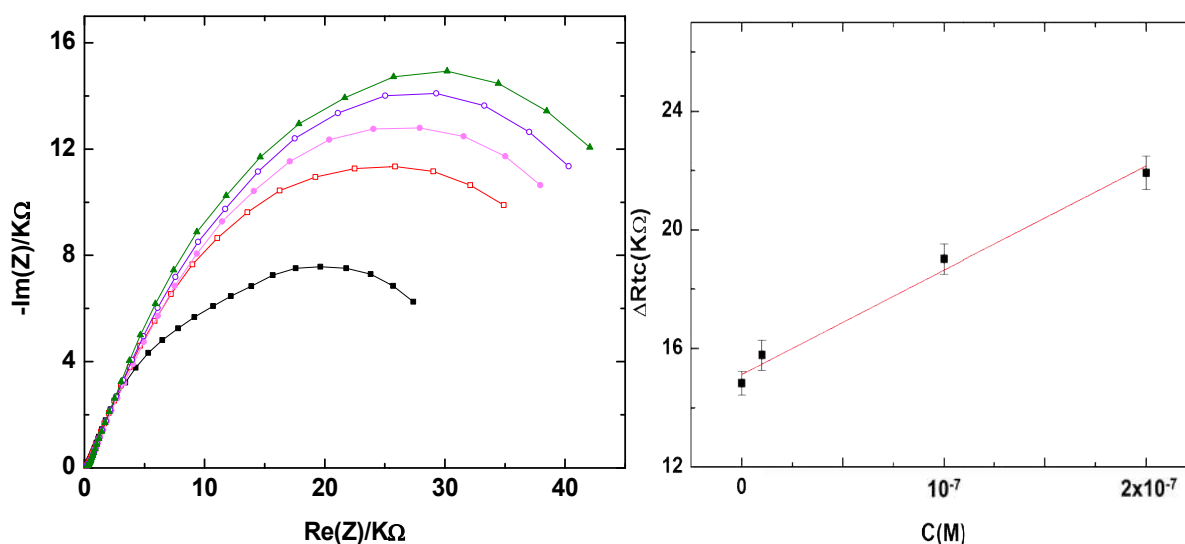


Figure 3-8: (A) courbes de l'impédance de Nyquist obtenues à partir de l'application sur un échantillon réel. (■) PBS; (□) Niveau 1 (correspondant à une addition de 0 M); (●) Niveau 2 (ajout de 10^{-8}M); (○) Niveau 3 (ajout de 10^{-7}M) et (▲) Niveau 4 (ajout de $2 \cdot 10^{-7} \text{M}$). (B) Courbe de sensibilité utilisée pour calculer la concentration d'analyte dans l'échantillon inconnu par la méthode des ajouts dosés. Les barres d'erreur représentent l'écart type relatif sur les mesures effectuées en triple.

3.4. Conclusion

En résumé, un aptacapteur électrochimique a été développé pour la détection du Cadmium. L'aptamère a été immobilisé à travers la méthode de l'immobilisation covalente sur des électrodes d'Or par l'intermédiaire de molécules CMA. Les aptacapteurs étudiés ont montré une relation

linéaire entre les changements de l'impédance et le logarithme de la concentration de Cd^{2+} dans une large gamme de 10^{-3} à 10^{-10} M, avec une LOD d'environ $2,75 \cdot 10^{-10}$ M. En effet, l'aptacapteur actuel présente une excellente sensibilité et sélectivité, en plus d'une bonne reproductibilité. De plus, l'aptacapteur était très sélectif au Cadmium en présence d'autres interférences, telles que Hg^{2+} , Pb^{2+} et Zn^{2+} . Afin de prouver l'applicabilité du procédé, le capteur aptamère construit a été utilisé pour détecter le Cadmium dans des échantillons d'eau d'une source d'eau (rivière) avec une grande précision. Ces résultats prometteurs montrent que la méthode développée pourrait être une excellente alternative aux techniques traditionnelles en raison de sa précision, sa fiabilité, sa simplicité et son faible coût. Ce capteur miniaturisé peut être utilisé dans de larges appareils portables dans les rivières ou directement dans les sources d'eau. De plus, l'électrode de travail pourrait être fonctionnalisée par d'autres aptamères pour permettre la détermination concomitante de plusieurs métaux lourds.

Références.

- [1] A. Baraket, M. Lee, N. Zine, N. Yaakoubi, M.G. Trivella, M. Zabala, J. Bausells, N. Jaffrezic-Renault, A. Errachid, Cytokine detection using diazonium modified gold microelectrodes onto polyimide substrates with integrated Ag/AgCl reference electrode, 2012.
- [2] L. Barhoumi, A. Baraket, F.G. Bellagambi, G.S. Karanasiou, M.B. Ali, D.I. Fotiadis, J. Bausells, N. Zine, M. Sigaud, A. Errachid, A novel chronoamperometric immunosensor for rapid detection of TNF- α in human saliva, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 266 (2018) 477-484.
- [3] A. Longo, A. Baraket, M. Vatteroni, N. Zine, J. Bausells, F. Di Francesco, G.S. Karanasiou, D.I. Fotiadis, A. Menciassi, A. Errachid, Highly sensitive Electrochemical BioMEMS for TNF- α detection in humansaliva: Heart Failure, *Procedia Engineering*, 168 (2016) 97-100.
- [4] S. Baranton, D. Bélanger, Electrochemical derivatization of carbon surface by reduction of in situ generated diazonium cations, *The Journal of Physical Chemistry B*, 109 (2005) 24401-24410.
- [5] Y. Wu, S. Zhan, L. Wang, P. Zhou, Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles, *Analyst*, 139 (2014) 1550-1561.
- [6] D.M. Jenkins, B. Chami, M. Kreuzer, G. Presting, A.M. Alvarez, B.Y. Liaw, Hybridization probe for femtomolar quantification of selected nucleic acid sequences on a disposable electrode, *Analytical chemistry*, 78 (2006) 2314-2318.
- [7] A.B. Kharitonov, L. Alfonta, E. Katz, I. Willner, Probing of bioaffinity interactions at interfaces using impedance spectroscopy and chronopotentiometry, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 487 (2000) 133-141.
- [8] A. Hayat, L. Barthelmebs, A. Sassolas, J.-L. Marty, An electrochemical immunosensor based on covalent immobilization of okadaic acid onto screen printed carbon electrode via diazotization-coupling reaction, *Talanta*, 85 (2011) 513-518.
- [9] H. Araar, M. Benounis, A. Direm, A. Touati, S. Atailia, H. Barhoumi, N. Jaffrezic-Renault, A new thin film modified glassy carbon electrode based on melaminium chloride pentachlorocuprate (II) for selective determination of nitrate in water, *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 150 (2019) 1737-1744.
- [10] K. Hanane, B. Messaoud, B. Houcine, T. Moncef, Highly sensitive modified glassy carbon sensor based on TDAN for nitrate detection in real water, *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 151 (2020) 153-158.
- [11] F.G. Bellagambi, A. Baraket, A. Longo, M. Vatteroni, N. Zine, J. Bausells, R. Fuoco, F. Di Francesco, P. Salvo, G.S. Karanasiou, Electrochemical biosensor platform for TNF- α cytokines detection in both artificial and human saliva: Heart failure, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 251 (2017) 1026-1033.
- [12] Y. Luan, A. Lu, J. Chen, H. Fu, L. Xu, A label-free aptamer-based fluorescent assay for cadmium detection, *Applied Sciences*, 6 (2016) 432.
- [13] Z. Bagheryan, J.-B. Raoof, M. Golabi, A.P. Turner, V. Beni, Diazonium-based impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of Salmonella typhimurium in food sample, *Biosensors and Bioelectronics*, 80 (2016) 566-573.
- [14] R.J. White, N. Phares, A.A. Lubin, Y. Xiao, K.W. Plaxco, Optimization of electrochemical aptamer-based sensors via optimization of probe packing density and surface chemistry, *Langmuir*, 24 (2008) 10513-10518.
- [15] C.M. Riley, T.W. Rosanske, Development and validation of analytical methods, Elsevier1996.
- [16] H. Wang, H. Cheng, J. Wang, L. Xu, H. Chen, R. Pei, Selection and characterization of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Cd (II), *Talanta*, 154 (2016) 498-503.

- [17]** Y.-F. Zhu, Y.-S. Wang, B. Zhou, J.-H. Yu, L.-L. Peng, Y.-Q. Huang, X.-J. Li, S.-H. Chen, X. Tang, X.-F. Wang, A multifunctional fluorescent aptamer probe for highly sensitive and selective detection of cadmium (II), *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409 (2017) 4951-4958.
- [18]** X. Wang, W. Gao, W. Yan, P. Li, H. Zou, Z. Wei, W. Guan, Y. Ma, S. Wu, Y. Yu, A novel aptasensor based on graphene/graphite carbon nitride nanocomposites for cadmium detection with high selectivity and sensitivity, *ACS Applied Nano Materials*, 1 (2018) 2341-2346.
- [19]** H.R.L.Z. Zhad, Y.M.R. Torres, R.Y. Lai, A reagentless and reusable electrochemical aptamer-based sensor for rapid detection of Cd (II), *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 803 (2017) 89-94.
- [20]** C.-K. Chiang, C.-C. Huang, C.-W. Liu, H.-T. Chang, Oligonucleotide-based fluorescence probe for sensitive and selective detection of mercury (II) in aqueous solution, *Analytical chemistry*, 80 (2008) 3716-3721.
- [21]** C. Gao, Q. Wang, F. Gao, F. Gao, A high-performance aptasensor for mercury (II) based on the formation of a unique ternary structure of aptamer–Hg²⁺–neutral red, *Chemical Communications*, 50 (2014) 9397-9400.
- [22]** C.-X. Tang, Y. Zhao, X.-W. He, X.-B. Yin, A “turn-on” electrochemiluminescent biosensor for detecting Hg²⁺ at femtomole level based on the intercalation of Ru (phen) 3²⁺ into ds-DNA, *Chemical Communications*, 46 (2010) 9022-9024.
- [23]** B. Dindar, E. Karakuş, F. Abasıyanık, New urea biosensor based on urease enzyme obtained from *Helicobacter pylori*, *Applied biochemistry and biotechnology*, 165 (2011) 1308-1321.
- [24]** N.A. Kasa, D.S. Chormey, Ç. Büyükpınar, F. Turak, T.B. Budak, S. Bakırdere, Determination of cadmium at ultratrace levels by dispersive liquid-liquid microextraction and batch type hydride generation atomic absorption spectrometry, *Microchemical Journal*, 133 (2017) 144-148.
- [25]** K.S. Rao, T. Balaji, T.P. Rao, Y. Babu, G. Naidu, Determination of iron, cobalt, nickel, manganese, zinc, copper, cadmium and lead in human hair by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57 (2002) 1333-1338.

Chapitre 04

ELABORATION D'UN APTACAPTEUR SELECTIF AU CADMIUM A BASE D'ELECTRODE DE CARBONE MODIFIEE PAR DES NANOPARTICULES D'OR (AUNPs) ET NANOTUBES DE CARBONE (CNT)

4.1. Introduction

Nous présenterons dans ce chapitre, les résultats expérimentaux de l'application du biocapteur électrochimique à base d'aptamère pour la détection du Cadmium. Nous décrirons tout d'abord le protocole d'immobilisation du biorécepteur à la surface de transducteur. Ensuite, nous présenterons les résultats de la caractérisation par la VC (Voltamétrie Cyclique) et la SIE (spectroscopie d'Impédance Electrochimique). Nous poursuivrons en exposant les résultats expérimentaux obtenus pour la détection du Cadmium, la sensibilité, la limite de détection et la sélectivité.

L'aptamère utilisé dans ce travail était le même appliqué au chapitre 03 avec une membrane et méthode tout à fait différentes.

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Réactifs

Les nanotubes de Carbone (CNTs) ont été préparés dans le Laboratoire de Biologie Moléculaire à Constantine (Algérie). Ces CNTs sont fonctionnalisés avec des groupements Carboxyles (COOH) ; Chitosane (CS) ; glutaraldéhyde (à 0.25%) ; PBS (pH 4.5) ; HAuCl_4 ; Na_2SO_4 ; Sulfate du 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 amine): 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'[1].

4.2.2. Les électrodes

4.2.2.1. Electrode de travail

Une électrode de travail ; encore nommée électrode indicatrice où au niveau de laquelle s'effectue les réactions d'oxydo-réductions. C'est est une électrode sur laquelle on examine les différents processus électrochimiques à explorer. A la base, elle est nettoyée avant et après toute mesure avec de l'acétone et l'eau distillée, comme on peut utiliser un papier abrasif. Dans ce travail, une électrode de Carbone vitreux faisait notre choix. Ce matériau est considéré comme bon pour les différentes applications en raison de ses 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 une température élevée qu'à la température ambiante. Il présente également une extrême résistance à l'oxydation, à la corrosion et aux attaques chimiques [2].



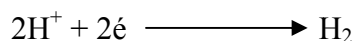
Figure 4-1 : Electrode de travail en Carbone vitreux.

4.2.2.2. Contre électrode

Ou électrode auxiliaire ; qui d'une part permet au courant de traverser la cellule sans endommager l'électrode de référence et d'autre part, de minimiser les effets de la chute ohmique. Elle peut être un fil de platine de 1mm de diamètre.

4.2.2.3. Électrode de référence

Électrode de référence ou Électrode Normale à Hydrogène (ENH) est ainsi nommée par convention internationale pour exprimer les potentiels d'électrode relatifs 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 Calomel saturée (ECS).
- ✓ 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 4-2 : Électrode de référence (a) et contre électrode (b).

4.2.3. Mesures électrochimiques

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier un biocapteur à base d'aptamère conçu pour détecter les ions du Cadmium. Toutes les mesures électrochimiques de la Voltamétrie Cyclique (VC) et la Spectroscopie d'Impédance Electrochimique (SIE) ont été réalisées avec un Potentio/Galvanostat (Biologic EC-Lab SP-300, France) (voir la « **Figure 4.3** » piloté par un logiciel de travail Ec-Lab dans une cellule électrochimique en verre.

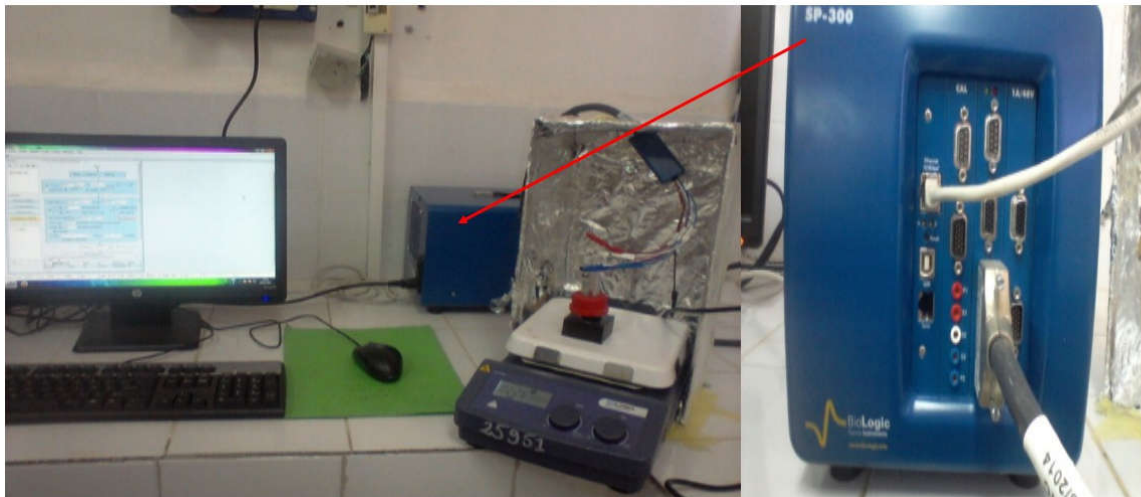


Figure 4-3: (a) montage expérimental de la cellule électrochimique à trois électrodes connectée au (b) Potentio/Galvanostat SP300 utilisé pour les mesures électrochimiques.

La cellule électrochimique de (25cm³) « **Figure 4.4** » consiste à trois électrodes, où les réactions se mènent à la température ambiante et dans une cage de Faraday pour éviter tous parasites électriques.



Figure 4-4: cellule électrochimique en verre à trois électrodes

4.2.4. Préparation du biocapteur

4.2.4.1. 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 qui consiste à nettoyer une électrode en utilisant un papier de polissage[3]. Ensuite, une deuxième étape dont

l'électrode est nettoyée électrochimiquement avec une solution de NaOH (0,5M). Ici, la surface du Carbone vitreux est alors activée en milieu basique en imposant une série de balayages d'un 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 toutes les impuretés sont désorbées.

4.2.4.2. Préparation du film CS-CNTs

Dans cette étape, la préparation d'une solution de Chitosane s'est avéré nécessaire où 1mg de ce polymère est dissout dans 40ml d'une solution tampon d'Acétate. Ensuite, cette solution est soumise pendant 30 mn aux ultrasons, puis filtrée avec un papier filtre de 11 μ m de diamètre. Après, 5mg de nanotubes de Carbone (CNTs) ont été dispersés dans 10ml de la solution de Chitosane (CS) à 0.2% pour avoir une solution (CS-CNTs)[4].

Par la suite, une goutte de la solution de (CS-CNTs, 0.5 M) 6 μ L a été déposée sur l'électrode du CV et laissée sécher à l'air libre. L'électrode ainsi modifiée a été immergée dans une solution de Na₂SO₄ (0.2M) contenant 0.1mM de H₂AuCl₄. Les AuCl₄⁻ adsorbés sur le film de (CS-CNTs) ont été convertis en nanoparticules d'Or via une électrodéposition ampérométrique au moyen de la chronoampérométrie avec un temps de déposition de 400s et un potentiel de -0.2V afin de former un film de AuNPs-CNTs-CS [5] « **Figure 4.6** ». Après le dépôt des NPs d'Or, l'électrode a été lavée doucement avec l'eau distillée et séchée à l'air à la température ambiante.

4.3. Immobilisation d'aptamère-Cadmium

Avant de procéder à l'immobilisation de l'aptamère-Cadmium, une goutte de 6 μ l de la solution du Chitosane (0.2%) a été dispersée sur le film AuNPs-CNTs-CS et séché à l'air à température ambiante. Puis, l'électrode modifiée a été incubée dans une solution de Glutaraldéhyde d'une concentration de 0.25% pendant 2 heures. Après avoir été lavée à l'eau et séchée, l'électrode a été transférée dans la solution d'aptamère spécifique au Cadmium (0.75 μ mol) pendant une nuit. Ensuite, laver avec le PBS à pH 4.5. L'aptamère a été précédemment activé à 90°C pendant 10mn et ensuite à température ambiante pendant 30mn.

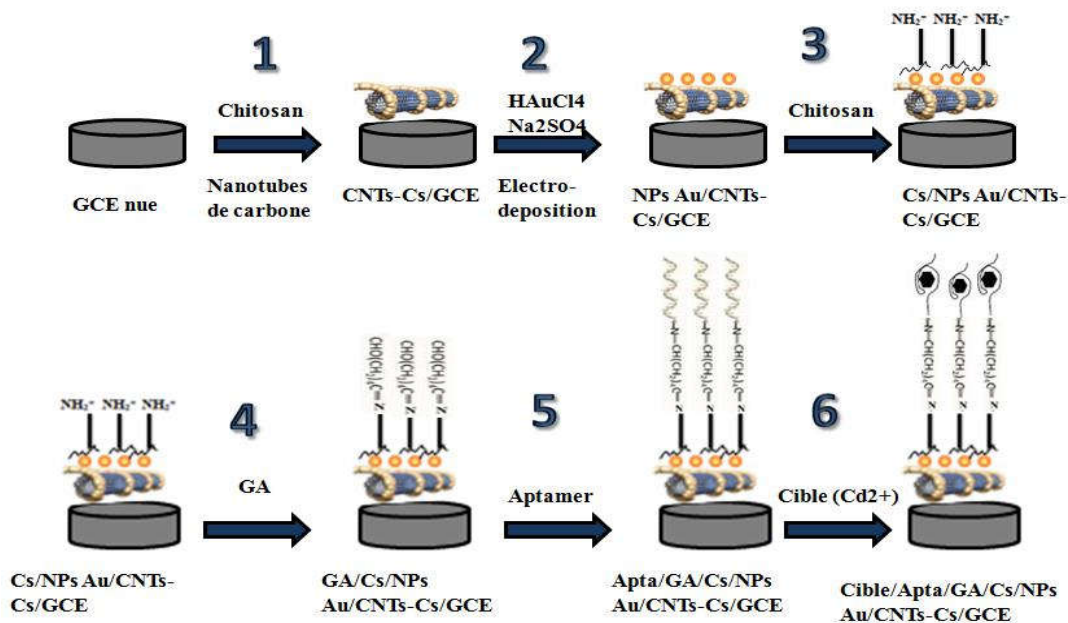


Figure 4-5: représentation schématique des différentes étapes de la conception de l'aptacapteur pour la détection de Cadmium.

4.4. Résultats et discussions

4.4.1. Caractérisation par la Voltamétrie cyclique (VC)

La Voltamétrie 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. Cette méthode permet d'apprécier le degré de réversibilité des systèmes redox étudiés, de déterminer dans certains cas le mécanisme à l'électrode, notamment lorsque des réactions chimiques sont associées au transfert d'électrons. Pour pouvoir caractériser toute modification se produisant à la surface de l'électrode de Carbone vitreux, la technique électrochimique de la Voltamétrie cyclique a été appliquée pour cet objectif dont un potentiel a été varié entre -1V et +1V avec une vitesse de balayage de 50 mV/s sur un nombre de cycles.

La « **Figure 4.6** » présente la caractérisation électrochimique par la VC de l'électrode de CV nue et modifiée, en présence de couples redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$. Les voltamogrammes cycliques démontrent des pics d'oxydo-réductions associés au couple redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ et qui sont visibles en raison du fort taux d'échange avec l'électrode du CV nue « **Figure 4.6 (a), Figure 4.6(b)** » ; qui présentent l'effet voltampérométrique du ferricyanure sur l'électrode modifiée par les CNTs/CS. Les nanotubes du Carbone ayant une surface catalytique active, ils peuvent augmenter la surface active

de l'électrode modifiée [6]. Mais les pics d'oxydation et de réduction du couple redox ont été diminués par rapport au CV nue en raison du comportement bloquant du Chitosane [6]. Pour les AuNPs/CNTs-CS/CV, les pics ont augmenté et la ΔE_p est devenue plus petite par rapport à l'électrode modifiée par les CNTs/CS « **Figure 4.6 (c)** ». Les résultats ont indiqué que les AuNPs ont joué un rôle significatif dans l'augmentation de la surface catalytique électroactive. Lorsque le film composé de AuNPs /CNTs-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 qui apparaissent au niveau de l'électrode modifiée Apt/AuNPs/CNTs-CS/CV « **Figure 4.6 (d)** » ont considérablement diminués par rapport à ceux au niveau du AuNPs/CNTs-CS/CV et le ΔE_p est devenu moins important. Cela implique que la plus grande partie de la surface de l'électrode est recouverte d'aptamère [7]. Cette observation démontre que l'immobilisation de l'aptamère a été réalisée avec succès. L'incubation d'électrode modifiée dans la solution PBS (pH 4.5) contenant 0.1mM de Cadmium Cd^{2+} pondant 30mn a entraîné une nouvelle diminution de pic et une augmentation de la ΔE_p « **Figure 4.6 (e)** ». Cela signifie que les ions Cd^{2+} ont été adsorbés à la surface de l'électrode et 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 [7].

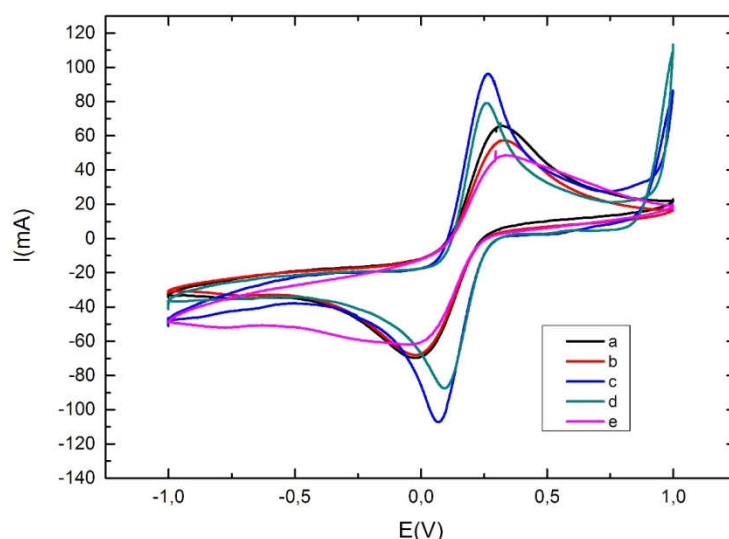


Figure 4-6: Voltammogrammes cycliques en présence de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ de l'électrode nue (a), Cs-CNTs/CV (b), AuNPs/Cs-CNTs/CV (c), Aptamère/AuNPs/Cs-CNTS/CV (d), Cd^{2+} / Aptamère/AuNPs/Cs-CNTS/CV (e) à une vitesse de balayage 50 mV/s.

4.4.2. Caractéristiques analytiques de l'aptacapteur

Une fois l'aptamère est immobilisé à la surface de l'électrode, le biocapteur a été mis en test pour la détection du Cadmium. Pour cela, différentes concentrations croissantes de Cadmium préparées dans du tampon PBS à pH 4.5 et dans lesquelles l'électrode de travail a été incubée pendant 30min. Les 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} M. La technique SIE est très efficace pour évaluer la résistance du transfert de charge d'électrons en étudiant le mécanisme de réaction interfaciale sur la surface de l'électrode, les transformations et les processus associés aux changements de conductivité pendant le processus de construction du biocapteur [8, 9].

La résistance au transfert de charge (R_{ct}) est un paramètre utile reflétant la facilité de réaction des électrodes qui peut être mesurée par SIE à partir du diamètre du demi-cercle dans les graphiques de Nyquist [10].

Les mesures SIE ont été effectuées au potentiel de circuit ouvert en appliquant un potentiel sinusoïdal d'amplitude de -0.5 V sur une gamme de fréquences entre 10kHz et 100 mHz. Les données SIE ont été ajustées en utilisant le circuit équivalent de Randles pour ajuster les données expérimentales et extraire les informations nécessaires des 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_1) (correspond à la valeur sur l'axe Z_r du premier point du demi-cercle), une résistance de transfert de charge (R_2) (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). La modélisation des données obtenues de la SIE a été réalisée par le logiciel EC-Lab en utilisant la méthode Randomize + Simplex. Ici, randomize a été arrêté sur 100 000 itérations et l'ajustement sur 5000 itérations.

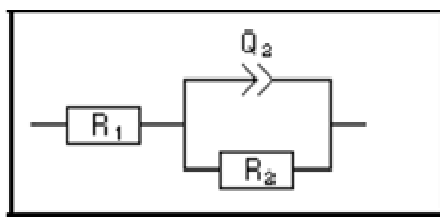


Figure 4-7: Circuit équivalent de Randles.

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

Le comportement électrique de ce système électrochimique était représenté par le circuit électrique équivalent de Randles « **Figure 4.7** » selon lequel les demi-cercles de la courbe de Nyquist ont été ajustés « **Figure 4.8** ». 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 liée au transfert d'électrons après la liaison du Cd^{2+} à l'aptamère immobilisé à la surface modifiée de l'électrode. Une relation linéaire constante entre les concentrations de R_{ct} et du Cadmium s'était établie de 10^{-13} à 10^{-4} M, avec un bon coefficient de corrélation $R^2 = 0.985$ et une sensibilité de $1.2 \text{ K}\Omega$ par décennie de concentration de Cadmium. La limite de détection était de $2.011 \cdot 10^{-14} \text{ M}$.

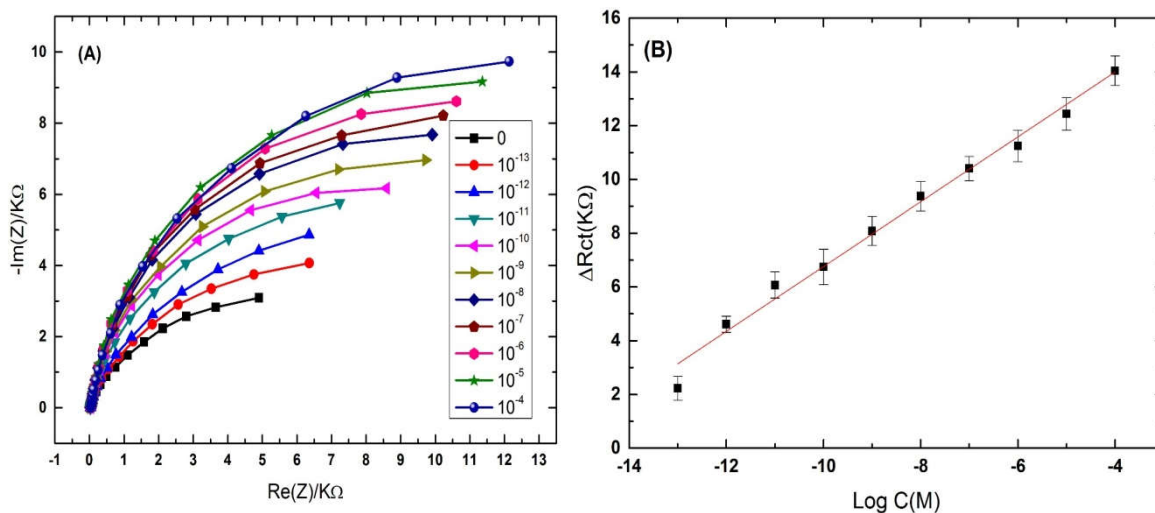


Figure 4-8: (A) Diagrammes de Nyquist de la surface Cd^{2+} -aptamère-CV obtenus suite à l'incubation dans des concentrations croissantes de Cd^{2+} allant de 10^{-4} à 10^{-13} M, à un potentiel de -0.5V et une gamme de fréquence de 10kHz - 100mHz . (B) La sensibilité de l'aptacapteur par normalisation des données vers les différentes concentrations du Cadmium.

4.4.3. Sélectivité

Le coefficient de variation obtenu à partir de trois mesures effectuées est très bon lorsqu'il varie entre 5% et 6 % dans l'intervalle de concentrations étudiées.

La production de l'aptacapteur développé a été testée avec une précision intéressante, cette dernière a été évaluée en incubant trois électrodes préparées indépendamment dans les mêmes conditions expérimentales avec une même concentration de Cadmium de 10^{-6} M.

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 sur des concentrations de 10^{-8} à 10^{-6} pour les interférents. Comme on peut le voir sur la « **Figure 4.9** ». 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 [11].

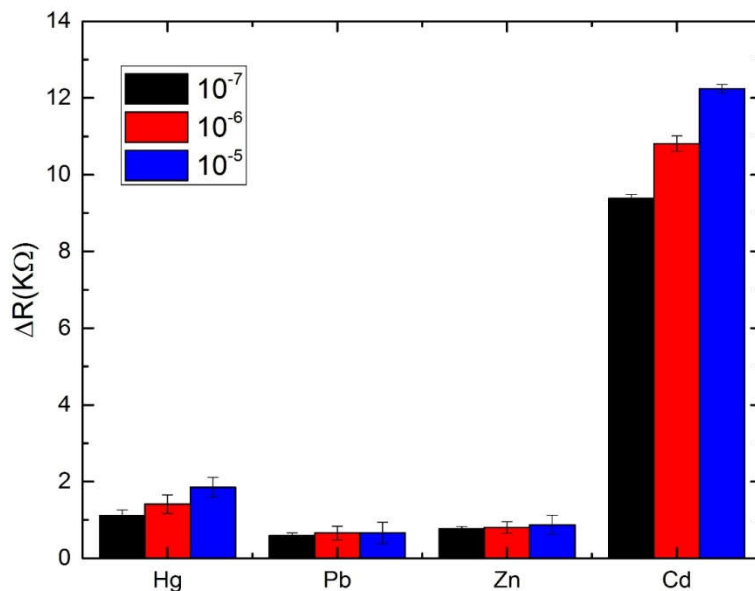


Figure 4-9: comparaison des réponses du biocapteur obtenues en présence d'éventuelles substances interférentes avec le Cadmium dans un tampon PBS à pH 4.5.

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 cet ion avec une limite de détection très basse de 0.02 pM. La méthode proposée pour l'élaboration de cet aptacapteur et qui consiste à l'immobilisation de l'aptamère spécifique au Cadmium avec réticulation dans une matrice de Chitosane (CS) sur une électrode de Carbone vitreux (CV) et l'utilisation des nanoparticules d'Or (AuNPs) et des nanotubes de Carbone (CNTs). Nous avons constaté que l'application des nanoparticules d'Or NPs et des nanotubes de Carbone ont amélioré les performances analytiques de cet aptacapteur en termes de la limite de détection, la reproductibilité et la sensibilité. Une large gamme linéaire est obtenue de 10^{-14} à 10^{-4} M.

Références.

- [1] Y. Wu, S. Zhan, L. Wang, P. Zhou, Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles, *Analyst*, 139 (2014) 1550-1561.
- [2] A. Craievich, On the structure of glassy carbon, *Materials Research Bulletin*, 11 (1976) 1249-1255.
- [3] G. Gotti, Modification de surfaces électrochimiques par des nanoparticules d'or pour la détection de molécules impliquées dans le stress oxydant, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2013.
- [4] Y.-C. Tsai, S.-Y. Chen, H.-W. Liaw, Immobilization of lactate dehydrogenase within multiwalled carbon nanotube-chitosan nanocomposite for application to lactate biosensors, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125 (2007) 474-481.
- [5] X. Kang, Z. Mai, X. Zou, P. Cai, J. Mo, 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, *Analytical biochemistry*, 369 (2007) 71-79.
- [6] P. Serp, J.L. Figueiredo, *Carbon materials for catalysis*, John Wiley & Sons 2009.
- [7] A.B. Hashkavayi, J.B. Raoof, R. Azimi, R. Ojani, Label-free and sensitive aptasensor based on dendritic gold nanostructures on functionalized SBA-15 for determination of chloramphenicol, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408 (2016) 2557-2565.
- [8] A. Ramanavicius, A. Finkelsteinas, H. Cesulius, A. Ramanaviciene, Electrochemical impedance spectroscopy of polypyrrole based electrochemical immunosensor, *Bioelectrochemistry*, 79 (2010) 11-16.
- [9] A.K. Singh, M. Singh, N. Verma, Electrochemical preparation of Fe₃O₄/MWCNT-polyaniline nanocomposite film for development of urea biosensor and its application in milk sample, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14 (2020) 163-175.
- [10] N. Kaur, H. Thakur, N. Prabhakar, Conducting polymer and multi-walled carbon nanotubes nanocomposites based amperometric biosensor for detection of organophosphate, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775 (2016) 121-128.
- [11] L. Li, B. Li, Y. Qi, Y. Jin, Label-free aptamer-based colorimetric detection of mercury ions in aqueous media using unmodified gold nanoparticles as colorimetric probe, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393 (2009) 2051-2057.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

La présente thèse a fait l'objet de l'élaboration de deux biocapteurs électrochimiques sélectifs à base d'un aptamère spécifique à la détection du Cadmium dans des eaux réelles à Khenchela.

La réalisation de ces travaux a été le fruit du travail mené essentiellement au Laboratoire des Capteurs, Instrumentations et Procédés (LCIP) à Khenchela et la collaboration avec l'Ecole Supérieure Nationale de la Biotechnologie (Constantine), le Laboratoire des Sciences Analytiques (LSA) à Lyon-France, et le Laboratoire des Biocapteurs, Analyse et Environnement (BAE) de l'université de Perpignan Via Domitia (France).

Le premier aptacapteur électrochimique a été développé en immobilisant par covalence l'aptamère spécifique au Cadmium sur des électrodes d'Or par l'intermédiaire des sels de Diazonium (CMA). L'aptacapteur étudié a montré une relation linéaire entre les changements de l'impédance et le logarithme de la concentration de Cd^{2+} dans une large gamme de 10^{-3} à 10^{-10} M, avec une limite de détection d'environ $2,75 \cdot 10^{-10}$ M. En effet, l'aptacapteur actuel présente une excellente sensibilité et sélectivité, en plus d'une bonne reproductibilité. De plus, l'aptacapteur était très sélectif au Cadmium en présence d'autres interférences, telles que Hg^{2+} , Pb^{2+} et Zn^{2+} . Afin de prouver l'applicabilité du procédé, le capteur aptamère construit a été utilisé pour détecter le Cadmium dans des échantillons d'eau d'une source d'eau (rivière) avec une grande précision.

Le second aptacapteur a été conçu à partir d'une électrode de Carbone Vitreux modifiée avec des Nanoparticules d'Or (AuNPs) électrodéposées par chronoampérométrie à -0.2 V pendant 400 secondes sur des Nanotubes de Carbone (CNT) dans un film de Chitosane CS (CNT/CS). Par la suite l'aptamère a été stabilisé dans la matrice de bio-polymère par une réticulation chimique avec le glutaraldéhyde entraînant la formation de liaisons covalentes stables (GCE/CS-CNTs/AuNPs/Aptamère). Ce biocapteur permet la détection du Cadmium avec une linéarité de 10^{-13} à 10^{-4} M, une corrélation de 0.985 et une sensibilité de $1.2 \text{ K}\Omega \cdot \text{M}^{-1}$, une bonne sélectivité en présence d'autres ions (Hg^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+}) et une limite de détection de 0.02 pM .

A la lumière de ces résultats, nous avons vu l'intérêt potentiel d'intégrer les nanomatériaux comme les nanotubes de Carbone et des nanoparticules d'Or aux surfaces des capteurs utilisés pour améliorer la détection des analytes. De plus, nous recommandons comme perspective l'application de ces biocapteurs dans des échantillons biologiques comme le sérum sanguin, la reproductibilité et le temps de réponse.

Afin de conclure, ces résultats prometteurs montrent que les méthodes développées pourraient représenter des alternatives aux techniques traditionnelles en raison de leur précision, leur fiabilité, leur simplicité et leur faible coût. Ces capteurs permettent la détection du Cadmium, pourraient être fonctionnalisés par d'autres aptamères pour permettre la détermination concomitante de plusieurs métaux lourds.

Annexe A-

Liste des publications et communications scientifiques**1. Publications et articles soumis**

Selma Rabai, Messaoud Benounis, Gaëlle Catanante, Abdoullatif Baraket, Abdelhamid Errachid, Nicole Jaffrezic Renault, Jean - Louis Marty, Amina Rhouati. Development of a label-free electrochemical aptasensor based on diazonium electrodeposition: Application to cadmium detection in water . International Journal Analytical Biochemistry , 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113956>

2. Conférences nationales et internationales

Rabai Selma, Messaoud Benounis, Amina Rhouati , Nicole Jaffrezic-Renault , Errachid Abdelhamid, Abdoullatif Baraket , Développement d'un biocapteur électrochimique à base d'aptamère pour la détection du cadmium dans l'eau, Matériaux et applications aux dispositifs capteurs (MADICA), El Mahdia, 6-8 Novembre 201

ملخص:

في هذه الدراسة تم تطوير جهازي استشعار كهروكيميائي باستخدام أبتامير الكاديوم للكشف عن أيونات الكاديوم في عينات المياه الحقيقية.

بناءً على قطب كهربائي ذهبي تم تعديله كيميائياً عن طريق الاختزال الكهروكيميائي لملاح aptacensor أولاً ، تم تطوير أول Carbodiimide وحمض الكربوكسيل ، حيث تم تجميد أبتامير الكاديوم المعدل بالأمين بواسطة تفاعل (CMA) الديازونيوم يبلغ 2.75×10^{-10} (LOD) أظهر هذا المستشعر الحيوي نطاقاً خطياً من 10^{-3} إلى 10^{-9} مولار كاديوم مع حد اكتشاف تتيح هذه المنصة أيضاً تطبيقاً واعدًا Zn^{2+} و Hg^{2+} و Pb^{2+} مولار. تم الحصول على انتقائية عالية عند قياس التداخل في وجود (على عينات من مياه الينابيع في خنشلة (الجزائر).

بعد ذلك ، تم وضع لاقط آخر من خلال تعديل قطب كربون زجاجي باستخدام الأنابيب النانوية الكربونية الشيتوزان (CNTs-CS) ، ثم باستخدام جزيئات الذهب النانوية المترسبة كهربائياً (AuNPs) على الأنابيب النانوية الكربونية. CS- ، ثم تثبيت أبتامير-كاديوم عن طريق الجلوتارالدهيد. من بين ظروف التحسين ، وقت تثبيت لمدة ساعتين ، درجة حموضة 4.5 ، ودرجة حرارة 25 درجة مئوية وتركيز أبتامير 0.75 ميكرومتر. يوضح هذا المستشعر الحيوي حساسية عالية (1.2 KΩ.M-1) ؛ نطاق خطي عريض (10-13 – 10-4 م) وحد كشف يبلغ 0.02 ميكرومتر مع انتقائية جيدة للكاديوم.

كلمات مفتاحية: أبتامير الكاديوم؛ أنابيب نانوية كربونية؛ جسيمات نانوية ذهبية؛ ك، يتوزان

Résumé :

Notre thèse a été consacrée pour le développement de deux aptacapteurs électrochimiques pour la détection des ions Cadmium dans des échantillons réels d'eaux.

D'abord, le premier aptacapteur a été développé à base d'une électrode d'Or modifiée chimiquement par la réduction électrochimique du sel de Diazonium (CMA) et l'acide carboxylique, sur laquelle un aptamère-Cadmium amino-modifié a été immobilisé par la réaction Carbodiimide. Ce biocapteur a montré une gamme linéaire de 10^{-3} à 10^{-9} M de Cadmium avec une limite de détection (LOD) de $2,75 \times 10^{-10}$ M. Une sélectivité élevée a été obtenue lors des mesures d'interférences en présence de Hg^{2+} , Pb^{2+} et Zn^{2+} . Cette plateforme permet également une application prometteuse sur des échantillons d'une eau de source à Khenchela (Algérie).

Ensuite, un autre aptacapteur a été mis en place à travers la modification d'une électrode de Carbone vitreux par des nanotubes de Carbone-Chitosan (CNTs-CS), puis avec des nanoparticules d'Or électro-déposées (AuNPs) sur les CNTs-CS, et puis l'immobilisation de aptamère-Cadmium via le glutaraldéhyde. Parmi les conditions d'optimisation, un temps d'immobilisation de 2 heures, un pH 4,5, une température de 25 °C et concentration d'aptamère de 0,75 µM. Ce biocapteur démontre une sensibilité de élevée (1,2 KΩ.M-1); une large plage linéaire (10^{-13} – 10^{-4} M) et une limite de détection de 0,02 pM avec une bonne sélectivité vis-à-vis le Cadmium.

Mots Clés : Cd-aptamer , Nanotubes de carbone , Nanoparticules d'or , Chitosan.

Abstract:

Our work was addressed to the development of two electrochemical aptasensors for the Cadmium ions detection in real water samples.

In the first place, the first aptasensor was developed based on a Gold electrode chemically modified by the electrochemical reduction of the Diazonium salt (CMA) and carboxylic acid, on which an amino-modified aptamer-Cadmium was immobilized by the Carbodiimide reaction. This biosensor showed a linear range of 10^{-3} to 10^{-9} M of Cadmium with a limit of detection (LOD) of $2.75 \cdot 10^{-10}$ M. High selectivity was obtained during interference measurements in the presence of Hg^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} . This platform allows also a promising application on samples of spring water in Khenchela (Algeria).

Then, another aptasensor was put in place through the modification of a Glassy Carbon electrode with nanotubes of Carbon-Chitosan (CNTs-CS), then with Gold nanoparticles electro-deposited (AuNPs) on the CNTs-CS, and then immobilization of aptamer-Cadmium via glutaraldehyde. Among the conditions for optimization, an immobilization time of 2 hours, a pH of 4.5, a temperature of 25 °C and an aptamer concentration of 0.75 μM . This biosensor demonstrates high sensitivity of $1.2 \text{ K}\Omega \cdot \text{M}^{-1}$, a large linear range 10^{-13} – 10^{-4} M and a detection limit of 0.02 pM with good selectivity towards Cadmium.

Key Words : Cd-aptamer, Carbon nanotubes, Au nanoparticles, Chitosan.