

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE Mohammed Seddik Ben Yahia JIJEL
FACULTE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE.
DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES



Thèse
Présentée pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Option : Génie des Matériaux
Par :

KAZANE IMEN

Thème

**Elaboration de matériaux pour le développement de
microcapteurs chimiques pour la détection des polluants dans les
milieux hydriques.**

Thèse soutenue publiquement le « 9 juillet 2018 »,
devant le jury composé de :

- | | | |
|--------------------|---|---------------|
| • Mr. M. LAHOUEL | Professeur. U.M.S.B. Jijel | Président. |
| • Mr. A.ZAZOUA | Professeur. U.M.S.B. Jijel | Rapporteur. |
| • Mme. K.MORAKCHI | M.C.A. U. Annaba | Examinatrice. |
| • Mr. M. BOUROUINA | Professeur. U. Bejaia | Examineur. |
| • Mr. A. AZIOUNE | Directeur du Centre de recherches
en Biotechnologie. Constantine | Invité. |

A la mémoire de mes grands parents.

A ma mère

A mon père, A ma sœur Mira

A mes frères Alaoua, tarik et Nazim.

Ames belles sœurs Farida et Radia.

A tous les membres de la famille Kazane et Sayoud.

Remerciements

Je commence ces remerciements par ceux adressés à mon collègue et directeur de thèse le Pr Zazoua Ali de m'avoir fait découvrir le monde des capteurs électrochimiques et pour ses encouragements aussi

Je remercie également le président du jury Pr Lahouel Mesbah pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je tiens à remercier Mme Morakchi Karima de l'université d'Annaba, pour ce grand déplacement, en tant qu'examinatrice de mon travail. Je remercie également le Pr Bourouina Mustapha de l'université de Béjaia de m'avoir également fait l'honneur de juger ces travaux. Je m'adresse aussi à notre invité Mr. Azioune Ammar en lui souhaitant la bienvenue à l'université de Jijel.

Ce travail de thèse est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire de Matériaux: Elaborations-Propriétés-Applications (LMEPA) de l'université de Jijel au sein de l'équipe Surfaces/Interfaces Capteurs et Biocapteurs (SICB) dirigée par Pr Ali. Zazoua et le Département de Chimie Moléculaire de l'université Grenoble Alpes au sein de l'équipe Biosystème Electrochimique Analytique (BEA) dirigés par Dr Serge Cosnier. Au cours de cette thèse, de nombreuses personnes ont traversé ma route, j'espère que je n'en oublierai aucune dans ces remerciements.

Tout d'abord, je tiens donc personnellement à remercier le Dr Serge Cosnier pour son accueil très chaleureux, sa confiance et sa gentillesse ce qui a facilité mon intégration rapide au sein de l'équipe BEA. Son suivi, sa disponibilité et sa rigueur m'ont permis d'avancer dans mon travail.

Je suis profondément reconnaissante à Karine Gorgy pour ses encouragements, son soutien, sa rigueur, ses conseils, sa générosité et surtout sa gentillesse. Sa disponibilité au quotidien et sa motivation pendant les moments les plus difficiles de ces dix huit mois passés à Grenoble, m'ont permis d'avancer à grand pas. Karine était très attentionnée et a veillé à ma sécurité au cours de mon séjour. Merci encore ma très chère Karine.

Je suis très reconnaissante à Chantal Gondran, pour son soutien, ses conseils et son aide qui m'ont permis d'enrichir mes connaissances surtout en impédance. Sa présence au quotidien et ses conseils bien définis lors des manipulations de spectroscopie d'impédance ont mené à achever cette recherche avec succès. Je n'oublierais pas son intervention qui était à chaque fois très efficace. Merci Chantal, j'ai acquis tant de connaissances et obtenu tant de bonnes idées lors des manipulations.

Je remercie Arielle Le Pellec qui m'a permis de travailler dans de bonnes conditions : sa disponibilité, son aide technique et surtout la livraison des commandes dans un temps très court. Un grand merci est adressé à Régine et Véronique pour leur aide au laboratoire dans les procédures administratives.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe BEA de leur compagnie et toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter : Fabien, Yannig, Alan et Michael.

Je souhaiterais remercier les membres du bâtiment Nanobio surtout l'équipe I2BM. Mr Nicholas spinelli qui a synthétisé le fameux aptamère, Hugues, Sabine, Angéline et ma très chère Liliane qui m'a toujours tenu compagnie très tôt le matin. Je remercie mes ami(es) tunisiens, marocains et algériens, irakiens et syriens (Raoudha, Mariam, Jamila, Kamal, Abderrahim, Abdelkader, Louiza, Nezar, Takfarinas, Imen, Khadidja, Khawla, son mari abderrazak, sima, Mr et Mme Bouquerel, Nicholas, Mr et Mme Gallien, mathilde et Chloé). Je souhaite également remercier tous les thésards, post-docs et stagiaires qui sont passés au laboratoire durant mon séjour à Grenoble surtout Caroline et Solène.

Je suis très reconnaissante pour ma très chère amie Dounia pour son aide durant mon séjour à Grenoble et je n'oublierai jamais les jolis jours passés ensemble. Je souhaite un prompt rétablissement pour ses parents.

J'exprime ma gratitude au professeur Azzouze, Ex-Directrice du laboratoire d'Interaction Matériaux Environnement à l'Université de Jijel, de m'avoir permis d'effectuer des manipulations au sein du laboratoire. Mes remerciements aux Pr Roula, Pr Benabbes, Mr Moussaoui et mes collègues des départements de génie des procédés, TST tronc communs et mes collègues et amies des autres départements de l'université de Jijel. Je remercie aussi mes ex collègues du laboratoire de chimie, de biologie et du laboratoire LIME surtout Sabrina et Amira.

Mes remerciements également à mes collègues et à mes amies de l'équipe (SICB) pour les moments agréables passés ensemble surtout Dina et Nawal. Une pensée particulière à notre collègue Hana Fourou décédée dans un tragique accident, que dieu la garde dans son vaste paradis.

Enfin, j'exprime ma gratitude au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique pour le soutien financier durant mon séjour en France et l'Entreprise Nationale des Produits Miniers Non Ferreux et des Substances Utiles (ENOF, SPA)

Pour finir, je voudrai remercier l'ensemble de ma famille et un grand merci à ma très chère maman.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	01
------------------------------------	-----------

Chapitre I : LES (BIO)CAPTEURS CHIMIQUES

I- Les capteurs chimiques.....	06
I.1 Définition.....	06
I.2 Structure et fonctionnement d'un capteur.....	06
I.3 Caractéristiques métrologiques d'un capteur.....	07
II- Les biocapteurs.....	08
II.1 Définition d'un biocapteur.....	08
II.2 Le biorécepteur.....	09
III- Les aptamères.....	09
III.1 Aptamères - une alternative aux anticops?.....	10
III.2 Contexte théorique : aptamères.....	12
III.3 Structure des aptamères.....	12
III.3.1 La structure primaire.....	12
III.3.2 La structure secondaire et tertiaire.....	13
III.4 Fixation d'un aptamère à sa cible.....	15
III.5 Affinité des aptamères.....	16
III.6 Selex-Sélection in vitro.....	17
III.6.1 Principe général.....	17
III.6.2 Les modifications pré et post-SELEX.....	19
III.6.3 Applications de s aptamères.....	20
III.6.3.1 Applications thérapeutiques.....	20
III.6.3.2 Applications pour le diagnostic.....	21
III.6.3.3 Applications analytiques.....	24
IV- Les enzymes.....	26
IV.1 Structure générale.....	27
IV.1.1 Site actif.....	27
IV.1.2 Les cofacteurs.....	28
IV.2 Classification des enzymes.....	28
IV.3 Mécanisme réactionnel et cinétique enzymatique.....	28
IV.3.1 La détermination graphique de la constante de Michaelis et de v_{max}	29
IV.3.1.1 Cinétique enzymatique en phase homogène.....	29
IV.3.1.2 Cinétique enzymatique en phase hétérogène.....	30
IV.3.2 Facteurs influençant l'activité enzymatique.....	31
IV.3.2.1 Effet de la température.....	32
IV.3.2.2 Effet du pH.....	32
VII Les argiles.....	32
VII.1 Structure des minéraux argileux.....	33
VII.1.1 La couche tétraédrique.....	34
VII.2 Classification des minéraux argileux.....	35

VII.3 Les smectites.....	35
VII.3.1 Propriétés physicochimiques des smectites.....	38
VII.3.1.1 Surfaces spécifiques.....	38
VII.3.1.2 Capacité d'échange de cations.....	38
VII.3.1.3 Interactions avec des composés inorganiques et organiques.....	39
VII.3.1.4 Gonflement des smectites.....	40
VII.3.2 Les argiles montmorillonites (bentonites).....	40
V- Procédés d'immobilisation des (bios) molécules.....	41
V.1 Procédés physiques d'immobilisation.....	42
V.1.1 Adsorption.....	42
V.1.2 L'encapsulation.....	42
V.2 Procédés chimiques d'immobilisation.....	43
V.2.1 Le greffage chimique.....	43
V.2.2 La réticulation.....	43
V.2.3 L'ancrage par interactions affines.....	43
V.3 Utilisation des argiles pour l'immobilisation des enzymes.....	43
VI- Classification des (bios) capteurs chimiques.....	48
VI.1 Les capteurs électrochimiques.....	49
Références bibliographiques	

CHAPITRE II: ELABORATION DES (BIO) CAPTEURS

Partie A : Elaboration d'un biocapteur pour la détection du bisphénol A par immobilisation d'un aptamère

II.1 Introduction	63
II.2 Bisphénol A.....	63
II.3 Méthodes d'analyses existantes du bisphénol A	65
II.3.1 Méthodes analytiques.....	65
II.3.2 Dosage immuno-enzymatique (ELISA).....	66
II.3.3 Immunocapteurs optiques.....	66
II.3.4 Méthodes électrochimiques.....	67
II.3.4.1 Détection électrochimique du BPA à base de nanoparticules.....	67
II.3.4.2 Capteurs électrochimiques à base de polymère à empreinte moléculaire.....	68
II.3.5 Immunocapteurs électrochimiques.....	68
II.4 Section expérimentale.....	69
II.4.1 Objectif de l'étude.....	69
II.4.2 Synthèse de l'aptamère.....	70
II.4.3 Préparation et immobilisation de l'aptamère.....	71
II.4.4 Etudes électrochimiques.....	72
II.4.4.1 Réactifs.....	72
II.4.4.2 Appareillage.....	73
II.5 Résultats et discussions.....	73
II.5.1 Caractérisation du pyrrole-NTA et poly (pyrrole-NTA).....	74
II.5.1.1 Electrochimie du monomère en solution.....	74

II.5.1.2 Electropolymérisation du pyrrole-NTA par voltampérométrie cyclique.....	75
II.5.1.3 Electrodeposition du pyrrole-NTA à potentiel contrôlé.....	76
II.5.1.4 Evaluation du rendement d'électropolymérisation du poly (pyrrole-NTA).....	78
II.5.1.5 Caractérisation impédancemétrique des films de poly (pyrrole-NTA).....	80
II.5.2 Etude de la réponse du biocapteur.....	83
II.5.2.1 Etude des étapes d'élaborations del'aptacapteur.....	83
II.5.2.2 Caractérisation de l'aptacapteur développé.....	84
II.5.2.3 Détermination de la quantité d'aptamère immobilisé.....	88
II.5.2.4 Optimisation des conditions expérimentale.....	90
II.5.2.5Détection du bisphénol A par spectroscopie d'impédance Electrochimique (EIS) et de voltamétrie à signaux carrés de potentiel (SWV).....	90
II.5.2.6. Spécificité du biocapteur.....	96
II.6 Conclusion du chapitre II.....	97
Références bibliographiques	
Partie B : Application de la propriété d'échange des cations de la bentonite naturelle à la détection des ions ammonium.	
II-Introduction.....	105
II.1 Procédures expérimentales.....	107
II.2 Elaboration du capteur.....	107
II.2.1 Protocole de la mise au point de la membrane.....	111
II.2.2. Mesures électrochimiques.....	111
II.3 Etude de la réponse du capteur.....	112
II.3.1 Etude des étapes d'élaborations du capteur.....	112
II.3.2 Détection des ions ammonium par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) et de voltamétrie cyclique.....	114
II.3.3 Evaluation de la réponse du capteur sans la matrice support.....	119
II.3.4 Comparaison entre les quatre systèmes.....	120
II.3.5 Etude de la durée de vie du capteur PVC-bentonite.....	121
II.4 Caractérisation de l'échange d'ammonium à l'interface bentonite / électrolyte.....	132
II.4.1 Caractérisation par spectroscopie infrarouge a transformée de fourrier (IRTF) Préparation des échantillons.....	122
II.4.2 Caractérisation par la diffraction des rayons X.....	124
II.4.3 Caractérisation par la microscopie électronique à balayage complétée par l'EDX.....	126
II.4.3.1 Sur les électrodes fonctionnalisées.....	126
II.4.3.2 Sur les poudres de la bentonite et la bentonite modifiée.....	128
II.5 Conclusion de la partie B.....	129
Références bibliographiques	

Partie C : Utilisation de la bentonite pour l'élaboration d'un biocapteur à glucose

II.1. Introduction.....	134
II.2 Propriétés des adsorbants d'affinité micro-composite Bentonite et bentonite-Cystéine.....	135
II.3. La glucose oxydase.....	136
II.4 La cystéine.....	137
II.5 Principe du biocapteur ampérométrique	138
II.5.1 Synthèse et caractérisation de la bentonite-modifiée (Bentonite-cystéine).....	138
II.5.1.1 Synthèse de la bentonite-cystéine	138
II.5.1.2 Propriétés des adsorbants d'affinité microcompositeBent-Cys.....	139
II.5.2 Caractérisation de la Bent-Cys par spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (IRTF).....	139
II.5.3 Immobilisation de la glucose oxydase.....	143
II.5.4 Electropolymérisation.....	143
II.5.5 Caractérisation du film déposé de la bentonite ou bentonite-cystéine.....	145
II.5.6 Mesure de la perméabilité	146
II.6 Application à la détection du glucose	148
II.6.1 Mesures électrochimiques	148
II.6.2 Réponses et courbes d'étalonnage des biocapteurs.....	148
II.6.2.1 Biocapteur Bentonite-GOx (Bent-GOx).....	148
II.6.2.2 Biocapteur Bentonite-Cystéine-GOx(Ben-Cys-GOx).....	149
II.7 Evaluation de l'efficacité du mode d'immobilisation.....	151
II.8 Stabilité des deux biocapteurs	153
II.9 Conclusion de la partie C.....	155
Références bibliographiques	
CONCLUSION GENERALE.....	161
Résumé	
Liste des publications et communications scientifiques	

Liste des figures

Chapitre I

Schéma I.1. Principe de fonctionnement des (bios) capteurs.....	7
Figure I.2 : Structure des acides nucléiques et de leurs bases.....	13
Figure I.3 : Appariement de l'adénine (A) avec la thymine (T) et de la guanine (G) avec la cytosine (C).Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés bleus....	14
Figure I.4 : Structure Double hélice droite (a) et gauche(b).....	14
Figure I.5 : Représentation schématique des principaux motifs structuraux. (a) : la tige boucle ; (b) : le pseudo-nœud ; (c) : Structure (gauche) et empilement (droite) des tétrades de G.....	15
Figure I.6 : Principe général du procédé d'identification des aptamères : Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX).....	18
Figure I.7 : Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.....	31
Figure I.8 : Représentation graphique de la linéarisation de Lineweaver-Burk.....	31
Schéma I.9 : Courbe typique obtenue pour des biocapteurs électrochimiques enzymatiques représentant l'évolution de l'intensité en fonction de la concentration en substrat.....	32
Fig. I.10: Représentation des couches tétraédrique, octaédrique et formation des feuillets.....	36
Fig. I-11 : Représentation schématique de la structure d'une argile de type TOT.....	40
Figure I.12: Modification hydrophobe dans l'espace intercouche de minéraux argileux pour immobiliser les enzymes par intercalation et adsorption (En fonction de la taille des cations organiques intercalés, la hauteur de la galerie varie entre ~ 2,0 et 7,0nm).....	51
Figure I.13: Immobilisation des enzymes sur les minéraux argileux par liaison hydrogène.....	52
Figure I.14. Surfaces et sites sur les minéraux argileux de type 2: 1 (a) et (b): sites hydrophobes et hydrophiles.....	52
Figure I.15 : L'activation des minéraux argileux pour immobiliser l'enzyme par la formation de liaison covalente.....	53

Chapitre II

► Partie A

- Figure II.1 : Bisphénol A ou BPA en formule semi-développée.....71
- Figure II.2 : Illustration du mécanisme de la synthèse de l'aptamère et de l'incorporation du tag histidine.....78
- Figure II.3 : Les différentes étapes d'élaboration du biocapteur. a. électro polymérisation du pyrrole-NTA sur une électrode de carbone vitreux par chronopotentiométrie, b. incubation de l'électrode modifiée dans une solution de CuCl_2 , c. Immobilisation de l'aptamère possédant un tag histidine *via* les ions cuivre, d'incubation de l'électrode fonctionnalisée avec l'aptamère dans une solution du polluant (BPA).....81
- Figure II.4 : Structure du monomère de pyrrole-NTA.....82
- Figure II.5 : Voltampérogramme d'une solution de pyrrole-NTA à $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans CH_3CN contenant LiClO_4 à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ acidifiée avec 3 équivalents de HClO_4 sur électrode de carbone vitreux ($\text{Ø}=3\text{mm}$). $v=0,1\text{V.s}^{-1}$82
- Figure II.6 : Voltampérogrammes cycliques de formation du poly (pyrrole-NTA). 10 cycles successifs dans une solution de pyrrole-NTA à $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans CH_3CN contenant LiClO_4 à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ acidifiée avec 3 équivalents HClO_4 sur électrode de carbone vitreux ($\text{Ø}=3\text{mm}$), $v=0,1\text{V.s}^{-1}$83
- Figure II-7 : Chronopotentiogramme obtenu lors de la polymérisation à $10\mu\text{A}$ pendant 18s dans une solution à $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans CH_3CN contenant LiClO_4 à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ acidifiée avec 3 équivalents de HClO_4 sur électrode de carbone vitreux ($\text{Ø}=3\text{mm}$).....84
- Figure II-8 : Voltampérométrie cyclique d'une électrode de carbone vitreux modifiée par un film de poly (pyrrole-NTA) dans CH_3CN contenant LiClO_4 à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Electrode de carbone vitreux ($\text{Ø} = 3\text{mm}$). $v = 0,1\text{V.s}^{-1}$85
- Figure II-9 : Voltampérogramme en régime stationnaire d'une électrode carbone vitreux modifiée avec un film de poly(pyrrole-NTA). Le film de poly (pyrrole-NTA) est formé par chronopotentiométrie ($Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $t = 18 \text{ s}$), Sonde redox : hydroquinone 1 mmol.L^{-1} dans du tampon phosphate $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7.4. Température 25°C , $v_b = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, $\Omega = 1000 \text{ tour.min}^{-1}$87
- Figure II-10 : Diagrammes de Nyquist obtenus pour différentes vitesses de rotation d'une électrode tournante de carbone vitreux ($\text{Ø} = 3 \text{ mm}$) à 500, 750 et 1000 tour.

min ⁻¹ .Le film de poly-(pyrrole-NTA) est formé par chronocoulométrie (Q = 2,5 mC.cm-2, t = 18 s). Gamme de fréquences 50 kHz à 0,1 Hz, Ec = 0,325 V vs. ECS, ΔE = 10 mVrms, Sonde redox : hydroquinone 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ dans du tampon phosphate 10 ⁻² mol/L, pH 7.4 Température 25 ° C.....	88
Figure II-11 : Circuit électrique équivalent de Randles.....	88
Figure II-12 : A – Evolution de la résistance de diffusion R _δ en fonction de l'inverse de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode (Ω ^{-1/2}) et B – évolution de τ ^{1/2} en fonction de Ω ^{-1/2}	90
Figure II-13 : Voltammogrammes cycliques d'hydroquinone (1mmol L ⁻¹) dans des solutions tampons phosphates de 10 ⁻² mole.L ⁻¹ , pH = 7,4. Jusqu'à un potentiel d'inversion de 0,65 V. Vitesse de balayage 100 mV s ⁻¹ . (a) Electrode modifié par le polymère ; (b) Après ancrage de l'aptamère et (c) Détection de 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de BPA. Référence : ECS.....	92
Figure II.14 : Voltampérogramme de l'hydroquinone 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ dans du tampon phosphate 10 ⁻² mol.L ⁻¹ .pH7, 4. Température 25°C sur une électrode de carbone vitreux (Ø : 3 mm) modifiée par un film de poly-(pyrrole-NTA). Vitesses de rotation de l'électrode Ω : 250, 500, 750, 1 000,1 250 et 1500 tour.min ⁻¹ , vb = 10 mV.s ⁻¹	93
Figure II.15 : Courbes de Koutecky-Levich obtenues à partir des voltampérogrammes réalisés entre 0 et 0,8 V vs.ECS, vb = 10 mV.s-1, d'une électrode tournante de carbone vitreux (Ø : 3 mm) sur laquelle un film de poly (pyrrole-NTA) a été électropolymérisé, fonctionnalisé avec l'aptamère puis incubé dans du BPA 10 ⁻⁶ M. Sonde redox : hydroquinone 10 ⁻³ mol.L ⁻¹ dans du tampon phosphate 10 ⁻² mol.L ⁻¹ pH7.4.Température 25°C.....	94
Figure II-16-A. Représentation schématique de l'immobilisation de [Ru ^{III} (NH ₃) ₆] ³⁺ à la surface de l'électrode modifié par l'aptamère afin de déterminer le recouvrement de la surface .B.voltampérométrie cyclique de l'électrode modifiée par l'aptamère enregistrée à une vitesse de balayage 50 mV. s ⁻¹ (a) sans et (b) après incubation de l'électrode dans une solution de tampon phosphate 10 ⁻¹ mol .L ⁻¹ contenant [Ru ^{III} (NH ₃) ₆] ³⁺ 10 ⁻² mol. L ⁻¹ et après le rinçage de l'électrode sous agitation .Electrode de référence : ECS.....	96
Figure II-17 Tracé des spectres Nyquist d'impédance obtenu à différentes concentrations de BPA sur l'électrode de poly pyrrole -NTA / Cu ⁺² / aptamère : (a) 0 ; (b) 10 ⁻¹¹ ; (c) 10 ⁻¹⁰ ; (d) 10 ⁻⁹ ; (e) 10 ⁻⁸ ; (f) 10 ⁻⁷ et (g) 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ . Des mesures	

d'impédance ont été réalisées à 0,325 V par rapport à SCE à l'aide d'hydroquinone 1 mmol. L^{-1} à $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de tampon phosphate, pH 7,4. L'électrode de référence : ECS .Expérimentale (points) et les données ajustées (lignes) sont présentées. Les trois points rouges sur un spectre, correspondent à 59,3 ; 7,7 et 0,25 Hz.....99

Figure II-18 : Courbe d'étalonnage du biocapteur à BPA correspondant aux variations de l'impédance de l'électrode lors de la détection de concentrations de BPA différentes (a) R_{tc} : résistance de transfert de charges obtenues par ajustement des données expérimentales ; $Z_{7,7 \text{ Hz}}$: Module de l'impédance obtenu à 7,7 Hz. Expérimental (points) et la régression linéaire (droites) sont présentées. Les conditions expérimentales sont identiques à la figure II-17.....101

Figure II-19: Voltampérométrie carrée (SWV) d'une solution d'hydroquinone $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ de tampon phosphate, pH 7.4 obtenue à différentes concentrations de BPA sur une électrode de polypyrrole -NTA / Cu^{+2} / aptamère : (a) 0 (b) 10^{-11} ; (c) 10^{-10} ; (d) 10^{-9} ; (e) 10^{-8} ; (f) 10^{-7} et (g) $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Les mesures SWV ont été effectuées jusqu'à un potentiel de 0,65V. Référence : ECS.....102

Figure II-20 : Courbe de calibration du biocapteur BPA, indiquant la variation des densités de courant en fonction de la concentration en BPA. Expérimental (points) et la régression linéaire (pointillés) sont présentées. Les conditions expérimentales sont identiques à la figure II.19.....103

Figure II.21 : Molécules sélectionnées lors de l'étude de la sélectivité.....105

Figure II-22 : Tracé des spectres de sélectivité obtenus sur l'électrode de poly pyrrole -NTA / Cu^{+2} : (a) Aptamère, (b) Ajout du DHB à $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ 106

► Partie B

Figure II-1 : Images MEB de la bentonite de Maghnia (Hamam boughrara).....118

Figure II-2 : Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier de la bentonite de Maghnia.....120

Figure II-3 : Analyse Thermogravimétrique de la bentonite de Maghnia.....120

Figure II.4: Vue latérale et vue frontale de la cellule électrochimique de mesure.....122

Figure II-5 : Voltamogrammes cycliques du couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (2 mmol L^{-1}) dans des solutions tampons phosphates de $10^{-1} \text{ mole.L}^{-1}$, pH = 7,2.) de -700 à +700

mV .Vitesse de balayage 25 mV.s ⁻¹ . (a) Electrode d'or nue ; (b) Electrode fonctionnalisée (bentonite-PVC).....	123
Figure II.6 Tracé des spectres Nyquist d'impédance sur l'électrode d'or. (a) Electrode d'or nue ; (b) Electrode fonctionnalisée (bentonite-PVC).Des mesures d'impédance ont été réalisées à -0,2 V dans 10 ⁻¹ mol L ⁻¹ de tampon phosphate, pH 7,2.....	124
Figure II-7 : Tracé des spectres Nyquist d'impédance obtenu à différentes concentrations de NH ₄ ⁺ sur l'électrode de bentonite-PVC : (a) 0 ; (b) 9.9X 10 ⁻¹¹ ; (c) 9 X 10 ⁻⁹ ; (d) 8.26 X 10 ⁻⁷ ; (e) 7.63 X 10 ⁻⁵ ; (f) 7.09 X 10 ⁻³ ; (g) 2.62 X 10 ⁻² ; (h) 2.07 x 10 ⁻¹ mol L ⁻¹ . Des mesures d'impédance ont été réalisées à -0,2 V par rapport à ECS dans une solution tampon phosphate de 10 ⁻¹ mole.L ⁻¹ , pH = 7,2. L'électrode de référence : ECS	125
Figure II-8. Diagramme de pourbaix de l'eau.....	126
Figure II-9. Circuit électrique équivalent modélisant les diagrammes de Nyquist...	127
Figure II-10 : Variation de la résistance de transfert de charge R _{tc} en fonction de Logarithme de la concentration en ammonium.....	129
Figure II-11 : Comparaison entre la courbe de calibration de l'électrode nue et l'électrode fonctionnalisée par la bentonite.....	130
Figure II.12.Courbes de calibration présentant la variation de la résistance de transfert de charge en fonction du logarithme de différentes concentrations d'ammonium.....	131
Figure II.13: Histogramme du pourcentage de R _{tc} en fonction du temps (en jours) pour une concentration en glucose de 8.26x10 ⁻⁷ mol.L ⁻¹ sur une électrode modifiée par la bentonite-PVC.....	132
Figure II-14 : Spectres IRTF de la bentonite de Maghnia.....	134
Figure II-15 : Spectres IRTF de la bentonite. (a) avant et (b) après ajout de NH ₄ ⁺	134
Figure II-16 : Spectres DRX de la bentonite après ajout de NH ₄ ⁺	135
Figure II-17 : Images MEB des surfaces des électrodes fonctionnalisées (PVC-bentonite) (A) avant (B) après l'ajout de l'ion ammonium.....	137
Figure II-18 : Spectres EDX des électrodes fonctionnalisées (PVC-bentonite) (A) avant et (B) après l'ajout des ions ammonium.....	138
Figure II-19: Images MEB de particules de la bentonite, (A) avant et (B) après échange avec les ions ammonium.....	139

Figure II-20 : Spectre EDX de particules de la bentonite, (A) avant et (B) après échange avec l'ammonium.....140

► Partie C

Figure II.1 Structure développée de la cystéine.....149

Figure II.2 : Spectre IR de la Bentonite de Maghnia.....152

Figure II.3 Spectre IR : bentonite et bentonite-Cystéine.....153

Figure II.4 Spectre IR (400-1800 cm^{-1}) : Bentonite et bentonite-cystéine.....153

Figure II.5 : Voltamogrammes cycliques d'hydroquinone (2mmol L^{-1}) dans du tampon phosphate ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 7$). Vitesse de balayage 100 mV s^{-1} . (a) Electrode de platine nue ; (b) Après dépôt de la bentonite. Référence : ECS.....155

Figure II.6: Principe de polymérisation du pyrrole.....156

Figure II.7 : Courbe de voltammétrie cyclique (30 cycles) du pyrrole dans $0,1\text{ mol.L}^{-1}$ LiClO_4 sur électrode de platine ($\text{Ø} = 5\text{ mm}$) à $v = 0,1\text{ V.s}^{-1}$. Pour plus de clarté, seuls les cycles pairs sont représentés ici.....157

Figure II.8 : A- Voltampérogrammes de l'hydroquinone ($2.10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$) dans du tampon phosphate ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 7$) sur électrode tournante de carbone vitreux ($\text{Ø} = 5\text{ mm}$) modifiée par un film de polymère –bent-cys avec $Q = 0,507\text{ mC}$. Vitesses de rotation de l'électrode : $250 \leq \Omega \leq 2000\text{ rpm}$. B-Courbe de Koutecky-Levich représentant $1/I_{lim}$ en fonction de $1/\Omega^{1/2}$159

Figure II.9 : A-Voltampérogrammes de l'hydroquinone ($2.10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$) dans du tampon phosphate ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 7$) sur électrode tournante de carbone vitreux ($\text{Ø} = 5\text{ mm}$) modifiée par un film de polymère-bentonite avec $Q = 0,507\text{ mC}$. Vitesses de rotation de l'électrode : $250 \leq \Omega \leq 1250\text{ rpm}$. B-Courbe de Koutecky-Levich représentant $1/I_{lim}$ en fonction de $1/\Omega^{1/2}$. B-Courbe de Koutecky-Levich représentant $1/I_{lim}$ en fonction de $1/\Omega^{1/2}$159

Figure II.10: Courbe d'étalonnage du biocapteur à base de GOx, obtenues avec l'électrode de platine ($\text{Ø} = 5\text{ mm}$) modifiée Ben-GOx dans du tampon phosphate ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$, $T = 25\text{ °C}$) à $E = 0,7\text{ V}$ vs ECS, suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.....161

Figure II.11: Courbe d'étalonnage du biocapteur à base de GOx, obtenues avec l'électrode de platine ($\text{Ø} = 5\text{ mm}$) modifiée Ben-Cys-GOx dans du tampon phosphate ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$,

T = 25 °C) à E = 0,7 V vs ECS, suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.....	162
Figure II.12 Comparaison des deux courbes de calibration des biocapteurs bentonite et bentonite-Cystéine à base de GOx.....	163
Figure II.13 : Courbe d'étalonnage du biocapteur à base de GOx en fonction du temps, obtenues avec l'électrode de platine ($\varnothing = 5$ mm) modifiée Ben-GOx dans du tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH = 7, T = 25 °C) à E = 0,7 V vs ECS, suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique aux jours 1, 2,4 et 6.....	166
Figure II.14 : Stabilité à long terme du biocapteur et variation en pourcentage de l'intensité limite en fonction du temps (en jours) sur une électrode de platine modifiée par la bentonite-cystéine-GOx.....	167

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I.1 Valeurs de la surface spécifique de certaines argiles.....	41
Tableau I.2 Capacité d'échange cationique (CEC) de certaines argiles.....	42
Tableau I.3 : Différents types de transducteurs.....	55

Chapitre II

Partie A

Tableau II.1 : Electropolymérisation du pyrrole-NTA sur 8 électrodes et calculs du rendement de polymérisation.....	86
Tableau II-2 : Valeurs issues de l'ajustement des données avec par le circuit équivalent de Randles choisi. R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{tc} : résistance de transfert de charge, C_{DC} : capacité de double couche, f^0 : fréquence du point se trouvant au sommet du premier demi-cercle, n : exposant CPE caractéristique du décentrage du premier demi-cercle par rapport à l'axe des réels, R_{δ} : résistance de la diffusion de l'hydroquinone, τ_{δ} : constante de temps de la diffusion de l'hydroquinone, n_{δ} : angle de Warburg	89
Tableau II.3 : Valeurs de perméabilité P_m obtenues pour les différents états de modification du film de poly-(pyrrole-NTA).....	95
Tableau II-4 : valeurs des éléments du circuit équivalent (R_{tc} , C_{DC} , n et R_{diff}) obtenues pour le montage des données expérimentales qui correspondent aux variations de l'impédance de l'électrode modifiée par l'aptamère lors de la détection de différentes concentrations de BPA.....	100
Tableau 5 : Publications récentes relatives aux aptacapteurs à BPA.....	104

Partie B

Tableau II-1 : Composition chimique de la bentonite (FRX).....	119
Tableau II-2 : valeurs des éléments du circuit équivalent (R_s , R_{tc} , C_{DC} et n) obtenues pour le montage des données expérimentales qui correspondent aux variations de l'impédance de l'électrode modifiée par la bentonite/PVC lors de la détection de différentes concentrations de NH_4^+	128

Partie C

Tableau II.1 Les vibrations IR de la bentonite.....	151
Tableau II.2 Récapitulatif des résultats obtenus.....	164

Tableau II.3 : Comparaison des performances analytiques des biocapteurs de glucose.....	166
---	-----

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag⁺/Ag : électrode de référence en solution organique avec $[Ag^+] = [NO_3^-] = 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$.

BPA : Bisphénol A

Bent : Bentonite

Cys : Cystéine

CV : voltampérométrie cyclique

CPE : élément à phase constante

d.d.p. : différence de potentiel

DNP : dinonyl-phthalate.

ECS : électrode de référence en solution aqueuse (électrode au calomel saturée).

F : constante de Faraday (1 faraday = 96 485,3415 C).

FAD : flavine adénine dinucléotide

GOx : enzyme glucose oxydase.

GC Électrode de carbone vitreux.

His : histidines.

HClO₄ : acide perchlorique.

IR Infrarouge

J_{max} : courant de saturation.

K_M : constante de Michaelis-Menten.

K_M^{app} : constante apparente de Michaelis-Menten.

LiClO₄ : lithium perchlorate.

MEB : microscopie électronique à balayage.

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide.

NHS : N-hydroxysuccinimide.

NTA : acide nitrilotriacétique.

Ω: vitesse de rotation de l'électrode tournante.

P_m : coefficient de perméabilité d'une membrane

PVC : chlorure de polyvinyle.

Q : charge.

SWV : voltamétrie à signaux carrés de potentiel.

UA : unités arbitraires.

η : rendement.

Ø : diamètre.

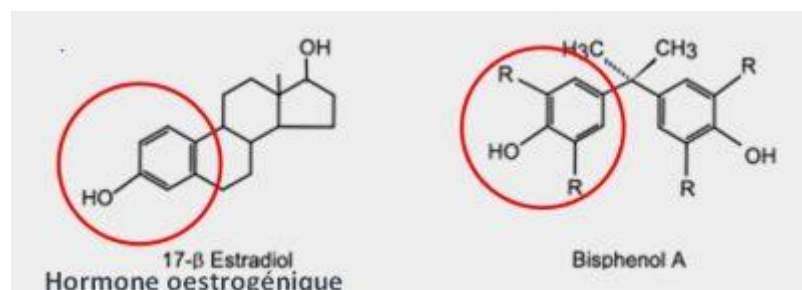
v : vitesses de réactions.

v_b : vitesse de balayage en tension

Introduction générale

L'humanité n'a pas toujours pris en compte les implications écologiques de ses actions, mais la dégradation progressive de l'environnement et son impact sur la santé humaine sont des signaux d'alerte importants. La pollution de l'eau est l'une des menaces écologiques les plus graves auxquelles on est confronté aujourd'hui.—L'industrie du plastique a complètement transformé la vie de la société moderne, elle l'a simplifiée et même améliorée. L'ère du plastique a permis la naissance et le succès de nombreuses industries. La production mondiale de plastique a atteint environ 320 millions de tonnes par an ^[1]. Chaque année, une partie non négligeable de ce plastique est perdue et se retrouve dans l'environnement. En 2025, les océans pourraient regorger d'environ 250 millions de tonnes de déchets plastiques. Les microplastiques sont des particules microscopiques de plastiques qui polluent l'environnement. Ils sont principalement retrouvés dans les océans et les mers, ensuite ils sédimentent ou sont réingérés par les animaux aquatiques.

Ces micro-organismes ont une surface hydrophobe qui peut adsorber et concentrer divers contaminants tels que les hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAHs), les pesticides organochlorés, les biphényles polychlorés, les métaux lourds (nickel, zinc, cadmium). Ces contaminants peuvent ensuite être transférés à la chaîne alimentaire animale puis humaine. Le transfert éventuel de ces polluants par les microplastiques soulève des interrogations. Le plastique renferme également des additifs comme le bisphénol A et les phtalates. Le bisphénol A est identifié dans la chaîne alimentaire humaine. Le principal effet mis en cause est l'effet de perturbateur endocrinien. Le BPA mime les effets des œstrogènes en se fixant à leur récepteurs alpha et bêta. On peut en effet observer les ressemblances de structures entre l'œstrogène et le BPA (Figure suivante).



Une autre cause des plus polluantes étant les rejets, les déchets industriels et les eaux usées urbaines. Ces déchets peuvent entraîner une augmentation massive de l'azote dans l'environnement et en particulier dans l'eau. L'ammonium dans l'eau traduit habituellement un processus de dégradation incomplet de la matière organique. L'ammonium provient de la réaction des minéraux contenant du fer avec des nitrates. C'est donc un excellent indicateur de la pollution de l'eau par des rejets organiques d'origine agricole, domestique ou industriel.

Les nouvelles méthodes de détection de pointe pour la détection des polluants, sont rapides, sensibles, peu coûteuses et adaptées au contrôle sur site. Elles sont basées sur les performances des capteurs chimiques et des biocapteurs. Depuis 1962, date de création du premier biocapteur, ces outils d'analyse ont connu un développement important. Les capteurs chimiques sont une classe majeure de capteurs, qui ont de nombreuses applications, telles que l'analyse environnementale et alimentaire, les processus de contrôle et de diagnostic médical. Un capteur chimique est un dispositif qui transforme l'information chimique en un signal analytiquement utile ^[2].

Les biocapteurs à ADN ont, depuis une vingtaine d'année, jouer un grand rôle dans la détection des molécules cibles dans de nombreux domaines grâce aux propriétés de reconnaissance de l'ADN. Les biocapteurs basés sur les oligonucléotides artificiels, les aptamères, comme éléments de reconnaissance sont appelés aptasenseurs.

Ces aptasenseurs ont trouvé des applications importantes dans la sécurité alimentaire, dans la détection rapide des toxines et des contaminants, tels que les antibiotiques, les pesticides, les mycotoxines, les métaux lourds, le bisphénol A et les adjuvants tels que les colorants alimentaires illégaux ^[3].

Les argiles cationiques sont parmi les minéraux les plus communs sur la surface de la terre. Elles ont été utilisées pendant des siècles pour produire de la céramique. De plus, elles trouvent des applications en pharmacie, cosmétiques, catalyseurs, adsorbants et échangeurs d'ions. Ces dernières applications sont particulièrement utiles pour le développement des capteurs électrochimiques. Les électrodes modifiées à l'argile sont des argiles smectites. Elles peuvent servir en tant que matrices pour les ions électroactifs, car elles sont généralement capables d'incorporer des ions par le processus d'échange d'ions. De plus, l'adsorption des enzymes sur les surfaces minérales argileuses joue un rôle très important non seulement dans les domaines liés à l'agriculture ou l'environnement, mais aussi dans le développement des biocapteurs.

Dans ce contexte, le but de ce travail réalisé est de mieux comprendre et à optimiser le fonctionnement de trois (bios) capteurs électrochimiques en vue de la détection d'analytes comme le BPA, les ions ammonium et le glucose avec une faible limite de détection mais une sensibilité et une sélectivité élevées en même temps.

Ce manuscrit comprend deux chapitres:

Le premier chapitre est consacré aux principes essentiels et aux progrès récents des biocapteurs électrochimiques. Dans ce chapitre, on présente d'abord les éléments de base des (bios) capteurs électrochimiques et différents modes de détection. Après cela, les applications des aptamères et des enzymes dans l'élaboration des biocapteurs électrochimiques. Enfin, une approche originale pour l'utilisation des argiles comme capteur électrochimique et aussi son rôle dans l'amélioration de l'immobilisation des biorécepteurs pour la conception des biocapteurs est proposée.

Le deuxième chapitre de ce mémoire est divisé en trois parties :

La première partie concerne le travail sur un aptacapteur électrochimique pour la détection du bisphénol A (BPA), développé par électropolymérisation du pyrrole-NTA avec l'ancrage par interactions affines du système NTA-Cu⁺² / Histidine pour immobiliser l'aptamère sur l'électrode de travail. Ce format de biocapteur pourrait être un outil prometteur pour une surveillance environnementale simple, peu coûteuse et sans réactif sur site.

La deuxième partie sera consacrée à l'utilisation des argiles de type smectites (bentonite) pour l'élaboration d'un capteur chimique utilisé pour la détection des ions ammonium dans l'eau. La bentonite de Maghnia (Algérie) dispersée dans une matrice de PVC-DNP est utilisée comme élément de reconnaissance. L'intérêt accordé aux argiles se justifie par leur porosité, leur biocompatibilité et leur capacité d'échange cationique.

Le but de la partie C du chapitre II, est une présentation comparative des différents types de biocapteurs ampérométriques avec l'immobilisation d'enzymes dans des matériaux inorganiques. La glucose oxydase est immobilisée dans la bentonite pour la détection du glucose. La capacité d'échange cationique est favorable à la chimisorption d'une grande variété d'enzymes, ce qui leur permet de conserver les propriétés structurales et biologiques. Les argiles s'avèrent donc être de très bonnes matrices d'immobilisation d'enzymes. Dans un premier temps, les propriétés et la caractérisation électrochimique de ce biocapteur sont présentés. Dans une seconde partie, l'immobilisation de l'enzyme GOx a été modifiée. La présence de la molécule cystéine au sein de la bentonite est abordée. Et

pour finir et dans le but de mettre au point le biocapteur bentonite-cystéine-GOx, l'activité enzymatique de la GOx immobilisée dans la bentonite-cystéine et déposée sur la surface de l'électrode sera évaluée.

- [1] Wright SL, Kelly FJ. Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environ Sci Technol.* 2017 Jun 20;51(12):6634-6647.

- [2] K. Cammann, B. Ross, A. Katerkamp, J. Reinbold, B. Grundig, R. Renneberg, Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2012, pp. 109–221.

- [3] McKeague M, Giamberardino A and DeRosa MC. *Environmental Biosensors*, INTECH, 2011.

- [4] Gianfreda, L., Rao, M.A., Sannino, F., Saccomandi, F., Violante, A., 2002. *Dev. Soil Sci.* 28B, 301– 327.

Chapitre I

Etude bibliographique

I. Les (bios) capteurs chimiques.

I.1 Introduction

Les capteurs sont aujourd'hui primordiaux du fait de leurs vastes applications. La technologie des capteurs a été déterminante dans la dernière innovation de la microélectronique. Les dispositifs des capteurs ont des applications dans divers domaines d'analyse, biomédical, bio-défense, alimentation, agriculture et environnement ^[1-2-3]. Les capteurs chimiques sont des dispositifs qui convertissent la concentration des composés cibles en un signal "analytique" qui implique le concept de mesurabilité. Ensuite, ils convertissent l'information sur la présence de composés cibles en une quantité mesurable. Actuellement, l'électronique est la technologie qui permet non seulement la mesure, mais aussi l'utilisation efficace de l'information acquise. Les propriétés électriques en phase aqueuse, leur permettent de détecter les espèces ioniques et moléculaires en solution d'où l'existence de plusieurs modes de détection tous basés sur les propriétés électriques de ces espèces.

I.1 Définition

Un « capteur chimique » est un dispositif qui transforme l'information chimique, allant de la concentration des composants spécifiques aux propriétés des échantillons, en un signal analytiquement utile. Un capteur chimique habituellement contient deux composants de base connectés en série: un système de reconnaissance moléculaire (récepteur) et un transducteur physico-chimique. Les capteurs dont le système de reconnaissance est basé sur des mécanismes biochimiques ou biologiques sont définis comme des biocapteurs ^[4].

I.2 Structure et fonctionnement d'un capteur

Le capteur est composé de trois éléments principaux :

- le récepteur, capable de reconnaître un analyte particulier, est directement mis en contact avec l'analyte pour assurer sa reconnaissance (signal d'entrée). Cette reconnaissance peut être catalytique, ou par affinité. L'analyte est la cible ou l'espèce que l'on souhaite détecter ou quantifier de nature variée. L'immobilisation du récepteur à la surface de la couche sensible est rendue possible par des procédés physiques ou chimiques. La couche sensible peut aussi jouer le rôle de récepteur

principalement dans le cadre de la détection d'espèces chimiques. Dans ce cas, il se produit une adsorption entre la couche sensible et l'analyte.

- Le transducteur transforme l'interaction entre l'analyte et le récepteur en signal électrique exploitable (événement de reconnaissance moléculaire). La transduction peut s'opérer de différentes façons. Les modes de transduction les plus couramment utilisés se font par voies optique, mécaniqueélectrochimique, magnétique ou thermique.Cette adéquationentre letransducteur et l'élément biologique permettra d'obtenir un signal sensible, facilement exploitable et avec un minimum de bruit de fond.
- Le conditionneur, qui peut assurer des rôles d'amplification, d'acquisition et de traitement du signal, pour le transformer en une information dans un format approprié pour l'utilisateur.

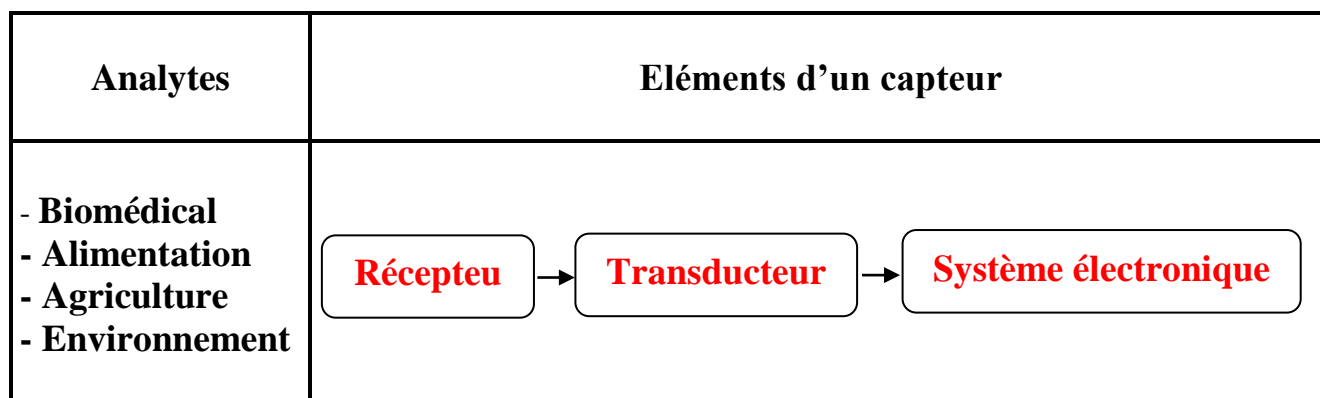


Schéma I.1. Principe de fonctionnement des (bios) capteurs

I.3 Caractéristiques métrologiques d'un capteur.

Les performances d'un capteur chimique ou biologique, sont évaluées sur la base de quelques critères déterminants : «le critère des 3S» ^[5].

L'amélioration de la sensibilité et de la sélectivité des capteurs ont toujours été d'un intérêt primordial.

- **La sensibilité** : est directement liée à la variation des caractéristiques électriques ou optiques du capteur suite à l'interaction de la molécule cible avec le récepteur. Une sensibilité élevée implique la détection de faibles variations et réduit ainsi les limites de détection de la plus infime quantité de l'analyte. Soient X le signal de sortie d'un capteur et Y la quantité de l'espèce à analyser.

L'expression de la sensibilité du capteur est donnée par l'équation suivante :

$$S = \frac{\partial X}{\partial Y}$$

- **La sélectivité** : il s'agit de l'aptitude du capteur à reconnaître l'analyte et à interagir avec la cible en présence de plusieurs autres molécules. Une méthode est sélective lorsque la réponse de l'analyte peut être différenciée de chaque autre réponse. Dans ce cas, la méthode est complètement capable de quantifier avec précision un analyte en présence des interférents, et seul l'analyte d'intérêt contribuera au signal mesuré.
- **La stabilité dans le temps** : c'est la performance que possède un capteur et qui lui permet d'assurer la fiabilité des mesures sur une longue durée. La répétabilité et la reproductibilité se réfèrent à la proximité de l'accord entre les résultats de mesures successives de la même mesure réalisées dans les mêmes conditions (répétabilité) ou différentes (reproductibilité).

II. Les biocapteurs

La communauté scientifique n'a cessé d'accroître ses efforts dans le domaine de la détection analytique et le développement des biocapteurs depuis plus de 50 ans. Le premier biocapteur fut développé par Clark et Lyons en 1962 en combinant l'électrode de Clark (détection O₂) et la glucose oxydase (GOx) pour la détection du glucose dans le sang ^[6]. En 1967, le premier biocapteur contenant la GOx piégée dans un gel polymérisé est élaboré par Updike et Hicks ^[7] et va être un point de démarrage important au développement des biocapteurs électrochimiques du fait de sa commercialisation.

Le premier biocapteur potentiométrique pour la détection de l'urée est décrit en 1969 par Guilbault et Montalvo ^[8]. Mais ce n'est qu'en 1975 que le premier biocapteur à glucose basé sur la détection ampérométrique du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), fut commercialisé par la société Yellow Springs Instrument (Ohio, Amérique). Depuis ces premières ébauches, les biocapteurs ne cessent de susciter l'intérêt des chercheurs et le nombre de travaux concernant ces outils de détection n'a ensuite cessé d'augmenter.

II.1 Définition d'un biocapteur

Par définition, le biocapteur est un dispositif d'analyses conçu pour transformer une réponse biologique en un signal électrique. Il possède deux parties récepteur-transducteur

intégrés capables de fournir une information analytique quantitative ou semi-quantitative sélective. Ce dispositif est basé sur l'accouplement d'un composé biologiquement actif immobilisé, appelé « biorécepteur » en utilisant un élément de reconnaissance biologique (anticorps, enzyme, acide nucléique, etc) avec un transducteur qui agit en tant que détecteur et un amplificateur électronique. Spécifiquement conçus pour un but, les biocapteurs sont hautement sélectifs et offrent la possibilité de mesures en ligne et en temps réel pour la bioanalyse et le contrôle des bioprocédés.

II.2 Classification des biocapteurs selon la nature de biorécepteur

Le biorecepteur est l'élément de reconnaissance du biocapteur. Il joue un rôle crucial dans la performance globale du biocapteur et la sélectivité vis-à-vis d'un analyte particulier. La reconnaissance moléculaire est essentielle à la biosensibilité. Initialement, les biorécepteurs ont été obtenus à partir des systèmes vivants. Cependant, ils sont synthétiques et ont été préparés en laboratoire. Les éléments de reconnaissance actuellement utilisés dans l'élaboration des capteurs électrochimiques pour des biomolécules cliniquement pertinentes comprennent des anticorps, des fragments d'anticorps, des enzymes, des récepteurs, des lectines, des cellules entières, des peptides / protéines, les acides nucléiques, les aptamères, les acides nucléiques peptidiques et les polymères à empreintes moléculaires. Certaines autorités subdivisent les biocapteurs en biocapteurs d'affinité et en biocapteurs catalytiques, en fonction de l'activité de l'élément de bio-reconnaissance. Ainsi, les biocapteurs d'affinité ont pour propriété fondamentale la reconnaissance entre une molécule greffée sur le transducteur appelée espèce «sonde» et une molécule présente dans l'échantillon à analyser qui est l'espèce «cible» (par exemple anticorps-antigène). Les modifications physico-chimiques pouvant être transformées en signal par différentes méthodes selon le type de transduction utilisé. Les biocapteurs catalytiques ont comme élément de bio-reconnaissance des enzymes ou des bactéries qui non seulement lient l'analyte mais la détection se fait par transfert de charge électronique lors du phénomène d'oxydoréduction (par exemple des biocapteurs de glucose).

III. Les aptamères

Les aptamères sont des ligands d'acide nucléique qui sont isolés à partir de banques d'oligonucléotides par un processus de sélection in vitro appelé évolution systématique des ligands par enrichissement exponentiel (SELEX) ^[9-10]. Contrairement aux appariements

d'acides nucléiques, les aptamères peuvent se replier pour former des structures tridimensionnelles en raison de leurs propriétés d'auto-hybridation. La sélectivité et l'affinité de la liaison des aptamères peuvent être similaires à celles des anticorps correspondants. Cependant, la sélectivité ^[11-12] et l'affinité de la liaison ^[13] des aptamères peuvent être adaptées au cours du processus de sélection. Un autre avantage des aptamères par rapport aux anticorps est qu'ils sont intrinsèquement stables, de sorte qu'ils peuvent être soumis à de nombreux cycles de dénaturation et de renaturation, permettant ainsi une régénération facile de la surface du capteur. Les aptamères sont produits par synthèse chimique après sélection et séquençage, et peuvent donc être facilement modifiés pour améliorer leur affinité et leur stabilité. Une variété de capteurs à base d'aptamères électrochimiques (aptasensors) a été élaborée pour détecter une pléthore d'analytes allant des petites molécules ^[14], aux macro-organismes ^[15-18] et les cellules ^[19-20]. De nombreux aptasensors de signalisation ON, repose sur la formation d'une couche de sonde aptamère marquée par redox et partiellement dépliée sur la surface de l'électrode. Lors de la liaison à la cible, la sonde forme une structure "proche" ^[21] ou une "jonction à trois voies", ^[22-23] amenant ainsi l'étiquette redox à proximité de la surface de l'électrode et en augmentant ensuite le courant redox. Les aptamères catalytiques appelés aptazymes (RNAzymes et DNAzymes) sont des aptamères qui convertissent la reconnaissance des analytes cibles en signaux générés catalytiquement. Les DNAzymes peuvent être facilement conçues pour détecter de nombreuses classes de molécules biologiques. En outre, les DNAzymes peuvent être dénaturés à plusieurs reprises sans perdre leurs propriétés catalytiques ou de liaison ^[24-26].

III.1 Aptamères - une alternative aux anticorps?

Parmi les méthodes d'analyse, les biocapteurs sont d'un grand intérêt en raison de leur sensibilité élevée, la miniaturisation et le faible coût ^[27]. De nombreux dispositifs utilisant enzymes ^[28-32] ou anticorps ^[29-31] ont été conçus pour la détection du bisphénol A en développant des stratégies originales pour immobiliser des biomolécules à la surface du transducteur. Dans certains documents, ils ont utilisés des matériaux de pointe tels que les nanotubes de carbone à paroi multi-graphène, des polymères ou des nanoparticules d'or pour améliorer la sensibilité et la limite de détection. D'autre part, les aptacapteurs ^[32-37] basée sur l'utilisation des acides nucléiques ADN ou ARN synthétisés par la méthode évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX) ^[38-40] ont reçu

ces dernières années, un grand intérêt. Les aptamères sont aujourd'hui une alternative pertinente aux anticorps pour un grand nombre d'applications dans les domaines diagnostique, analytique et thérapeutique. Cependant, les aptamères possèdent des avantages par rapport aux anticorps :

- * Contrairement aux anticorps, les aptamères sont synthétisés chimiquement par un procédé *in-vitro* qui ne dépend pas des animaux, des cellules, ou même des conditions *in-vivo*. De ce fait, ils peuvent être générés contre tous types de cibles ou de molécules qui n'engendrent pas de réponse immunitaire (protéines, peptides, acides nucléiques, petites molécules chimiques, toxines, cellules, virus). En raison de leur petite taille, les aptamères peuvent pénétrer dans les cellules et les tissus plus efficacement que les anticorps ^[41].
- * Les aptamères présentent des propriétés de reconnaissance et de spécificité, liées à leur capacité à adopter des structures tridimensionnelles particulières avec des affinités de l'ordre du nanomolaire. Ils présentent des avantages considérables de synthèse et de conservation. Des modifications chimiques sont facilement introduites au sein de la séquence ou aux extrémités des aptamères afin de les transformer en outil biotechnologique (sondes, balises moléculaires). La taille plus réduite des aptamères, qui représente environ un dixième de celle des anticorps ^[42], permet un greffage plus dense sur un support.
- * Une fois la séquence identifiée par la méthode SELEX, l'aptamère est synthétisé chimiquement. C'est donc un mode de synthèse peu coûteux et entraînant peu de variation lot à lot. De plus, il est possible d'introduire des modifications lors de leur synthèse pour améliorer la stabilité, la spécificité, l'immobilisation ou la détection du dispositif final lors de leur utilisation en bioessais. Il en résulte que les propriétés des aptamères peuvent être modifiées à la demande suite à la modification des étapes critiques de la synthèse conçue pour sélectionner par exemple des aptamères de structure de commutation pour les petites molécules ^[43]. Les anticorps protéiques sont facilement dénaturés par la température ou par un solvant organique. En revanche, les aptamères sont beaucoup plus stables à la chaleur, et ils conservent leurs structures au cours des cycles répétés de dénaturation / rénaturation.

Ils retrouvent leur conformation active au bout de quelques minutes après dénaturation ^[44]. Lors de l'appariement d'un aptamère avec la cible, un changement conformationnel s'opère. Ce phénomène a été exploité pour le développement de nouvelles

méthodes bioanalytiques dont la détection est basée sur ce changement conformationnel [42].

III.2 Contexte théorique : aptamères

La synthèse des aptamères a commencé dans les années 90 par trois groupes de chercheurs [45-47]. Le nom aptamère donné par A. Ellington et J. Szostak [46], est tiré du mot latin **aptus** qui signifie « approprié à ou se lie à » et du grec *meros* (unité de base d'un polymère), désignant ainsi un polymère spécifique d'une cible. La procédure de sélection *SELEX* (Evolution Systématique de Ligands par Enrichissement Exponentiel) a été nommée par C. Tuerk et L. Gold [47]. Dans un premier temps, on fait un bref rappel sur l'acide nucléique car l'aptamère étant une molécule d'ADN ou d'ARN. Ensuite on définit ce qu'est un aptamère et la méthode utilisée pour l'obtenir: la méthode SELEX puis, on discutera sur leurs applications car le développement de ces biosenseurs fait l'objet de beaucoup de recherches [48-51].

III.3 Structure des aptamères

III.3.1 La structure primaire

Les acides nucléiques sont des macromolécules dont le nucléotide est l'élément de base tel que l'ADN ou l'ARN. Chaque nucléotide est constitué d'un groupement phosphate (ou acide phosphorique) lié à un sucre dont les atomes de carbone sont numérotés de 1' à 5' (le 2-désoxyribose pour l'ADN et le ribose pour l'ARN) lui-même lié à une base azotée par un atome d'azote au carbone 1' du sucre. Ces bases sont : l'adénine (notée A), la cytosine (notée C), la guanine (notée G), la thymine (T) est spécifique de l'ADN et l'uracile (U) de l'ARN. Les nucléotides sont liés les uns aux autres par des groupes phosphate, par l'intermédiaire de liaisons phosphodiester au niveau des carbones 3' et 5' du sucre [52].

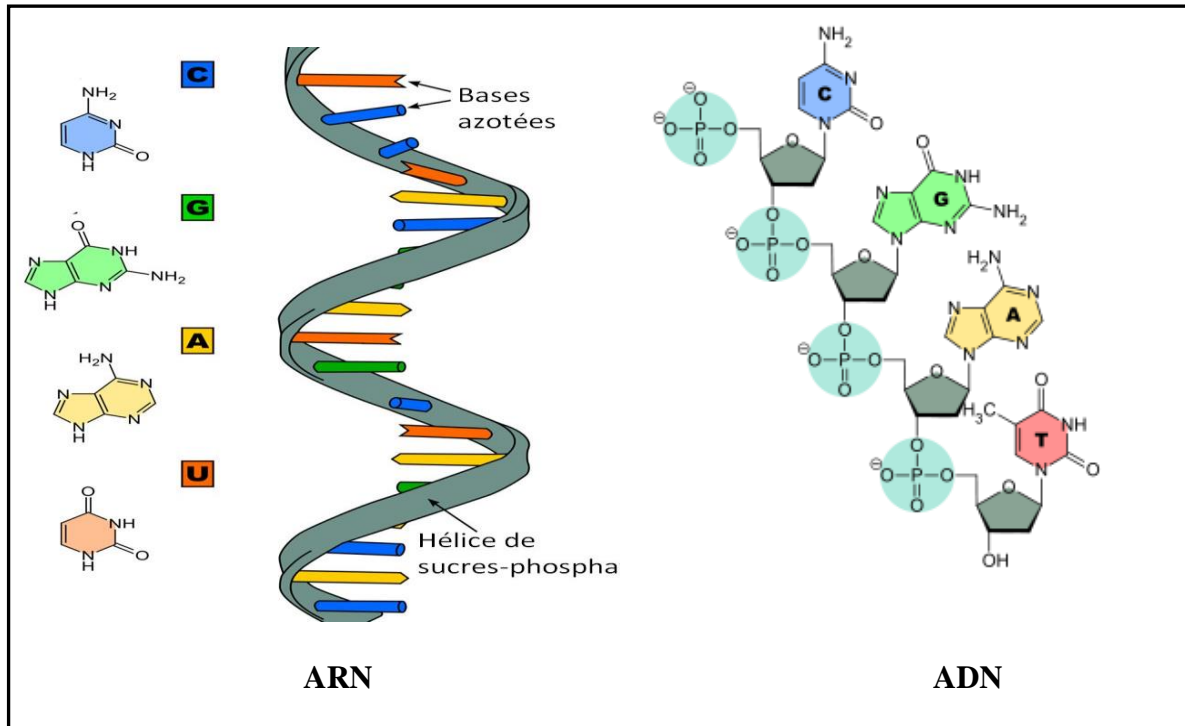


Figure I.2 : Structure des acides nucléiques et de leurs bases ^[52].

III.3.2 La structure secondaire et tertiaire

La structure secondaire est définie par les liaisons hydrogène entre les bases nucléiques. L'ADN est constitué de 2 brins d'acides nucléiques. Les bases des acides nucléiques s'apparient grâce à des liaisons d'hydrogène. Il se forme 3 liaisons hydrogène entre C et G et 2 entre A et T(U).

Les bases appariées sont complémentaires (A / T) et (G / C) et sont à l'intérieur du cylindre central de l'hélice. La stabilisation est principalement due aux interactions d'empilement des hétérocycles des bases azotées ^[53].

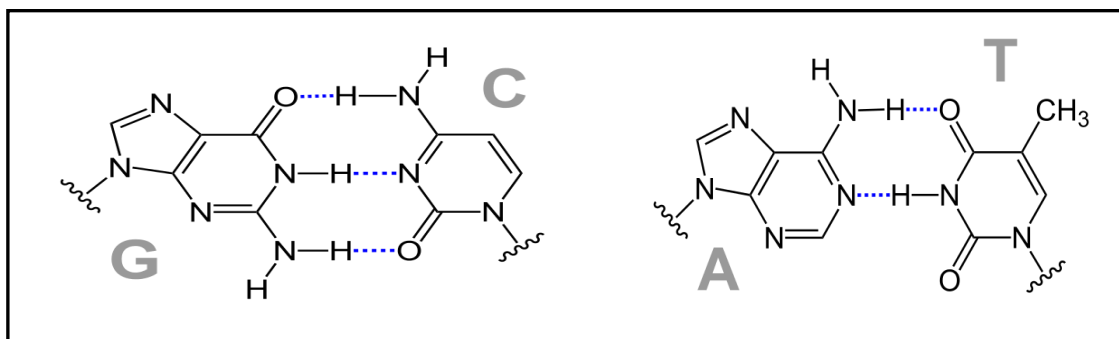


Figure I.3 : Appariement de l'adénine (A) avec la thymine (T) et de la guanine (G) avec la cytosine (C). Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés bleus ^[52].

La structure des bases d'acide nucléique et la directionnalité des interactions de type liaison hydrogène font que l'association de deux bases se fait dans un même plan. Cet appariement canonique s'appelle également appariement Watson-Crick, du nom des 2 biologistes (James Dewey Watson et Francis Crick) lauréats du prix Nobel en 1962 pour la découverte de la structure en double hélice de l'ADN. Les deux brins (plus souvent retrouvés dans l'ADN, rares dans l'ARN) prennent la forme d'une double hélice (structure hélicoïdale). Une double hélice est formée de deux chaînes antiparallèles d'ADN qui s'enroulent soit à droite (sens de la tire bouchon ou sens des aiguilles d'une montre) soit à gauche. Cette structure souple est idéale pour permettre aux protéines telles que les polymérases, les primases et les ligases, de dupliquer l'ADN.

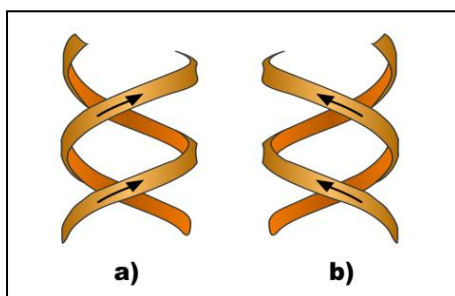


Figure I.4 : Structure Double hélice droite (a) et gauche (b)^[52].

La structure secondaire d'un ARN est la description de l'ensemble des appariements internes au sein d'une molécule simple brin. Cet ensemble d'appariements induit une topologie particulière, Le repliement d'un brin sur lui-même pour former le double hélice, forme une structure en « épingle à cheveu », ou « tige-boucle »^[54]. (Figure 4-a). Des structures très compactes de type « pseudo-nœud » peuvent également se former par interaction complémentaire entre une tige boucle et une portion simple brin. Elles sont plus fréquemment rencontrées dans les aptamères ARN^[55]. (Figure 4-b). Quatre guanines des acides nucléiques (ADN ou ARN riches en résidus de guanine) peuvent s'associer dans un même plan grâce à des liaisons hydrogènes via des appariements de type Hoogsteen^[56] (Figure 4-c), pour former quatre nucléotides guanine (G-quartet). Un quadruplex est ainsi constitué d'une ou plusieurs tétrades de G successives. Les tétrades de G sont plus fréquemment rencontrées dans les aptamères ADN^[55].

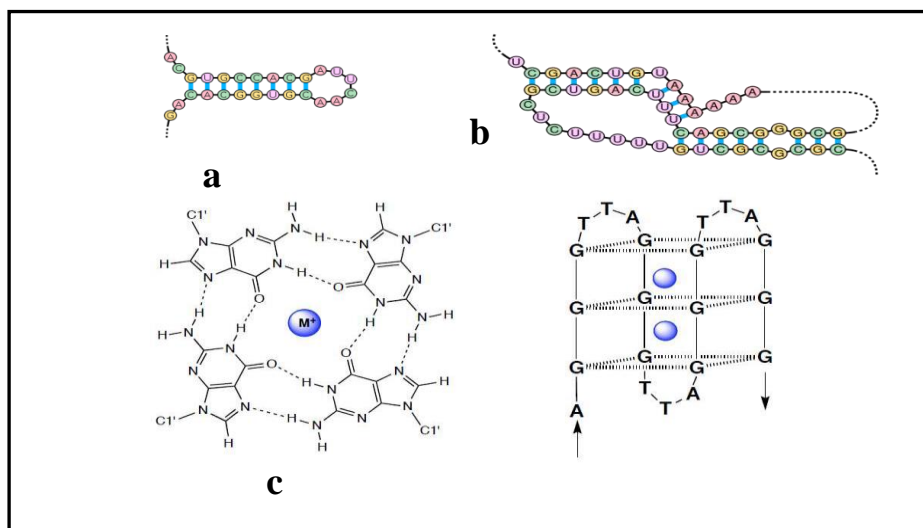


Figure I.5 : Représentation schématique des principaux motifs structuraux. (a) : la tige boucle ; (b) : le pseudo-noeud ; (c) : Structure (gauche) et empilement (droite) des tétrades de G ^[52].

Les interactions entre les motifs de la structure secondaire mènent à la formation de la structure tridimensionnelle globale avec l'empilement d'hélices et le compactage de l'ensemble. Les d'interactions entre boucles : deux boucles « s'embrassent » « kissing complexes » par appariement de leurs résidus complémentaires, ou encore une boucle s'insère soit dans une hélice, soit au sein d'une structure réceptrice complémentaire « docking ».

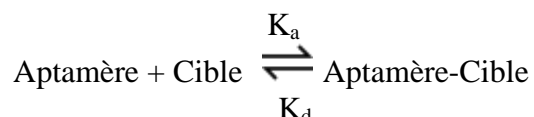
III.4 Fixation d'un aptamère à sa cible

Les aptamères sont des macromolécules souvent flexibles. Leur structure 3D peut changer de conformation suite à la modification de plusieurs paramètres, comme la température, le pH, la tension, la concentration en ions et la liaison d'un ligand. La sélection des aptamères est basée sur la capacité à lier des molécules de ligand avec une affinité et une spécificité élevées. Grâce à la structure 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 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 en ajustant la structure qui renforce la liaison. ^[57-61] La formation de la structure tertiaire des ARN est très souvent dépendante des conditions physicochimiques environnantes et en particulier de la présence, dans la solution, de cations divalents. Ces derniers sont nécessaires pour stabiliser cette structure et pour commencer le processus de pliage en interagissant avec les groupes phosphate du squelette en particulier, en faisant écran à la répulsion électrostatique entre les charges négatives des sites actifs c'est-à-dire les réarrangements conformationnels ^[62]. Les cations monovalents et divalents, ainsi que les molécules d'eau sont indispensables à la stabilisation thermodynamique des structures tertiaires des aptamères. Ils font partie intégrante de la structure finale de l'ensemble et participent à son maintien. Ils jouent un rôle important pour la stabilité de la structure des jonctions d'ADN ^[63].

III.5 Affinité des aptamères

Les aptamères présentent une grande spécificité leur permettant de discriminer leur cible par rapport à leurs dérivés. Les exemples cités sont ceux de l'aptamère anti-théophylline qui possède une affinité dix mille fois moindre pour la caféine qui ne diffère que d'un groupement méthyle et de l'aptamère anti-L-arginine avec douze mille fois moins d'affinité pour la D-arginine ou encore l'aptamère anti-oxytétracycline qui ne fixe que très peu la tétracycline (un groupement hydroxyle de différence) ^[64-65]. L'affinité d'un aptamère vis-à-vis de sa cible représente sa tendance à interagir fortement avec elle. Elle est évaluée par la constante de dissociation K_d . Cette constante est souvent utilisée pour décrire l'affinité entre un aptamère et une cible c'est-à-dire la force d'interaction entre l'aptamère et sa cible. L'affinité entre l'aptamère et la cible dépend des liaisons non covalentes qui s'établissent entre les deux molécules, qui peuvent être des liaisons de nature électrostatique, hydrophobe, ou des liaisons hydrogène. L'interaction réversible entre ces deux molécules peut être décrite suite à la réaction suivante :



K_a la constante cinétique d'association de la réaction et K_d sa constante cinétique de dissociation. Si l'on considère le quotient des deux constantes cinétiques k_a et k_d , la constante de dissociation à l'équilibre est :

$$K_D = \frac{[\text{Aptamère}] \times [\text{Cible}]}{[\text{Aptamère-Cible}]}$$

Cette dernière constante s'exprime en M ou mol.L⁻¹ (elle est donc homogène à une concentration) et varie en sens inverse de l'affinité : Ainsi plus l'affinité d'un aptamère pour sa cible est importante, plus sa constante de dissociation sera petite. Le challenge de sélectionner un aptamère présentant une forte affinité est d'autant plus difficile que la molécule est de petite taille. En effet plus la cible présente une taille importante, plus il y aura de liaisons possibles permettant une bonne interaction cible – aptamère^[66].

III.6 Selex-Sélection in vitro

La méthode évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel (SELEX), est une technique combinatoire en biologie moléculaire de sélection *in vitro*, à partir d'une banque combinatoire d'oligonucléotides synthétiques.

Ce processus est caractérisé par une répétition cyclique d'étapes successives de sélection (liaison, partitionnement, élution), d'amplification et de conditionnement. Une fois la séquence identifiée par le SELEX, l'aptamère est synthétisé chimiquement. C'est donc un mode de synthèse peu coûteux et entraînant peu de variation. De plus, il est possible d'introduire des modifications lors de leur synthèse pour améliorer leur stabilité, leur spécificité, leur immobilisation ou la détection du dispositif final lors de leur utilisation en bioessais.

III.6.1 Principe général

Plusieurs travaux ont été publiés pour décrire le principe de la méthodologie SELEX^[67-72]. En général ce procédé est divisé en trois étapes qui sont répétées dans le but de sélectionner la séquence d'oligonucléotides présentant la meilleure affinité pour la cible. Les aptamères sont générés à partir de bibliothèques combinatoires de bases d'acides nucléiques synthétiques par enrichissement exponentiel à travers l'adsorption, la sélection et l'amplification appelée SELEX^[73-75]. L'ensemble des étapes du procédé SELEX est schématisé sur la figure 6.

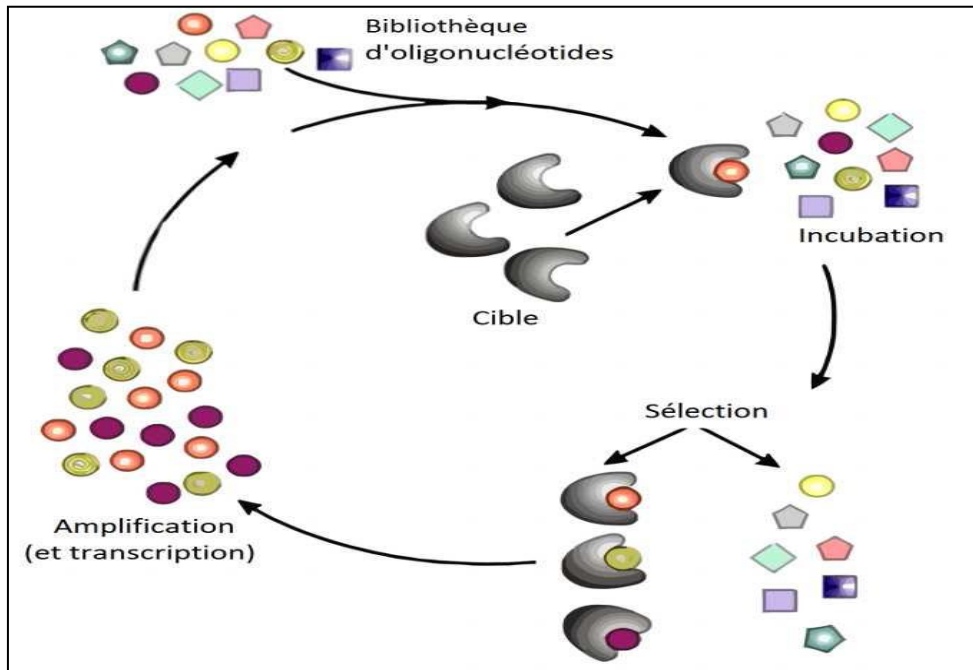


Figure I.6 : Principe général du procédé d'identification des aptamères : Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX)^[76].

La première étape de SELEX commence par la préparation d'une bibliothèque initiale de candidats. Elle est composée de séquences ADN ou ARN simple brin synthétisées chimiquement. Chacune comporte une région variable, longue de 20 à 80 nucléotides, dont la séquence aux extrémités 5' et 3' est connue et la séquence centrale est aléatoire. Ainsi, pour une séquence de n nucléotides, il y a donc 4^n possibilités, puisque chaque position peut être occupée par l'un des quatre nucléotides A, T, G ou C. La complexité de la librairie dépend du nombre n de nucléotides dans la région variable.

La bibliothèque initiale est ensuite incubée avec la cible d'intérêt dans des conditions de tampon spécifiques et des températures qui sont compatibles avec les conditions prévues pour l'utilisation finale d'aptamère, avec un faible rapport de l'acide nucléique à la molécule cible de 1 ou plus. Durant cette étape, les molécules cibles sont soit en solution avec la librairie, soit liées à un support solide. Durant cette étape, une très petite fraction de séquences individuelles va interagir avec la cible. Ces séquences sont alors séparées du reste de la bibliothèque.

Plusieurs techniques permettent la séparation: L'utilisation de la chromatographie d'affinité avec immobilisation du matériau est une méthode classique pour cette étape de séparation. Ainsi que l'utilisation de billes magnétiques offre une autre possibilité pour

l'immobilisation de la cible. Une méthode de séparation généralement utilisée sans immobilisation consiste en une ultrafiltration par l'utilisation de filtres de nitrocellulose avec des seuils de poids moléculaire distincts. Au cours des dernières années, plusieurs auteurs ont décrit d'autres méthodes possibles de séparation pendant le procédé SELEX, par exemple. Electrophorèse capillaire, CE , Flow Cytometry, FC , Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA ; Surface Plasmon Resonance, SPR ou centrifugation^[77].

Ensuite les oligonucléotides sont amplifiés par PCR dans le cas de l'ADN ou rétro-transcrits avant PCR dans le cas de l'ARN. Ceci permet de dupliquer en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité. L'étape de sélection des oligonucléotides avec une grande affinité pour la molécule cible et l'étape d'amplification est répétée plusieurs fois afin d'obtenir des oligonucléotides ayant la haute affinité pour la cible. Les oligonucléotides sélectionnés sont appelés les aptamères. A partir des ADN double brins résultant, les brins« sens » correspondant à la librairie de départ sont purifiés par déshybridation des doubles brins ou par transcription *in vitro* et purification de l'ARN synthétisé. Cette nouvelle banque enrichie d'oligonucléotides est utilisée pour un second cycle de SELEX. Généralement, entre 7 et 15 cycles sont nécessaires pour isoler les séquences ayant la plus grande affinité pour la cible.

III.6.2 Les modifications pré et post-SELEX

Les modifications post-SELEX sont exécutées soit pour augmenter la stabilité des aptamères sélectionnés ou bien pour optimiser des paramètres de liaison à la cible ou aux molécules pertinentes. Pour d'autres applications, des modifications avec des groupes de détection ou immobilisation sont possibles. Le ribose possède un groupe hydroxyle en position 2' absent dans le désoxyribose de l'ADN. Cette fonction 2'-OH a des incidences multiples sur la structure de l'ARN. Sur le plan chimique, cette fonction alcool rend l'ARN sensible à l'hydrolyse alcaline. La présence des deux oxygènes en *cis* sur les positions 2' et 3' rend possible la cyclisation du phosphate sur les positions 2' et 3', qui se produit très rapidement lorsqu'une base vient arracher le proton du 2'-OH. Cette cyclisation du nucléotide provoque une coupure de la chaîne ribose-phosphate^[78] et libère des extrémités 5'-OH et 2', 3' phosphate cyclique. Donc il est donc préférable d'effectuer le SELEX directement à partir d'une banque d'oligonucléotides modifiés, c'est à dire l'utilisation de

nucléotides substitués en position 2' du ribose par des groupements amine, fluor ou méthyle-éther^[79-82].

III.6.3 Applications des aptamères

Un biocapteur utilisant l'aptamère comme élément de reconnaissance est communément nommé aptasensor. Par rapport aux immunosenseurs, l'utilisation d'aptasensors offre des avantages tels que : stabilité, grande gamme de concentration dynamique, durée de conservation prolongée et faible réactivité croisée. La première étape dans le développement d'un aptasensor, consiste à immobiliser les séquences oligonucléotides sur une surface conductrice en la modifiant avec des nanomatériaux tels que les nanotubes de carbone et de graphène^[83-85], nanoparticules métalliques^[86-94], conductrices couches polymériques^[93-95-96] et combinaisons de différents types de nanostructures^[97-101]. Récemment, cette modification a conduit au développement de très sensibles aptasensors^[97-98]. L'étape d'immobilisation une fois réalisée, contribue à une orientation de réactivité élevée, l'accessibilité et la stabilité de la surface récepteur aptamère et à minimiser l'adsorption non spécifique. Les stratégies les plus réussies sont basées sur la formation de la liaison covalente, les réactions d'affinité et la formation de couches auto-assemblées^[99-100]. Généralement, l'aptamère est fonctionnalisé avec un terminal de groupe fonctionnel tel que : une amine, la biotine et le groupe thiol pour aider l'immobilisation. Les techniques électrochimiques, en particulier la voltammétrie cyclique (CV), la voltammétrie impulsionnelle différentielle (DPV), la voltampérométrie à ondes carrées (SWV), la potentiométrie linéaire de voltammétrie à balayage (LSV) et la spectroscopie d'impédance électronique ont été largement appliqués dans le travail impliquant les aptasensors^[85-86, 88,98, 99-111].

III.6.3.1 Applications thérapeutiques

Les anticorps sont utilisés dans les différents traitements du cancer comme la chimiothérapie, la radiothérapie ainsi que la thérapie photodynamique et photothermale. L'utilisation des aptamères dans ce domaine pour remplacer les anticorps a progressé. Les aptamères peuvent être conjugués avec des nanoparticules et des acides nucléiques pour un traitement efficace et ciblé^[112].

a. Aptamères avec nanoparticules : Ces nanomatériaux apportent des avantages pour les applications de l'aptamère menant à l'amélioration des propriétés physiques et

l'assurance de la stabilité chimique et la biocompatibilité pour l'immobilisation des aptamères ^[113].

b. Aptamères avec des acides nucléiques : sont utilisés comme un guide pour les molécules pour arriver au sein de la cellule ou du tissu. Ainsi, la combinaison d'aptamères avec des fragments d'acide nucléique augmentera la spécificité de ciblage de siRNA / miARN vers les oncogènes et supprime les signaux de surexprimés ou les gènes dans les cellules cancéreuses ^[114-115].

c. Aptamères inhibiteurs : sont aussi sélectionnés pour d'autres cibles car ils présentent de l'affinité pour celles-ci. Certains aptamères possèdent des activités inhibitrices pour leurs cibles protéiques, ce qui permet de les utiliser à des fins thérapeutiques comme : Inhibiteurs de la coagulation ^[116], inhibiteurs de la prolifération cellulaire ^[117] ou modulateurs de l'immunité ^[118].

III.6.3.2 Applications pour le diagnostic

a. Aptacapteurs

Les biocapteurs basés sur des aptamères comme éléments de reconnaissance sont appelés aptasensors ^[119]. Ils peuvent être élaborés à l'aide de diverses techniques basées sur les changements de potentiel électrochimique, la fluorescence ou la couleur lorsque l'aptamère se lie à la molécule cible. Ces aptasensors ont trouvé des applications importantes pour une détection en médecine et en biologie en particulier pour la détection des cancers ^[120] et les analyses biologiques pour la détection rapide des molécules pathogènes.

a.1 Aptacapteurs électrochimiques

Ces biocapteurs présentent plusieurs avantages et reposent sur les variations des mesures du courant électrochimique avant et après la détection de la cible par l'aptamère. Les principaux avantages de ces aptasensors incluent leur faible coût de production, haute sensibilité, miniaturisation possible et ne nécessitent pas d'instruments optiques spéciaux.

Un aptacapteur électrochimique a été développé à des fins de détection du cancer du colon en utilisant un aptamère KCHA10 modifié. La cytométrie en flux, la microscopie à fluorescence et la voltamétrie cyclique électrochimique sont utilisées pour vérifier la liaison entre les cellules cibles et l'aptamère. La limite de détection de cet aptasensor est égale à sept cellules cancéreuses. Sur la base des résultats expérimentaux, le capteur

proposé peut être utilisé pour le diagnostic des maladies cancéreuses au point de traitement [121].

Un autre aptacapteur, à base de nanotubes de carbone NTC issu de l'assemblage direct des NTC a été utilisé pour fabriquer des couches minces sur des zones macroscopiques d'électrodes sérigraphiées et ensuite utilisées dans l'élaboration d'aptasensor électrochimique pour l'analyse des biomarqueurs mammaires.

La méthodologie proposée utilise une quantité minimale de NTC et de solvants toxiques, et il a été démontré avec succès qu'elle forme des couches minces sur des zones macroscopiques de la surface du transducteur de carbone sérigraphié. La surface de transducteur sérigraphiée revêtue de CNT a été intégrée dans la fabrication de capteurs acoustiques électrochimiques pour l'analyse des biomarqueurs du cancer du sein [122-124].

Pour lutter contre l'anxiété qui émerge souvent pendant le cours normal de la vie humaine, une procédure nécessite l'utilisation d'une mesure basée sur des biomarqueurs pour le diagnostic du stress. Le biomarqueur le plus important lié au stress, est l'hormone cortisol, qui joue un rôle clé dans la situation de combat ou de fuite, altère la réponse immunitaire et supprime les systèmes digestif et reproducteur. Des chercheurs ont pris la peine d'examiner le biocapteur basé sur un aptamère disponible pour la détection du cortisol. Les stratégies potentielles de diagnostic au point de service qui pourraient être exploitées pour l'adaptation du cortisol ont également été envisagées [125]. Dans cette recherche, un aptamère ADN, sélectionné par SELEX pour être spécifique du sous-type H5N1 du virus de la grippe aviaire (AIV), a été utilisé comme réactif alternatif aux anticorps monoclonaux dans un biocapteur à impédance utilisant une cellule d'écoulement microfluidique et une microélectrode interdigitée pour la détection spécifique du H5N1 AIV [126].

Dans ce travail, un nouvel aptasensor électrochimique a été développé dans le domaine de biomédecine pour la détection sélective de myoglobine à base de méso-tétra (4-carboxyphényl) porphyrine nanoparticules d'or conjuguées au graphène (TCPP-Gr / AuNPs). L'infarctus du myocarde est devenu l'une des principales causes de décès dans la plupart des pays industrialisés. La prévention ou le traitement de l'infarctus aigu du myocarde (IAM) chez les personnes est devenu particulièrement le diagnostic urgent et précis [127]. La valeur élevée du taux de progestérone (P4) chez les humains en raison de sa surconsommation par l'hormonothérapie, les produits alimentaires ou l'eau potable peut entraîner de nombreux effets négatifs sur la santé. Ce travail résume la sélection,

l'identification et la caractérisation des aptamères avec une grande affinité pour le P4. De plus, l'aptasensor a été appliqué dans des échantillons d'eau du robinet enrichis et a montré de haut pourcentage de récupération ^[128].

a.2 Aptacapteurs optiques

En tant qu'outil d'analyse potentiel dans l'élaboration d'aptasensors, l'analyse optique a attiré beaucoup plus d'intérêt des chercheurs en raison de sa sensibilité élevée, de sa réponse rapide et de son fonctionnement simple. Les travaux de recherches se concentrent sur les réalisations récentes dans la conception de divers aptasensors optiques pour les petites biomolécules, contenant des aptasensors de fluorescence, des aptasensors colorimétriques, des aptasensors de chimiluminescence et d'autres aptasensors optiques ^[129]. En utilisant un aptamère double ADN (aptamère du CEA lié à l'hémine aptamère), capable de capturer rapidement l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) et l'hémine, un double-aptasensor tout-en-un avec le 1,1'-oxalyldiimidazole (ODI). La détection de chimiluminescence a été développée pour le diagnostic précoce du cancer humain. Le double-aptasensor rapide tout-en-un, peut être utilisé comme un nouvel outil clinique pour le diagnostic précoce du cancer du sein. ^[130] Contrairement aux aptacapteurs électrochimiques, les molécules peuvent être détectées sur la base de la fluorescence, où l'aptamère sera marqué avec un fluorophore et l'extincteur. A titre d'exemple, un bien connu biomarqueur qui caractérise la malignité épithéliale est MUC1, peut être détecté par un aptasensor de fluorescence. Cet aptamère de ciblage MUC1 a été fusionné avec un colorant et avec de l'oxyde de graphène (GO) comme extincteur. De même, le GO est utilisé comme désactivateur pour la détection du carcinome hépatocellulaire, où l'aptasensor détecte sélectivement les lignées cellulaires de cancer du foie humain smmc-7721 avec une intensité de fluorescence plus élevée ^[131]. Un autre capteur optique fluorescent à surface améliorée basé sur l'aptamère en une seule étape a été développé, en combinant une interaction aptamère-cible pour la reconnaissance de la cible et une interaction fluorophore pour l'amélioration du signal. L'aptasensor développé est simple, sensible, spécifique et stable pour la détection de la thrombine ^[132].

a.3 Aptamères en imagerie médicale

Les aptamères sont considérées comme la meilleure modalité d'imagerie en raison de leur plus petite taille et de leur capacité à cibler un large spectre de molécules, ce qui aide à comprendre les aspects physiologiques de la progression et du traitement de la maladie. Les sondes d'imagerie moléculaire basées sur des aptamères sont conçues en reliant des

aptamères avec des molécules fluorescentes ou des nanoparticules, où elles sont détectées pour la fluorescence ou bioluminescence. Elles sont conçues en fonction de leur spécificité vis-à-vis des protéines cellulaires, telles que la nucléoline, les intégrines et les biomarqueurs du cancer, tels que PSMA et MUC1. Basé sur les caractéristiques de désintégration et sa capacité à se fixer facilement avec des ligands, le Cu^{64} agit comme un radio-traceur efficace qui peut être utilisé pour l'imagerie par tomographie par émission de positons (TEP). L'imagerie par ultrasons est limitée par la résolution de l'image. Les limitations peuvent être éliminées en utilisant des agents de contraste comme les nanobulles. Bien que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) soit une technique d'imagerie anatomique, les sondes d'imagerie peuvent être modifiées pour une utilisation en imagerie moléculaire. Les aptamères peuvent être conjugués avec des molécules paramagnétiques, y compris le gadolinium et les nanoparticules d'oxyde de fer super paramagnétiques (SPIONs), pour des études d'imagerie par résonance magnétique ^[133].

III.6.3.3 Applications analytiques

Les aptamères ont fait l'objet de multiples applications. Depuis 40 ans, les aptamères sont utilisés comme agents thérapeutiques ou de diagnostic. Mais le nombre croissant des contaminants, nécessite la mise au point de nouveaux outils d'analyse pour répondre à la demande croissante des mesures législatives sur la salubrité des aliments et le contrôle de la pollution de l'environnement. L'analyse quantitative de composés recherchés à de faibles teneurs (ng.L^{-1}) est encore à l'heure actuelle un véritable challenge analytique et ce, quel que soit le domaine d'application clinique, agroalimentaire ou environnemental. Le développement des procédures analytiques sensibles et faciles à utiliser est extrêmement important. Les capteurs basés sur l'aptamère électrochimique semblent prometteurs parmi tous les biocapteurs, car ils permettent une analyse multiple et fournissent une réponse rapide, une sensibilité, une spécificité et un faible coût.

a. Capteurs et biocapteurs

L'évolution de l'instrumentation permet maintenant de réaliser des séparations chromatographiques rapides et efficaces couplées à une détection par spectrométrie de masse performante permettant une analyse spécifique et sensible. Néanmoins, la complexité des échantillons à traiter tels que les fluides biologiques (sang, plasma, urine, etc.), conduit très souvent à des phénomènes de suppressions d'ions lors de la détection diminuant considérablement la sensibilité du dosage. Ces techniques exigent aussi des techniciens hautement qualifiés pour l'opération et ils ne sont pas adaptés pour l'analyse de

dépistage. Les aptamères font déjà l'objet de nombreuses applications analytiques : bioessais, capteurs, phases stationnaires pour les séparations chromatographiques et électrocinétiques. Les biocapteurs électrochimiques les plus appliqués pour l'analyse environnementale utilisent des anticorps comme reconnaissance biomoléculaire et ils sont appelés immunocapteurs. Les développements récents impliquant les aptamères fournissent une intéressante alternative aux anticorps. Ces dernières années, l'attention est concentrée sur les aptacapteurs pour la détection des substances toxiques de classes chimiques hétérogènes qui contaminent les chaînes de la production alimentaire, spécifiquement, et l'environnement, plus généralement ^[134].

a.1 Aptacapteurs pour les pesticides

Les pesticides représentent certaines des substances les plus toxiques et les plus stables rejetées dans l'environnement. De plus, ils peuvent également avoir des effets toxiques sur les organismes non ciblés, y compris les humains ^[135]. Récemment, une attention particulière a été portée à leur détection comme par exemple l'acétamipride ^[136].

a.2 Aptacapteurs pour les médicaments

Les antibiotiques représentent plus de 70% de tous les produits pharmaceutiques consommés en médecine vétérinaire et ils sont également diffusés en médecine humaine pour environ 6% de la prescription ^[137]. Une partie de ces antibiotiques reste non métabolisée et peut donc être disséminée dans l'environnement de nombreuses manières, mais principalement par le biais d'une sélection dans laquelle des antibiotiques sont utilisés pour accélérer la croissance animale (mélangée à des aliments pour animaux) en plus des raisons thérapeutiques. Une partie de ces antibiotiques reste non métabolisée et peut donc être disséminée dans l'environnement. L'un des effets les plus néfastes de la prise d'antibiotiques dans la chaîne alimentaire humaine est la résistance aux antibiotiques des bactéries, de sorte qu'ils représentent toujours l'un des analytes les plus difficiles pour la chimie analytique. Les médicaments tels que les antibiotiques, les β -agonistes et les médicaments anti-inflammatoires contaminent la nourriture et l'eau et provoquent plusieurs épidémies majeures à l'échelle mondiale. Au cours des dernières années, plusieurs aptasensors ont été développés pour la détection de médicaments ^[138-139] et surtout les antibiotiques et la cocaïne ^[140-141].

a.3 Aptacapteurs pour les toxines

Les mycotoxines représentent le groupe le plus diffus des toxines qui affectent les produits alimentaires. Ils ont montré plusieurs effets néfastes sur la santé humaine, tels que

les maladies gastro-intestinales, les lésions rénales et l'immunosuppression, généralement définis comme une mycotoxicose. Ces travaux décrivent la sélection de plusieurs aptamères pour différentes toxines comme l'ochratoxine A, aflatoxine, saxitoxine, fumonisine B₁ ; ricin toxine et les brevetoxines (BTX). [142-149].

a.4 Aptacaptures pour les perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens sont des produits chimiques qui peuvent interférer avec le système endocrinien de l'organisme et produire des effets néfastes sur la santé. Plusieurs exemples d'aptasensors pour l'analyse des composés perturbateurs endocriniens sont en développement pour des applications environnementales. Quelques aptasensors au bisphénol A, ont été développés au cours de ces dernières années [150-153].

a.5 Aptacaptures pour les métaux lourds

La croissance industrielle a conduit à une diffusion massive de ces polluants, déterminant parfois une exposition élevée, même par l'apport alimentaire d'aliments et de boissons. Les ions de métaux lourds ont des effets à long terme sur la santé humaine, allant des lésions du système nerveux à un dysfonctionnement rénal ou une maladie pulmonaire et dommages au système respiratoire. Pour ces raisons qu'il faut les détecter dans l'environnement [154-155].

a.6 Aptacaptures dans la sécurité alimentaire

Les aptacaptures constituent une alternative idéale pour concevoir des biocaptures rapides et sélectifs dans des applications commerciales afin d'assurer la sécurité, la qualité et l'équité du commerce alimentaire international. Pour la bonne gestion du régime alimentaire d'une partie importante des patients atteints de la maladie cœliaque, les approches analytiques actuelles reposent sur l'utilisation des aptamères comme éléments de reconnaissance sélective pour la détection du gluten [156].

IV- Les enzymes

Le mot "enzyme" a été inventé en 1877 à partir du grec, "dans la levure", par le physiologiste allemand Wilhelm Kuhne. Les enzymes sont généralement des protéines de haut poids moléculaire (15 000 <M <plusieurs millions Daltons) qui agissent comme catalyseurs. Les enzymes ont été les premières molécules biologiques de reconnaissance intégrées dans les biocaptures en 1960 avec les travaux de Clark et Lyon sur la détection du glucose [157]. De tous les biocaptures à base d'éléments de reconnaissance enzymatique, les biocaptures de glucose sont les plus étudiés et les plus utilisés.

IV.1 Structure générale

Les enzymes sont une classe dans la famille des protéines de structure très complexe constituée d'acides aminés formant des chaînes polypeptidiques reliées par des liaisons peptidiques.



Les groupements R possèdent souvent des fonctions (hydrogènes, ioniques, hydrophobes, pont disulfures) permettant leur immobilisation par liaisons covalentes sur des supports insolubles.

Alors, La protéine a une forme compacte stabilisée par de nombreuses liaisons qui lui permet l'activité enzymatique. Les enzymes sont des biocatalyseurs très spécifiques qui assurent le déroulement de toutes les réactions du métabolisme. Les réactions dont il est question vont de la simple hydrolyse de liaisons peptidiques à des processus poly-électroniques d'une très grande complexité. Les enzymes ont un pouvoir catalytique et une spécificité souvent supérieure aux catalyseurs chimiques. Elles accélèrent la valeur de 10^3 à 10^6 fois les réactions chimiques correspondantes qui se dérouleraient dans l'organisme vivant, en agissant à faible dose et sont générées en fin de réaction. Les enzymes ont une forte stéréospécificité qui leur permet de choisir les différents énantiomères ou de différencier entre eux avec d'autres groupes identiques entre eux.

IV.1.1 Site actif

L'activité catalytique des enzymes est déterminée par leur structure tridimensionnelle dans laquelle, une cavité où s'effectue la réaction enzymatique appelé le site actif. Les enzymes interviennent dans la transformation d'un substrat en produit. Elles sont associées à un type de réaction chimique d'où une spécificité d'action qui dépend de la nature du substrat. Le site actif des enzymes correspond à l'ensemble des acides aminés qui rentrent en contact avec le substrat à transformer. Il comporte deux sous-parties : le site de fixation et le site catalytique.

***le site de fixation** : cette partie du site actif reconnaît le substrat et le maintient bien positionné grâce à des liaisons faibles qui s'établissent entre le substrat et les acides aminés pour former un complexe enzyme – substrat (complexe ES). Il permet donc de stabiliser le substrat dans le site actif pour mettre face à face, la partie de la molécule de substrat qui est transformée, avec les acides aminés du site catalytique.

***le site catalytique** : est constitué de résidus qui sont directement impliqués dans la formation et la rupture des liens chimiques. Ces résidus sont souvent localisés dans le

fond de la cavité, et dans la majorité des cas, possèdent des chaînes latérales ioniques ou réactives (ex. Histidine, Lysine, Cystéine, Serine, Aspartame, Acide glutamique).

IV.1.2 Les cofacteurs

Le bon fonctionnement des enzymes nécessite la présence d'une molécule qui a un rôle d'accepteur et/ou de donneur d'électrons et de protons appelée cofacteur Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) ou Flavine Adénine Dinucléotide (FAD).

IV.2 Classification des enzymes

Selon les réactions catalysées, les enzymes sont classées dans six grandes catégories [158].

1. Oxydoréductases- qui catalysent des transferts d'électrons et de protons d'un donneur à un accepteur.
2. Transférases- qui catalysent les transferts de groupements.
3. Hydrolases- qui catalysent des réactions d'hydrolyse (coupure des liens C-C, C-O, C-N et autres par de l'eau)
4. Lyases- qui catalysent l'addition de groupes à des liens doubles ou l'inverse
5. Isomérases- qui catalysent le transfert de groupes dans une même molécule pour produire des formes isomères (ex. conversion d'un acide aminé L en acide aminé D)
6. Ligases- qui forment des liens C-C, C-S, C-O et C-N lors de réactions de condensation couplées à l'utilisation d'ATP.

IV.3 Mécanisme réactionnel et cinétique enzymatique

L'enzyme ici joue le rôle d'un catalyseur chimique d'où elle contribue à l'augmentation de la vitesse de la réaction, sans modifier les fonctions thermodynamiques de celle-ci. Elle permet dans ce cas d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction et d'augmenter le nombre de molécules susceptibles de réagir. Au cours de la réaction enzymatique, un enzyme (E) se lie à un substrat (S) pour former un complexe- enzyme-substrat (ES), complexe qui permettra de convertir le substrat en produit (P) tout en libérant l'enzyme.



Donc un cycle enzymatique se déroule généralement en quatre étapes :

- Diffusion des réactifs dans le milieu
- Reconnaissance enzyme- substrat
- Mécanisme catalytique.

- Expulsion des produits

IV.3.1 La détermination graphique de la constante de Michaelis et de v_{\max}

IV.3.1.a Cinétique enzymatique en phase homogène

En 1913, L. Michaelis et M. Menten ont proposé une théorie qui permet de décrire la cinétique d'une réaction catalysée par une enzyme agissant sur un substrat unique pour donner un produit ^[159]. La valeur de K_M est spécifique à l'enzyme et correspond à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse initiale maximale ($V_{\max}/2$).

Elle reflète l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus elle est grande, moins bien le substrat se fixe à l'enzyme, donc l'affinité de l'enzyme pour le substrat est faible. À l'inverse, plus la constante de Michaelis est petite, le substrat se fixe davantage à l'enzyme, donc l'affinité de l'enzyme pour le substrat est élevée, ce qui signifie que la vitesse de réaction approchera V_{\max} plus rapidement. Son unité est mol.L^{-1} . La méthode consiste à tracer le graphique représentant les v_i en fonction de la concentration en substrat $[S]$ utilisé. D'après l'équation de Michaelis, on peut en effet déduire que v_i se rapproche asymptotiquement de v_{\max} lorsque $[S]$ augmente. Cette branche hyperbolique est aussi appelée courbe de saturation de l'enzyme par le substrat. Par ailleurs, lorsque $[S]=K_M$, $v_i = v_{\max} / 2$. On peut donc déterminer graphiquement v_{\max} , puis K_M ^[160] (Figure I-7).

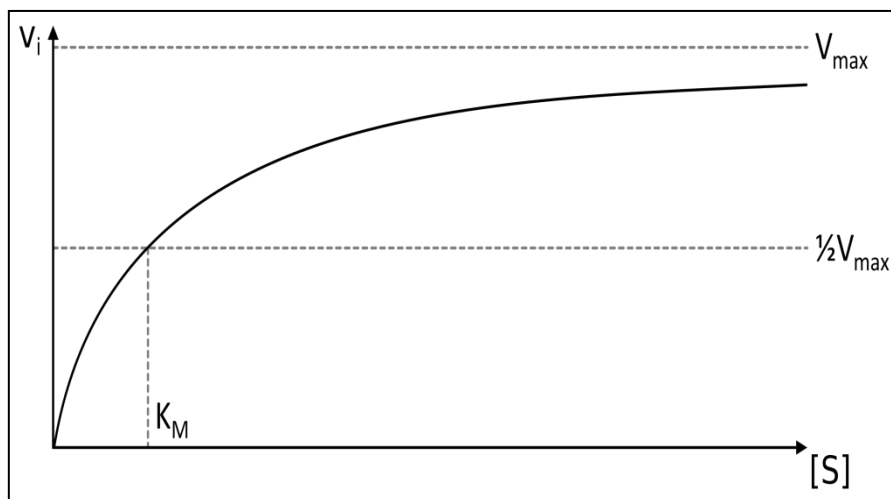


Figure I.7 : Evolution de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat ^[161].

La difficulté vient du fait que la détermination graphique d'une asymptote est imprécise, entachant d'erreur la détermination de K_M et v_{\max} . L'utilisation de la

linéarisation de Lineweaver-Burk⁴⁵ proposée en 1934 donne plus de précision. Cette représentation de Lineweaver-Burk consiste à tracer l'inverse de la vitesse initiale de la réaction enzymatique ($1/v_i$) en fonction de l'inverse de la concentration en substrat ($1/[S]$) ; elle est parfois appelée « représentation en double-inverse » et obéit à l'équation 1 ci-dessous (Figure I.8) :

$$\text{Equation 1 } \frac{1}{v_i} = \left[\frac{K_m}{v_{\max}} \times \frac{1}{[S]} \right] + \frac{1}{v_{\max}}$$

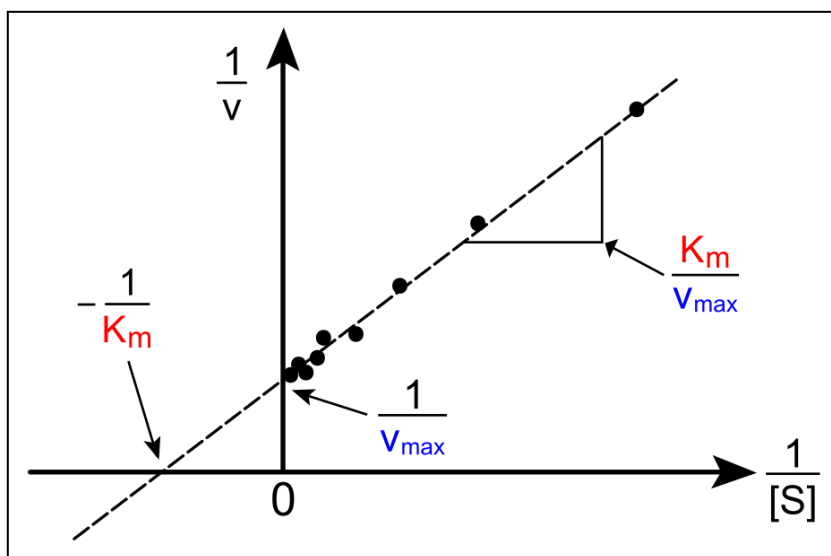


Figure I-8 : Représentation graphique de la linéarisation de Lineweaver-Burk^[161]

IV.3.1.b Cinétique enzymatique en phase hétérogène

Dans le cas où l'enzyme est immobilisé sur un matériau, ce dernier va influencer sur le processus biochimique de catalyse enzymatique en modifiant la cinétique de la réaction et éventuellement la détection. En conséquence, la cinétique va dépendre de nombreux paramètres dans le microenvironnement de la protéine comme :

- la nature du support (hydrophobe, hydrophile, caractère ionique...).
- l'accessibilité du site actif et des phénomènes de transport du substrat et des produits.

La constante ainsi déterminée ne rendra plus compte des caractéristiques intrinsèques de l'enzyme mais plutôt de son activité dans son nouveau microenvironnement dans lequel l'enzyme est immobilisée par réticulation intermoléculaire, liaisons covalentes, piégeage dans des membranes, ou encapsulation dans un polymère électrogénéré^[162]. Elle sera alors nommée la constante apparente de Michaelis-Menten notée K_M^{app} (schéma I.9).

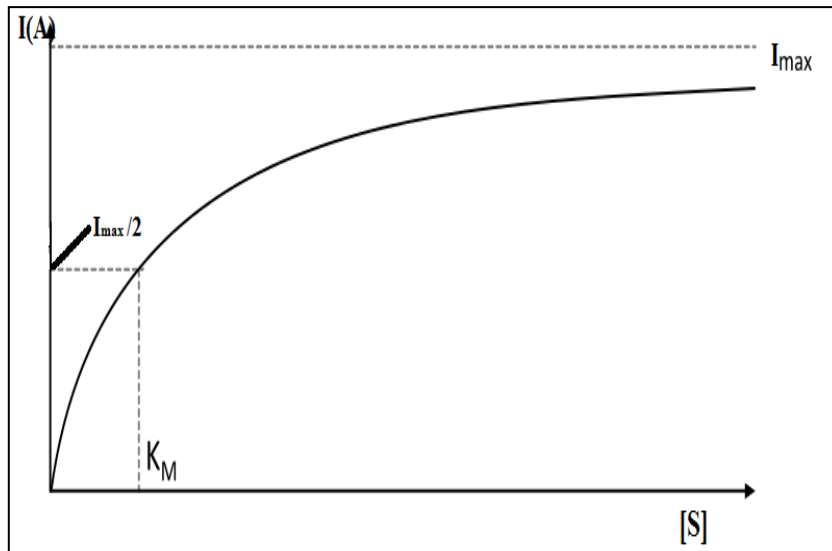


Schéma I-9 : Courbe typique obtenue pour des biocapteurs électrochimiques enzymatiques représentant l'évolution de l'intensité en fonction de la concentration en substrat ^[161].

Dans le cas de biocapteurs enzymatiques électrochimiques obéissant à ce modèle, on peut directement relier l'intensité du signal à la vitesse de la réaction selon l'équation suivante :

$$\text{Equation 2} \quad I = \alpha_{corr} n F V = \alpha_{corr} \frac{n F V_{max} [S]}{K_M^{app} + [S]}$$

Avec α_{corr} : facteur de correction ($\alpha_{corr} < 1$), n : nombre d'électrons échangés au cours du processus électrochimique de détection et F : constante de Faraday.

Il est nécessaire d'introduire le facteur de correction α_{corr} du fait que dans ce type de système, les espèces P produites lors de la réaction enzymatique vont diffuser dans les trois dimensions de l'espace même si la direction vers l'électrode va être favorisée puisque les espèces vont y être consommées et leur concentration est maintenue nulle.

IV.3.2 Facteurs influençant l'activité enzymatique

Les enzymes sont des protéines globulaires. Elles ont un effet catalyseur, c'est-à-dire qu'elles accélèrent les réactions chimiques sans pour autant être modifiées durant le processus. En fait, une enzyme peut catalyser tellement rapidement, qu'une seule molécule d'enzyme transforme habituellement un millier de molécules de substrat par seconde. Il faut bien sûr tenir compte de certains facteurs comme la température, le pH et la concentration d'enzyme qui peuvent modifier la vitesse et l'efficacité de la réaction.

IV.3.2.1 Effet de la température

Le taux de réactions catalysées par des enzymes augmente avec la température jusqu'à une certaine limite. Au-dessus d'une certaine température, l'activité enzymatique diminue avec la température en raison de la dénaturation enzymatique car les liaisons hydrogènes responsables de la structure sont détruites. La somme de ces deux effets donne une courbe caractéristique de l'activité enzymatique-température qui passe par un maximum, montrant ainsi l'existence d'une température optimale. Cette courbe se divise donc en deux parties, avant et après le pic de la température optimale. La première partie, courbe ascendante, correspond à la loi d'Arrhenius. La seconde partie, courbe descendante, est le fait de la dénaturation de l'enzyme par sa thermolabilité (fraction protéique). Chaque enzyme présentera donc une température optimale et une température d'inactivation spécifique.

IV.3.2.2 Effet du pH

Certaines enzymes ont des groupes ioniques sur leurs sites actifs, et ces groupes ioniques doivent être sous une forme appropriée (acide ou base) pour fonctionner. Des variations de pH du milieu entraînent des changements dans la forme ionique du site actif et des changements dans l'activité de l'enzyme et, par conséquent, dans la vitesse de réaction. Les changements de pH peuvent également modifier la forme tridimensionnelle de l'enzyme. Pour ces raisons, les enzymes ne sont actifs que sur une certaine plage de pH. Le pH du milieu peut affecter la vitesse de réaction maximale V_{max} , le coefficient de saturation K_M et la stabilité de l'enzyme. Dans certains cas, le substrat peut contenir des groupes ioniques, et le pH du milieu affecte l'affinité du substrat pour l'enzyme. Les différents groupements dissociables sont : α -COOH carboxyle ou α -NH₂ amine en bout de chaîne, NH imidazole de l'histidine, NH guanidine de l'arginine, SH sulfhydryle de la cystéine et OH phénolique de la tyrosine.

VII Les argiles

Les argiles sont généralement définies comme des matériaux naturels et abondants dans la nature avec une granulométrie fine. Les argiles présentent plusieurs propriétés qui peuvent justifier leurs utilisations dans de nombreuses applications industrielles. Les argiles présentent un intérêt croissant car leurs applications industrielles ne cessent de se diversifier. L'argile, qui fait l'objet de ce travail, est connue sous le nom de "Montmorillonite "ou « Bentonite » fait partie de la famille des smectites. Elle est largement utilisée dans de nombreux secteurs industriels. La Montmorillonite est utilisée

également comme catalyseur, notamment dans l'industrie pharmaceutique, ou comme membrane pour les procédés de filtration dans l'industrie agroalimentaire; elle est également utilisée pour les boues de forage dans l'industrie pétrolière. Les minéraux argileux comme le kaolin, la smectite et la palygorskite-sépiolite sont parmi les minéraux industriels les plus précieux au monde et d'une importance considérable. Ils sont très appropriés pour de nombreuses applications de capteurs chimiques [163-164]. En termes économiques, des matériaux peu coûteux et abondants et des méthodes de préparation faciles rendent certainement les argiles les plus utilisées. En termes de chimie verte, les protocoles et dispositifs analytiques respectueux de l'environnement, les déchets négligeables et les matériaux non toxiques font des argiles d'un intérêt considérable pour la communauté analytique. Le but ultime est d'utiliser la haute capacité d'échange de cations (CEC) et les propriétés catalytiques intrinsèques des minéraux argileux pour élaborer des capteurs chimiques polyvalents. En dehors de ces caractéristiques, les argiles induisent des contraintes spatiales et des effets chimiques de surface pouvant générer des propriétés sélectives, notamment pour la catalyse ou les supports catalytiques. En raison des propriétés uniques de l'argile, les électrodes argileuses chimiquement modifiées sont très appropriées pour de nombreuses applications de capteurs chimiques. L'argile par ses capacités de capteur de minéraux est une ressource pour la dépollution des eaux, un extrait d'une revue retranscrit l'effet de l'argile locale sur l'eau polluée tels que Cu^{2+} , Pb^{2+} et Cr^{3+} [165].

L'argile désigne un matériau naturel utilisé depuis la haute antiquité. Le mot « argile » vient du grec « argilos » de « argos » qui veut dire blanc, ou du latin « argilla » c'est la couleur blanche du matériau utilisé en céramique. En tant que matière première brute, l'argile se rapporte à la terre grasse et molle dont la fraction est inférieure à 2 micromètres. Les argiles sont constituées de minéraux très fins généralement des phyllosilicates ou silicate en feuillets.

VII.1 Structure des minéraux argileux

La classification adoptée par le comité de nomenclature de l'Association Internationale pour l'Etude des Argiles (AIPEA) varie avec les données structurales. La classification des argiles et leur nomenclature dépendent de leur composition chimiques et de l'ordre structural. Les minéraux argileux se caractérisent principalement par une structure en feuillets dans la plus part des cas, d'où leur appellation de phyllosilicates. Généralement, le feuillet est formé par deux types de couches : tétraédriques $[\text{SiO}_4]^{4-}$ et

octaédriques $[\text{Al}(\text{OH})_6]^{3-}$ reliées par une mise en commun d'oxygène O_2^- et des groupements OH^- . Ces liaisons s'établissent entre les hydroxyles de la couche octaédrique et les atomes d'oxygène de la couche tétraédrique.

VII.1.1 La couche tétraédrique

Elle est formée par un atome central le silicium, entouré de quatre atomes d'oxygène occupant les sommets (figure I.1). Chaque tétraèdre est lié aux autres tétraèdres voisins en partageant trois angles. L'association de six tétraèdres forme une cavité hexagonale. L'épaisseur de la couche tétraédrique est de 4,6 Å.

VII.1.2 La couche octaédrique

Elle est formée souvent par le cation Al^{+3} ou Mg^{+2} au centre et six atomes d'oxygène et des groupements hydroxyles disposés aux sommets de l'édifice. (Figure I.10). Les ions O^{2-} et OH^- ont tendance à se repousser et forment une charpente où peut être logée des cations qui assurent la stabilité électrostatique de l'ensemble de la structure. Chaque octaèdre est connecté aux autres octaèdres voisins en partageant uniquement les arêtes entre eux. L'épaisseur de cette couche octaédrique est de 5,05 Å (Figure I.10).

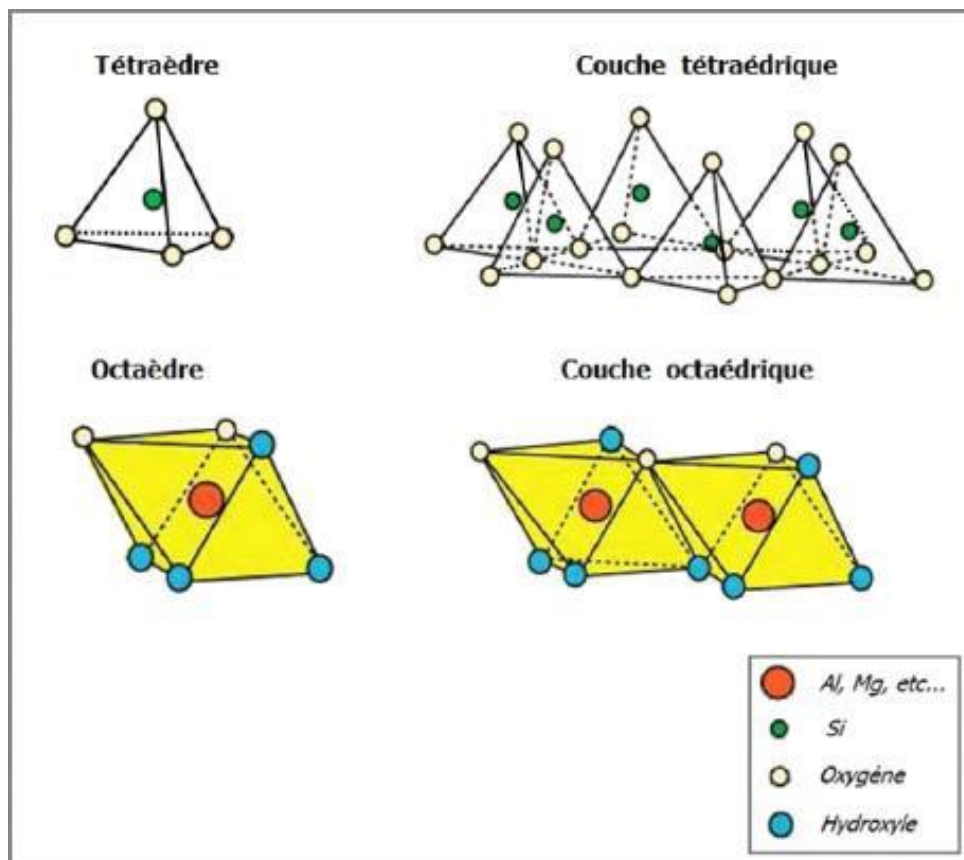


Fig. I.10: Représentation des couches tétraédrique, octaédrique et formation des feuillets^[166].

VII.2 Classification des minéraux argileux

Il existe différentes classifications des minéraux argileux dans la littérature. La première classification adoptée en 1966 par le comité de nomenclature de l'Association Internationale Pour L'Etude des Argiles (AIPEA) s'appuie sur les grandes données structurales. La deuxième prend en compte la localisation des substitutions, leur distribution et le type de cations compensateurs. La plus classique est basée sur l'épaisseur et la structure du feuillet, on distingue ainsi 3 groupes ^[167-169].

*Minéraux de type 1 :1 (TO)

La structure consiste en un feuillet tétraédrique «T» juxtaposé à un autre octaédrique «O» relié par leur base. L'ensemble des charges est reparti de telle sorte que le feuillet est électriquement neutre, son épaisseur est d'environ 7Å. Ce type minéral est représenté par le groupe kaolin, avec la formule générale $Al_2 Si_2 O_5 (OH)_4$. La kaolinite, le minéral le plus commun dans ce groupe, est souvent valorisée en céramique notamment dans la fabrication de la porcelaine.

*Minéraux de type 2:1 (TOT)

Ce type de minéraux est constitué d'une couche octaédrique située entre deux couches tétraédriques. Le feuillet de base est dit TOT. Son épaisseur varie de 10 à 12 Å. On distingue deux grandes familles pour ce type de minéraux à savoir l'illite et les smectites. Ici ces recherches porteront sur les smectites et leur feuillet de type 2:1 ou TOT car la bentonite appartient à cette famille.

*Minéraux de type 2 :1 :1 (TOTO)

Le feuillet de type 2 :1 :1 est constitué de l'alternance de feuillet T-O-T et d'une couche octaédrique interfoliaire. L'équidistance caractéristique est d'environ 14 Å. Le minéral argileux cristallisant dans cette structure correspond à la famille des chlorites.

VII.3 Les smectites

Les membres du groupe smectite comprennent les minéraux dioctaédriques montmorillonite, beidellite, natronite, et les minéraux trioctaédriques hectorite (riche en Li), saponite (riche en Mg) et sauconite (riche en Zn). Les couches sont continues dans les directions a et b, mais les liaisons entre les couches sont faibles et présentent un excellent clivage, permettant à l'eau et aux autres molécules d'entrer entre les couches provoquant une expansion dans la direction ^[170]. Les argiles smectites sont constituées de couches d'atomes d'oxygène chargés négativement à l'intérieur desquels plusieurs types de cations chargés positivement sont fixés dans des positions spécifiques. Dans un diagramme

schématique bidimensionnel de la structure (figure I.11), on peut voir quatre couches d'atomes d'oxygène qui définissent des feuilles tétraédriques supérieures et inférieures contenant des cations tétravalents (Si) et parfois trivalents (Al^{3+} et Fe^{3+}). Les sommets des tétraèdres sont dirigés l'un vers l'autre et les atomes d'oxygène aux sommets font partie d'une feuille octaédrique qui peut contenir des cations trivalents (Al, Fe), des cations divalents (Fe, Mg), des cations divalents et trivalents, ou cations divalents et monovalents (Li). La présence de deux feuilles tétraédriques et d'une feuille octaédrique est la base pour classer les structures de smectite en tant que phyllosilicates 2: 1. Les unités structurales Smectite 2: 1 sont séparées par des couches de cations hydratés tenus lâchement. Ces cations sont présents pour équilibrer la structure chargée négativement qui résulte des substitutions internes des ions trivalents pour la silice dans la feuille tétraédrique et spécialement des variations de la teneur en ions trivalents et divalents dans la feuille octaédrique. La surface intercalaire et l'hydratation cationique entre les unités structurales de smectite sont une propriété unique des argiles smectites. Les membres du groupe smectite d'argiles se distinguent par l'espèce et l'emplacement des cations dans les sites tétraédriques et octaédriques.

Dans une cellule à demi-unité contenant dix ions oxygène et deux ions hydroxyle, il existe quatre sites cationiques tétraédriques et trois sites cationiques octaédriques. Lorsque les deux tiers des sites octaédriques sont occupés par des cations trivalents, les structures sont classées comme dioctaédriques, et lorsque les trois sites octaédriques sont occupés par des cations divalents, les structures sont classées comme trioctaédriques. Les argiles de smectite ont des différences structurales et chimiques supplémentaires provoquées par des substitutions limitées de l'aluminium dans les sites tétraédriques. Une charge de surface négative est caractéristique de tous les minéraux argileux de smectite qui peut aller de 0,2 à $0,66e^-$ par $\text{S}_4 \text{O}_{10}$. La charge de surface négative nette résulte d'une déficience de charge positive structurale due à la substitution de cations de charge inférieure pour des cations de charge plus élevée, ainsi la charge négative nette devrait théoriquement être égale à la déficience de charge positive. Ces substitutions provoquent alors une augmentation de la charge négative de l'argile (perte de charge positive). Pour assurer alors la neutralité de l'ensemble, cette variation de charge est compensée par 2 phénomènes ^[171] (figure I.11) :

- * l'augmentation de la CEC (ajout de cations entre les feuillets dans l'espace interfoliaire ,soit par des cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+), soit par une couche octaédrique (cas des chlorites), qui agit également sur la distance entre les feuillets

* la perte de groupements OH- structuraux (la déhydroxylation).

La structure, la composition chimique, le type d'ions échangeables et la petite taille des cristaux d'argiles smectites sont responsables de plusieurs propriétés uniques, dont une grande surface active chimiquement, une capacité d'échange cationique élevée, des surfaces interlamellaires présentant des caractéristiques d'hydratation inhabituelles et parfois la capacité de modifier fortement le comportement d'écoulement des liquides. La montmorillonite et l'hectorite, dans lesquelles les substitutions ont principalement lieu dans la couche octaédrique, sont les plus répandues dans la nature donc les plus étudiées. La montmorillonite est une argile dioctaédrique de charge superficielle négative due essentiellement à la substitution du silicium de la couche tétraédrique par l'aluminium et de la substitution de l'aluminium de la couche octaédrique par Mg, Fe, Zn, ou Ni. Le défaut de charge créé par cette substitution sera neutralisé par des cations mobiles et facilement échangeables comme Na^+ , Ca^{2+} . (Figure I.11). La formule générale de la montmorillonite est : $\text{Si}_4 \text{O}_{10} \text{Al}_{2-x} \text{Mg}_x (\text{OH})_2 \text{M}_x$.

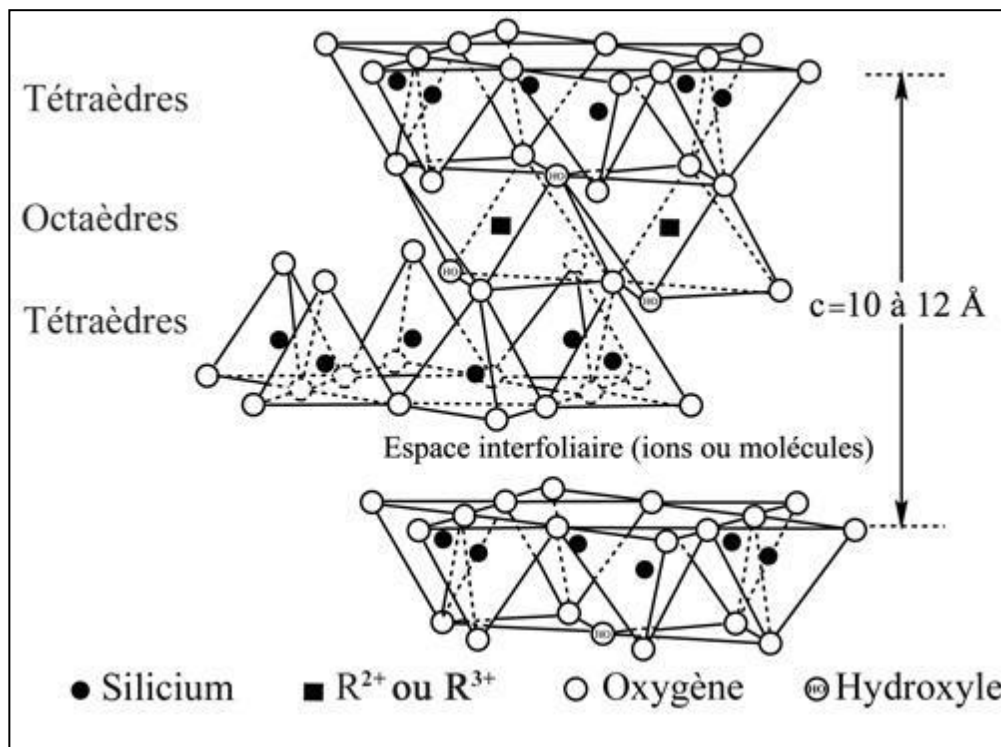


Fig. I-11 : Représentation schématique de la structure d'une argile de type TOT ^[172]

VII.3.1 Propriétés physicochimiques des smectites

VII.3.1.1 Surfaces spécifiques

L'une des caractéristiques des argiles, en particulier les smectites, est leur grande surface par rapport à leur masse (surface spécifique). Comme tous les minéraux finement divisés, cette caractéristique confère aux smectites la propriété d'adsorber de l'eau ou des molécules organiques. Deux surfaces spécifiques pour les smectites sont identifiées: la surface externe entre les particules et la surface interne correspondant à l'espace intercouche. La surface spécifique totale est définie comme la somme des deux (Tableau I.2).

Tableau I.1 Valeurs de la surface spécifique de certaines argiles ^[173].

Argiles	Surface interne (m ² /g)	Surface externe (m ² /g)	Surface spécifique totale (m ² /g)
Kaolinite	0	10-30	10-30
Illite	20-55	80-120	100-175
Smectites	600-700	80	700-800
Vermiculite	700	40-70	760
Chlorite	–	100-175	100-175

VII.3.1.2 Capacité d'échange de cations

Elle peut être définie comme étant le pouvoir d'adsorber ou d'absorber des espèces chimiques ioniques ou moléculaires sur la surface interne ou externe des feuillets d'argile. C'est la quantité de cations échangeables avec des modificateurs ioniques, exprimée en milli équivalents pour 100 g d'argile entièrement déshydratée. Cela dépend du nombre de sites accessibles, de la structure de l'argile ainsi que de la densité de charge de surface. Une CEC élevée et une densité de charge de surface uniforme favorisent l'échange des cations interfoliaires contre des ions inorganiques ou organiques. Par conséquent, le MMT est l'argile gonflante la plus favorable pour l'intercalation d'espèces organiques dans son espace intercouche. La taille du cation de compensation (à remplacer) a également un impact sur l'échange de cations. Plus le cation compensateur est petit et mobile, plus

l'échange cationique est facilité. Les cations compensateurs le plus fréquemment présents dans les argiles peuvent donc être classés par ordre croissant d'aide à l'échange cationique : $Cs^+ < Rb^+ < Ca^{2+} < Mg^{2+} < Na^+ < Li^+$. Par exemple, les cations K^+ , Cs^+ sont rarement échangeables car ils sont grands ou mal hydratés provoquant une forte attraction entre les feuilles conduisant à des distances inter-couches de l'ordre du nanomètre (feuilles effondrées). Le tableau 1.4 reprend les valeurs habituelles de la CEC de la smectite et d'autres argiles (Tableau I.3).

Tableau 1.2 Capacité d'échange cationique (CEC) de certaines argiles ^[173]

Argiles	CEC (meq / 100 g d'argile calcinée)
Kaolinite	5-15
Illite	10-40
Smectites	80-150
Vermiculite	100-150
Chlorite	10-40

VII.3.1.3 Interactions avec des composés inorganiques et organiques

La smectite, la vermiculite et d'autres minéraux argileux expansibles peuvent contenir des cations inorganiques relativement grands entre les couches. En raison de cette multivalence, l'espace inter-couche n'est occupé que partiellement par de tels cations inorganiques qui sont distribués dans l'espace comme des îles. Les hydroxy-polymères d'aluminium, de fer, de chrome, de zinc et de titane sont des exemples connus de matériaux intercalaires. La plupart d'entre eux sont thermiquement stables et tiennent comme des piliers pour permettre une structure poreuse dans l'espace intercouche. Les complexes résultants, souvent appelés argiles pilées, présentent des propriétés attrayantes en tant que catalyseurs, à savoir une grande surface spécifique, une porosité élevée, une taille de pores régulée. Les molécules organiques cationiques, telles que certaines amines aliphatiques et aromatiques, les pyridines et le bleu de méthylène, peuvent remplacer les cations échangeables inorganiques présents dans l'intercouche de minéraux expansibles. Les molécules organiques polaires peuvent remplacer l'eau adsorbée sur les surfaces externes et dans les positions intercouches. L'éthylène glycol et le glycérol sont connus pour former

des complexes spécifiques stables avec les smectites et les vermiculites. La formation de tels complexes est fréquemment utilisée pour identifier ces minéraux. À mesure que les molécules organiques recouvrent la surface d'un minéral argileux, la surface de ses particules constituantes passe d'hydrophile à hydrophobe, perdant ainsi sa tendance à se lier à l'eau.

VII.3.1.4 Gonflement des smectites

Cette propriété est généralement attribuée aux smectites, qui ont la caractéristique de gonfler en présence d'eau et sont appelées «argiles gonflantes». Leur capacité à absorber une grande quantité d'eau est favorisée par la grande surface spécifique qui a un grand nombre de cations compensateurs hydrophiles d'une part, et une flexibilité de feuille qui crée des pores à l'intérieur des feuilles, des particules et des agrégats, d'autre part. L'eau liée aux feuilles par hydratation cationique et l'eau libre contenue dans les pores peuvent être identifiées à différentes échelles. Lorsqu'une poudre d'argile smectique sèche entre en contact avec l'eau, trois étapes de gonflement se produisent. Au premier contact avec l'eau, les molécules d'eau pénètrent dans l'espace intercouche et hydrate les cations à travers une liaison cation-dipôle. Les molécules d'eau sont également adsorbées sur les surfaces des feuilles et forment successivement une première, une deuxième, puis une troisième pseudo-couche d'eau adsorbée, contribuant ainsi aux distances intercouches, respectivement, des valeurs distinctes de 1,2–1,5 et 1.9 nm sans valeurs intermédiaires. En augmentant encore la quantité d'eau, un gonflement osmotique se produit, provoquant une séparation des particules qui augmente la distance entre les couches de 19 à 40 Å. La zone de coexistence des deux distances intercouches 19 et 40 Å est appelée zone de "transition osmotique".

VII.3.2 Les argiles montmorillonites (bentonites)

La première exploitation de la bentonite aurait été découverte en 1890 dans la région de Fort-Benton situé à 650 km environ au Nord de Rock River (Wyoming, États Unies). Le terme bentonite a été proposé pour désigner une argile au toucher savonneux appartenant à la formation « Benton shale ». La bentonite fut découverte pour la première fois en 1847 près de Montmorillon, dans le département de Vienne (France). La bentonite appartient à un groupe de minéraux argileux formé à la suite du processus d'altération des cendres volcaniques. Le composant principal de la bentonite (plus de 60%) est la montmorillonite, un représentant des silicates stratiformes contenant quelques quantités de quartz et de petits adjuvants d'illite, de calcite, de mica, de chlorite et de grains de verre volcanique non

décomposés. La montmorillonite du groupe des smectites est un représentant des silicates stratiformes de type 2: 1. Il est constitué de paquets de deux couches de silicate tétraédrique et d'un octaèdre (métallo-hydroxyle) avec des marges adjacentes. À la suite du remplacement isomorphe de l'argile de la couche octaédrique par des cations de valence inférieure, une charge négative excessive apparaît sur la surface du paquet. Cette charge négative est compensée par l'adsorption des cations dans l'espace interfoliaire. Par conséquent, la classification la plus générale des bentonites est basée sur le type de cations dominant dans l'espace interfoliaire - sodium, calcium ou rarement magnésium. Dans une barrière argileuse, l'ammonium peut interagir avec l'argile par échange d'ions et affecter la texture et la perméabilité de l'argile résultante ^[174]. Comme les fonds des décharges sont probablement saturés de cations NH_4^+ , l'échange avec la barrière argileuse sera facilité. Pivato et Raga ^[175] ont montré que l'adsorption de l'ammonium dans les bentonites - compactées ou non - était importante et conseillait l'utilisation de ce type d'argile au fond des décharges pour limiter la pollution par l'ammonium. De même, Guyonnet et al. ^[176] ont montré que la préhydratation de l'argile avec un fluide semble favoriser l'accès du NH_4^+ aux sites d'échange lors de la percolation des lixiviats.

V- Procédés d'immobilisation des (bios) molécules

La technique d'immobilisation joue un rôle important dans l'élaboration des capteurs. L'association du (bio) récepteur et du transducteur est une étape délicate et les contraintes de la fonctionnalisation de la surface sont nombreuses. En effet, la méthode d'immobilisation des (bio) molécules doit être efficace pour être actives sur la surface du transducteur et stable dans les conditions d'utilisation ultérieures pour être reproductible, et garantir une bonne homogénéité des plots avec une densité de sondes élevée. La sélection d'une méthode d'immobilisation appropriée dépend, de la nature de la molécule biologique ou non, du type de transducteur utilisé, des propriétés physicochimiques de l'analyte et des conditions opératoires du biocapteur.

Plusieurs techniques d'immobilisation mènent à ce procédé et le choix dépend de l'application et aussi des contraintes. Diverses techniques d'immobilisation ont été comparées pour choisir celle qui présente une réponse avec des caractéristiques supérieures ^[177]. Il existe plusieurs techniques d'immobilisation subdivisées en procédés physiques et en procédés chimiques.

V.1 Procédés physiques d'immobilisation

La faiblesse de la liaison peut entraîner une perte du biorécepteur et une sensibilité élevée aux paramètres physico-chimiques (T, pH...). Ce type de rétention exploite la grande différence de taille entre la molécule sonde et la cible en créant une barrière semi-perméable pour retenir la molécule. Parmi les immobilisations qui appartiennent à cette catégorie :

V.1.1 Adsorption

C'est la méthode la plus simple et la plus rentable. Elle consiste à assurer la fixation des enzymes sur les surfaces des particules du support adsorbant par l'établissement d'interactions de faible énergie entre ses groupes fonctionnels et le support, telles que :

- Les forces de dispersion (Van der Waals).
- Les forces polaires résultant de la présence de champs électriques dans les micropores.
- Les liaisons hydrogènes dues aux groupements hydroxyles ou amines.

Le site actif de l'enzyme adsorbée n'est habituellement pas affecté, et une activité presque totale est conservée lors de l'adsorption. Cependant, elle présente des inconvénients comme la fragilité de la fixation qui peut mener à une désorption (sous l'action des variations de la température, pH, force ionique, concentrations...etc.) et aussi une mauvaise accessibilité au site actif à cause de l'orientation de la molécule.

V.1.2 L'encapsulation

Cette méthode consiste à l'inclusion des biomolécules dans une matrice tridimensionnelle. Lors de l'immobilisation dans une matrice polymère, la solution enzymatique est mélangée à la solution de polymère avant la polymérisation. L'enzyme contenant un gel polymérisé est soit extrudée, soit un gabarit est utilisé pour façonner les particules à partir d'un mélange polymère-enzyme liquide. Le piégeage et la fixation en surface peuvent être combinés dans certains cas. Ses avantages sont l'accès à la quantité (constante) de molécules immobilisées à l'intérieur de la matrice et la dénaturation naturelle observée en solution diminue. Son inconvénient c'est d'entraîner un temps de réponse plus important pour la diffusion des espèces jusqu'au détecteur à cause de la barrière diffusionnelle supplémentaire. La méthode d'inclusion physique consiste à incorporer le biorécepteur dans une matrice organique (polymère-nafion) ^[180-181], ou inorganique (le chitosane ^[182], la gélatine, l'agarose).

V.2 Procédés chimiques d'immobilisation

V.2.1 Le greffage chimique

La liaison covalente est l'une des méthodes les plus largement utilisées pour l'immobilisation enzymatique irréversible. Le groupe fonctionnel qui participe à la liaison de l'enzyme implique généralement une liaison via les chaînes latérales de la lysine (groupe ϵ -amino), de la cystéine (groupe thiol) et des acides aspartique et glutamique (groupe carboxylique ^[184-185], imidazole et phénolique groupes qui ne sont pas essentiels pour l'activité catalytique de l'enzyme) ^[186].

V.2.2 La réticulation

Cette technique est principalement utilisée pour la fixation des enzymes ou des anticorps et une protéine de charge (généralement l'albumine du sérum bovin –BSA) avec l'utilisation d'agents bi ou multifonctionnel dit réticulant comme le glutaraldéhyde ^[189-190]. Cet agent bifonctionnel possède à ces extrémités deux groupements aldéhyde afin d'assurer la liaison. Elle peut être effectuée après inclusion ou adsorption afin de stabiliser l'enzyme immobilisée et limiter les phénomènes de fuites ou de désorption. Pour pallier à cet effet, la réticulation est utilisée en complément avec d'autres méthodes, comme l'adsorption, on parle alors de co-réticulation ^[191-193].

V.2.3 L'ancrage par interactions affines

L'ancrage par interactions affines permet l'immobilisation d'une biomolécule sur l'électrode, en utilisant l'affinité entre différentes molécules, par un point d'attache unique. C'est l'étape qui correspond à la formation d'un « complexe » affin. Les systèmes d'affinité les plus utilisés de nos jours sont les suivants : avidine/biotine, adamantane/ β -cyclodextrine et NTA/Métal ²⁺/histidine.

V.3 Utilisation des argiles pour l'immobilisation des enzymes

De nombreuses études suggèrent que les minéraux argileux stratifiés d'origine naturelle peuvent être utilisés comme une classe de supports solides biocompatibles pour immobiliser les enzymes ^[203-208]. Les hybrides d'enzymes minérales argileuses correspondantes s'avèrent avoir de grands potentiels dans des processus biocatalytiques et biocapteurs. L'immobilisation de l'enzyme sur les minéraux argileux peut être réalisée par adsorption non covalente et liaison covalente. L'immobilisation non covalente implique des forces de van der Waals, des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène et

des interactions hydrophobes. Pour éviter la désorption des enzymes, l'immobilisation peut être réalisée par liaison covalente directe entre les enzymes et les minéraux argileux. La modification organique des minéraux argileux et l'addition de molécules de liaison sont faites pour améliorer l'immobilisation de manière à augmenter le chargement, l'activité et la stabilité des enzymes. Intrinsèquement, les interactions dépendent du type de minéraux argileux et d'enzymes. De plus, pour un minéral argileux donné, différentes surfaces et différents sites se comportent différemment vis-à-vis des molécules adsorbantes d'enzymes. Enfin, il convient de souligner que bien que l'immobilisation des enzymes sur les minéraux argileux par adsorption non covalente soit simple et facile, les interactions telles que les interactions électrostatiques ^[209], les liaisons hydrogène, les forces van der Waals et les interactions hydrophobes sont faibles par rapport aux liaisons covalentes ^[210-211]. De plus, la stabilité de la liaison non covalente argiles-enzymes est considérablement affectée par les conditions environnementales (pH, température, force ionique et concentration de biomolécules, etc.)^[212]. Par conséquent, les hybrides d'enzymes minérales argileuses fabriqués à partir d'une immobilisation non covalente ont le problème de la désorption. En conséquence, une telle lixiviation d'enzymes dans un système en phase liquide engendre une perte rapide de l'activité des composites d'enzymes minérales argileuses en tant que catalyseurs ou biocapteurs.

***Immobilisation non covalente**

L'immobilisation non covalente des enzymes peut être réalisée par adsorption physique ou chimique directe sur des minéraux argileux ^[213]. Les smectites ont une capacité d'échange de cations élevée qui s'avère plus favorable à l'augmentation de la capacité d'absorption des enzymes. En principe, un degré plus élevé de substitution isomorphe dans les minéraux argileux conduit à une densité de charge de couche plus élevée et à une capacité d'échange de cations plus élevée. Les smectites constituent une classe naturelle de catalyseurs inorganiques et ont une forte affinité pour l'adsorption des protéines ^[214-215].

En ce qui concerne les smectites de type 2: 1 fréquemment utilisées, la substitution isomorphe entraîne des charges négatives permanentes sur les couches, équilibrées par des cations échangeables (par exemple, Na⁺ ou Ca⁺²) dans l'espace intercouche. En conséquence, des molécules d'enzymes chargées positivement, comme la catalase et la β -glucosidase, sont introduites dans l'espace intermédiaire par des réactions d'échange cationique, lorsque le pH de la solution enzymatique est inférieur au point isoélectrique de

l'enzyme ^[216-217]. En outre, la nature hydrophile des minéraux argileux peut être convertie en hydrophobe en remplaçant les cations échangeables dans l'espace intercouche avec des molécules organiques cationiques pour former ce que l'on appelle les "organoclays". (Figure I.12). Une telle modification hydrophobe de la surface interne de l'argile minérale permet à de nombreuses molécules hôtes y compris les enzymes, d'être facilement intercalées ^[218-219]. De manière notable, la modification hydrophobe peut également être appliquée principalement sur les surfaces externes d'un minéral argileux, plutôt que sur l'espace intercouche. En raison de la limitation de la hauteur de l'espace intercouche des minéraux argileux, une méthode alternative consiste à le prétraiter en remplaçant les cations inorganiques dans l'espace intercouche par des cations organiques volumineux comme mentionné ci-dessus dans la modification hydrophobe de la surface interne du minéral argileux ^[220-223].

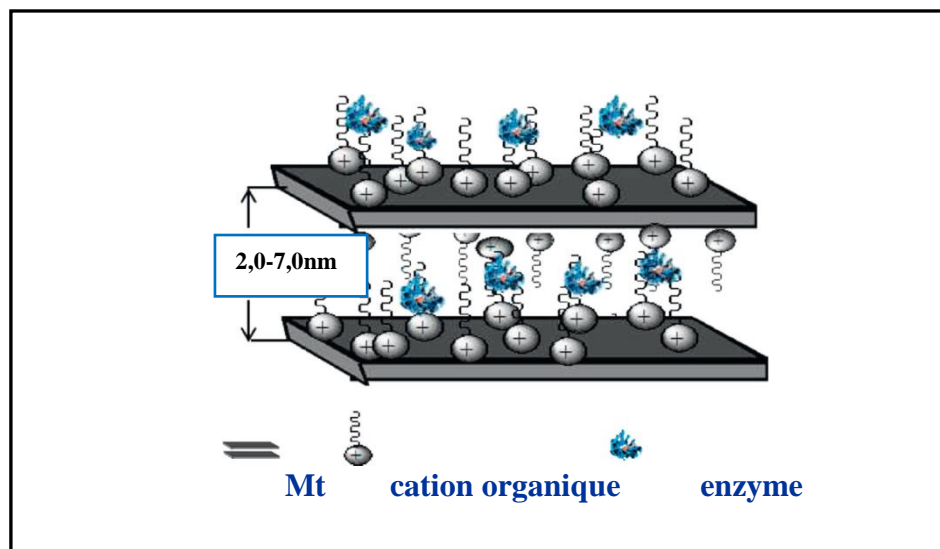


Figure I.12: Modification hydrophobe dans l'espace intercouche de minéraux argileux pour immobiliser les enzymes par intercalation et adsorption (En fonction de la taille des cations organiques intercalés, la hauteur de la galerie varie entre ~ 2,0 et 7,0 nm) ^[224]

La bentonite, par exemple, présente plusieurs avantages pour son utilisation comme support permettant une fixation facile des biomolécules ^[225]. Les hybrides d'enzymes bio-organo-argiles résultants présentaient une bonne conservation de la bioactivité du système enzymatique dans l'interface. En Outre les interactions électrostatiques et l'interaction hydrophobe, la formation de liaisons hydrogène et de ponts salins ^[226-228] peut également être utilisée pour fixer des enzymes sur des minéraux argileux. Par exemple, H⁺ dans la

montmorillonite activé par un acide peut servir de centres pour la liaison d'enzymes par la formation de liaisons hydrogène par l'interaction entre H^+ et le groupe d'enzymes $-NH_2$ (figure I.13). En outre, les groupes silanol au bord de chaque couche de minéraux argileux peuvent immobiliser l'enzyme en raison de la formation de liaisons hydrogène entre $-Si-OH$ et les molécules d'enzyme. En outre, la déprotonation des groupes hydroxyle sur la surface des minéraux argileux conduit à des sites chargés négativement variables, par exemple $-Si-O^- -Al-O^-$ sur les bords des minéraux argileux. Sur de tels sites, les enzymes positives sont également facilement adsorbées et fixées principalement par les interactions électrostatiques ^[229] (Figure I.13). La quantité des sites chargés négativement est liée à la déprotonation de l'hydroxyle de surface aux bords des minéraux argileux (figure I.14), de sorte qu'il peut être ajusté en changeant le pH de la solution utilisée pour le processus d'imprégnation.

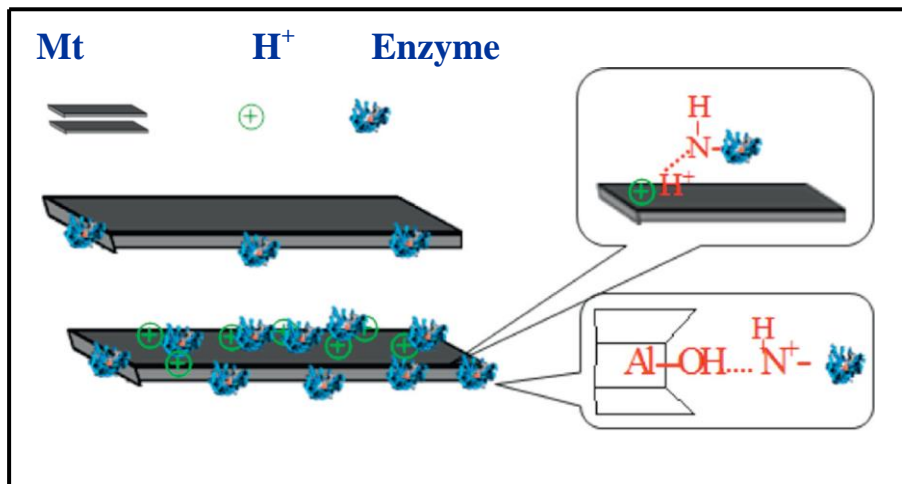


Figure I.13 : Immobilisation des enzymes sur les minéraux argileux par liaison hydrogène ^[224].

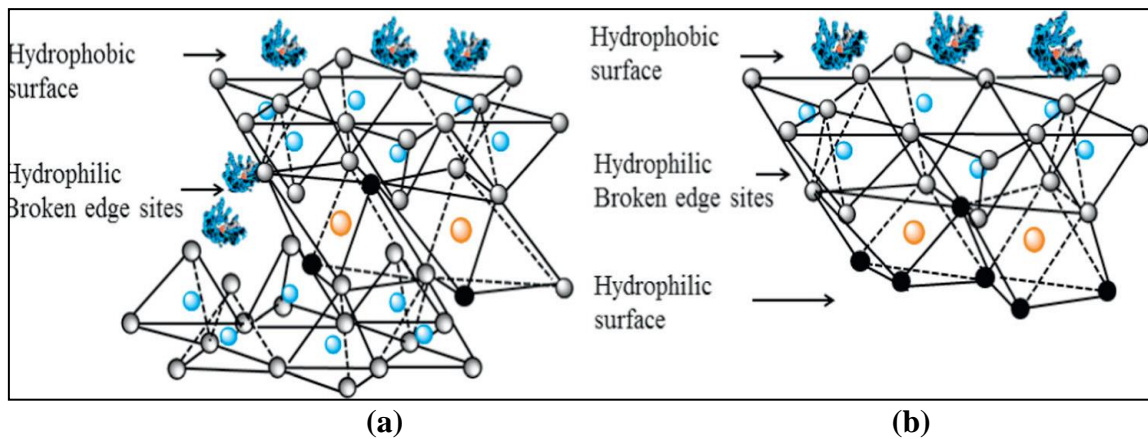


Figure I.14. Surfaces et sites sur les minéraux argileux de type 2: 1 (a) et (b): sites hydrophobes et hydrophiles ^[224].

* Immobilisation covalente

L'immobilisation covalente sur des minéraux argileux peut être obtenue par la formation de liaisons covalentes directement entre les groupes fonctionnels greffés à la surface des minéraux argileux et les groupes fonctionnels des enzymes. Jusqu'à présent, la présence des agents fonctionnels tels que glutaraldehyde GA, chitosan et le chlorhydrate de 1-éthyl-3-(3-diméthyl-aminopropyl) carbodimide (EDC) s'est révélé efficace. Néanmoins, il convient de souligner que les avantages de la modification de la surface des minéraux argileux sont multiples. Par exemple, les minéraux argileux greffés en GA peuvent fournir une aire d'hydrophile, de porosité et d'adhérence variée, et une résistance au transfert de masse réduite pour l'immobilisation des enzymes ^[230-232]. En outre, les molécules de chitosane possèdent des groupes hydroxyle (OH) et amine (NH₂), qui peut être facilement liés aux enzymes ^[233] (Figure I.15). Certains chercheurs ont révélé que de telles enzymes immobilisées conservent une activité élevée dans une gamme de pH plus large que les enzymes libres ^[234]. Par exemple, Chang et Juang ^[235] ont étudié l'activité et la stabilité d'enzymes immobilisées sur des nanocomposites d'argile minéral-chitosan. De plus, la modification de la surface et la liaison covalente avec deux ou plusieurs agents de réticulation enzymatiques multifonctionnels se révèlent favorables à la formation d'une structure réticulaire 3D insoluble sur la surface des minéraux argileux pour l'immobilisation de l'enzyme. Plus tôt, Rorrer et al. ^[236] ont démontré que des minéraux argileux étaient modifiés avec du chitosane qui était ensuite réticulé avec GA pour une

immobilisation covalente (figure I.15). L'enzyme a ensuite été immobilisée avec succès à la surface des minéraux argileux par l'interaction entre l'enzyme et GA.

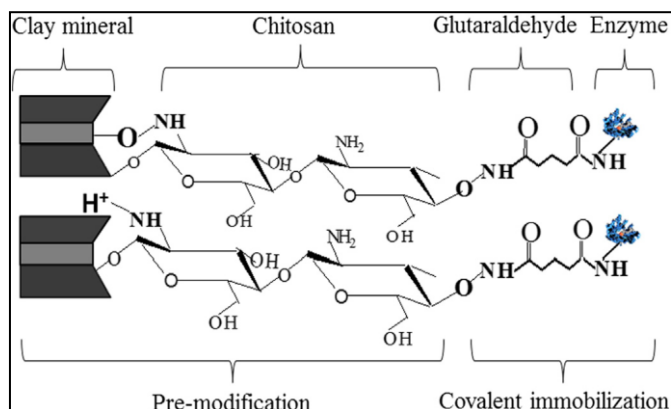


Figure I.15 : L'activation des minéraux argileux pour immobiliser l'enzyme par la formation de liaison covalente ^[224]

Cette modification est généralement issue de la synthèse des organo-argiles, basée sur les mécanismes des réactions que les minéraux argileux peuvent avoir avec les composés organiques. Les cations inter-couches peuvent être échangés par différents types de cations organiques. Seules les minéraux argileux de type 2: 1 qui fournissent les groupes silanol et aluminol sur la surface du bord, réagissent avec l'agent organique par des réactions de greffage. Des chercheurs ont montré que des smectites modifiées avec de l'aminopropyle et du propyl triméthylammonium se sont avérées avec des applications attrayantes comme supports d'immobilisation pour des enzymes en ce qui concerne leur utilisation possible comme films enzyme-argile sur des surfaces d'électrodes solides pour des applications de biocapteurs ampérométriques. La smectite modifiée avec de l'aminopropyle a été utilisée pour ancrer des biomolécules par liaison covalente et a été appliqué à l'immobilisation de la glucose oxydase. La smectite modifiée avec le propyltriméthylammonium présentait des interactions électrostatiques favorables avec les enzymes chargées négativement et ont été appliquées pour l'ancrage polyphénol oxydase. Lorsqu'ils ont été déposés sur des surfaces d'électrodes en platine ou en carbone vitreux en tant que films enzyme-organo-argile, ces systèmes ont été évalués en tant que dispositifs électrochimiques de biosensibilité pour la détection du glucose et du catéchol ^[237-238].

VI- Classification des (bios) capteurs chimiques

Le type de reconnaissance moléculaire détermine le type de transducteur utilisé. Les capteurs sont généralement classés en fonction de la nature des récepteurs et des

transducteurs qui les composent (Tableau I.3), selon le mode de transduction en 4 catégories : optique, thermique, piézoélectrique et électrochimique. Dans ce qui suit, on s'est intéressé à définir la transduction électrochimique qui sera utilisée comme mode de transduction des (bio) capteurs développés au cours de cette thèse.

Tableau I.3 : Différents types de transducteurs.

Transducteurs	Méthodes de détection
Thermique	Chaleur thermique de la réaction / chaleur d'adsorption.
Optique	Fluorescence/ SPR.
Electrochimique	Potentiométrie / ampérométrie / voltamétrie.
Piézoélectrique	Microbalance à cristaux de quartz ou QCM

VI.4 Les capteurs électrochimiques.

Un capteur électrochimique est un dispositif intégré qui fournit des informations analytiques, quantitatives ou semi-quantitatives, en utilisant une stratégie de reconnaissance impliquant un transducteur électrochimique (par exemple, une électrode ou un transistor à effet de champ). Les capteurs électrochimiques opèrent dans les milieux liquides et gazeux de manière continue. Les transducteurs électrochimiques avec ou sans fonctionnalisation exploite la présence des charges électriques dans l'analyte. Les interactions entre les molécules chargées présentes sur la surface de la couche engendrent une variation des caractéristiques électriques du capteur. Un capteur électrochimique est généralement un système composé de deux ou trois électrodes : de travail, de référence et une auxiliaire. Il existe différents types de capteurs électrochimiques qui sont classés selon leur mode de transduction :

- potentiométrique.
- Ampérométrie.
- Impédancemétrie.

Références bibliographiques du chapitre I

- [1] Turner, A.P.F., Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.*, 42, 3184-3196 (2013).
- [2] Wan, Y., Su, Y., Zhu, X., Liu, G., and Fan, C., *Biosens. Bioelectron.*, 47, 1-11 (2013).
- [3] Smith, R. G.; D'Souza, N.; Nicklin, S. *Analyst* **2008**, 133, 571-584.
- [4] Banica, F.G., *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*, Wiley (2012).
- [5] Gertrude Wenga. Thèse de doctorat Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Rennes 1, 2013. France.
- [6] Clark, L. C. J. ; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, 102, 29-45.
- [7] Updike, S. J. ; Hicks, G. P. *Science* **1967**, 158, 270-272.
- [8] Guilbault, G. G. ; Montalvo, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 2164-2165.
- [9] Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, 249, 505-510.
- [10] Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, 346, 818-822.
- [11] Labib, M.; Zamay, A. S.; Kolovskaya, O. S.; Reshetneva, I. T.; Zamay, G. S.; Kibbee, R. J.; Sattar, S. A.; Zamay, T. N.; Berezovski, M. V, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 8966-8969.
- [12] Labib, M.; Zamay, A. S.; Muharemagic, D.; Chechik, A. V.; Bell, J.C.; Berezovski, M. V? *Anal. Chem.* **2012**, 84, 1813-1816.
- [13] Wehbe, M.; Labib, M.; Muharemagic, D.; Zamay, A. S.; Berezovski, M. V. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 67, 280-286.
- [14] Swensen, J. S.; Xiao, Y.; Ferguson, B. S.; Lubin, A. A.; Lai, R. Y.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W.; Soh, H. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4262-4266.
- [15] Labib, M.; Zamay, A. S.; Berezovski, M. V, *Analyst* **2013**, 138, 1865-1875.
- [16] Giamberardino, A.; Labib, M.; Hassan, E. M.; Tetro, J. A.; Springthorpe, S.; Sattar, S. A.; Berezovski, M. V.; DeRosa, M. C. *PLoS One* **2013**, 8, e79087.
- [17] Iqbal, A.; Labib, M.; Muharemagic, D.; Sattar, S.; Dixon, B. R.; Berezovski, M. V. *PLoS One* **2015**, 10, e0137455.
- [18] Labib, M.; Berezovski, M. *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*; Springer: Berlin, Heidelberg, **2014**; Vol. 140.
- [19] Wan, Y.; Zhou, Y. G.; Poudineh, M.; Safaei, T. S.; Mohamadi, R.M.; Sargent, E. H.; Kelley, S. O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, 53, 13145-13149.
- [20] Moscovici, M.; Bhimji, A.; Kelley, S. O. *Lab Chip* **2013**, 13, 940-946.

- [21] Zhao, S.; Yang, W.; Lai, R. Y, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 2442–2447.
- [22] Baker, B. R.; Lai, R. Y.; Wood, M. S.; Doctor, E. H.; Heeger, A. J.; Plaxco, K. W. J. *Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 3138–3139.
- [23] Lai, R. Y.; Plaxco, K. W.; Heeger, A. J. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 229–233.
- [24] Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. *Analyst* **2011**, 136, 257–274.
- [25] Tan, L. H.; Xing, H.; Lu, Y, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 1881–1890.
- [26] Sefah, K.; Phillips, J. A.; Xiong, X.; Meng, L.; Van Simaey, D.; Chen, H.; Martin, J.; Tan, W. *Analyst* **2009**, 134, 1765–1775.
- [27] Cosnier, S. *Anal. Lett.* **2007**, 40, 1260-1279.
- [28] Piao, M.-H., Noh, H.-B., Rahman, M.A., Won, M.-S., and Shim, Y.-B., *Electroanalysis*, **20**, 30-37 (2008).
- [29] Zehani, N.; Fortgang, P.; SaddekLachgar, M.; Barak, A.; Arab, M.; Dzyadevych, S. V.; Kherrat, R.; Jaffrezic-Renault, N. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 74, 830-835.
- [30] Yin, H.; Zhou, Y.; Xu, J.; Ai, S.; Cui, L.; Zhu, L. *AnalyticaChimicaActa* **2010**, 659, 144-150.
- [31] Wu, L.; Deng, D.; Jin, J.; Lu, X.; Chen, J. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 35, 193-199.
- [32] Alkasir, R. S. J.; Ganesana, M.; Won Y.- H.; Stanciu, L.; Andreescua, S. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, 43-49.
- [33] Dempsey, E.; Diamond, D.; Collier, A. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, 20, 367-377.
- [34] Portaccio, M.; Tuoro, D. D.; Arduini, F.; Moscone, D.; Cammarota, M.; Mita, D. G.; Lepore, M. J. *Electrochim. Acta*, **2013**, 109, 340-347.
- [35] Wang, X.; Reisberg, S.; Serradji, N.; Anquetin, G.; Pham, M. C.; Wu, W.; Dong, C.-Z.; Piro, B. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 53, 214-219.
- [36] Piao, M. -H.; Noh, H. -B.; Rahman, M. A.; Won, M. -S.; Shim, Y. -B. *Electroanalysis* **2008**, 20, 30-37.
- [37] Rahman, M. A.; Shiddiky, M. J. A.; Park, J. S.; Shim, Y. B. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2464-2470.
- [38] Hayat, A.; Marty, J. L. *Frontiers in Chemistry* **2014**, 2, 1-9.
- [39] Kim, Y. S.; Raston, N. H. A.; Gu, M. B. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 76, 2-19.
- [40] Cho, A. J.; Lee, J. W., Ellington, A. D. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, 2, 241 264.
- [41] Iliuk, A. B.; Hu, L. H.; Tao, W. A. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 4440-4452.
- [42] Haddache, F.; Le Goff, A.; Reuillard, B.; Gorgy, K.; Gondran, C.; Spinelli, N.; Defrancq, E; Cosnier, S. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 15555-15560.

- [43] Piro, B.; Shi, S., Reisberg S., Noël, V., Anquetin, G., *Biosensors*, **2016**, 6, 1-22.
- [44] Famulok, M.; Mayer, G. *Chemistry & Biology* **2014**, 21, 1055-1058.
- [45] Martin, J.A., Smith, J.E., Warren, M., Chávez, J.L., Hagen, J.A., Kelley-Loughnane, N. *Assay*. (**2015**).
- [46] Stoltenburg, R., Reinemann, C., and Strehlitz, B., *Biomolecular Engineering*, Vol.24, pp.381-403, **2007**.
- [47] Benjamin Madru. *Universite Pierre et Marie Curie - Paris VI*, **2010**.
- [48] C. Tuerk, L. Gold , *Science*, 505–510, **1990**.
- [49] A.D. Ellington, J.W. Szostak ; *Nature*, 818–822, **1990**
- [50] D.L. Robertson, G.F. Joyce ; *Nature*, 467–468, **1990**.
- [51] Zhang, Y., Cheng, Y., Zhou, Y., Li, B., Gu, W., Shi, X., and Xian, Y., *Talanta*, 107, 211-218 (**2013**).
- [52] Piao, M.-H., Noh, H.-B., Rahman, M.A., Won, M.-S., and Shim, Y.-B, *Electroanalysis*, 20, 30-37 (**2008**).
- [53]. Rahman, M.A., Shiddiky, M.J.A., Park, J.-S., and Shim, Y.-B. *Biosens. Bioelectron.*, 22, 2464-2470 (**2007**).
- [54] Xu, Z., Kuang, H., Yan, W., Hao, C., Xing, C., Wu, X., Wang, L., and Xu, C, *Biosens. Bioelectron.*, 32, 183-187 (**2012**).
- [55] https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_désoxyribonucléique(consulté le 30-04-2018).
- [56] P. Yakovchuk, E. Protozanova, M.D. Frank-Kamenetskii, *Nucl. Acids Res.*34 (**2006**) 564.
- [57] Pavlov, V., Xiao, Y., Shlyahovsky, B., Willner, I., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11768-11769.
- [58] Langer, R., Farokhzad, O. C., Cheng, J., Teply, B. A., et al., *Proceedings of the NationalAcademy of Sciences* **2006**, 103, 6315-6320.
- [59] Pyell, U., *Electrophoresis* **2010**, 31, 814-831.
- [60] Joséphine Ruta. *Thèse de doctorat. , 2008*, Université Joseph-Fourier - Grenoble I. France.
- [61] Feigon J., Dieckmann T. and Smith F. W. *Chemistry & Biology*, **1996**, 3, (8), 611-617.
- [62] Patel D. J., *Current Opinion in Chemical Biology*, **1997**, 1, (1), 32-46.
- [63] Patel D. J., Suri A. K., Jiang F., Jiang L., Fan P., Kumar R. A. and Nonin S., *Journal of Molecular Biology*, **1997**, 272, (5), 645-664.
- [64] Hermann T. and Patel D. J., *Science*, **2000**, 287, (5454), 820-825.

- [65] Patel D. J. and Suri A. K., *Reviews in Molecular Biotechnology*, **2000**, 74, (1), 39-60.
- [66] S.A. Woodson, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 9, n° 2, avril **2005**, p. 104-9.
- [67] Chauveau, F., Pestourie, C. & Tavitian, B. *Pathol. Biol.* 54, 251–258 (**2006**).
- [68] Olivier Martinez. Thèse de doctorat. Université Toulouse 3 Paul Sabatier. France. (**2013**)
- [69] Somia Mehennaoui. Thèse de doctorat. Université de Québec- Montréal. (**2016**).
- [70] Osborne S. E. and Ellington A. D. *Chemical Reviews*, **1997**, 97, (2), 349-370.
- [71] Osborne S. E., Matsumura I. and Ellington A. D; *Current Opinion in Chemical Biology*; **1997**, 1, (1), 5-9.
- [72] Wilson D. S. and Szostak J. W., *Annual Review of biochemistry*, **1999**, 68, (1), 611-647.
- [73] Famulok M., Mayer G. and Blind M., *Accounts of Chemical Research*, **2000**, 33, (9), 591-599.
- [74] Bowser M. T., *Analyst*, **2005**, 130, (2), 128-130.
- [75] Stoltenburg R., Reinemann C. and Strehlitz B., *Biomolecular Engineering*, **2007**, 24, (4), 381-403.
- [76] Jayasena SD, *Clinical Chemistry* **1999**, 45:1628-1650.
- [77] Ellington AD, Szostak JW, *Nature* **1990**, 346:818-822.
- [78] Tuerk C, Gold L, *Science* **1990**, 249:505-510
- [79] Fabien Brothier. Université Pierre et Marie Curie. **2014**. Paris. France
- [80] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz. *Biomolecular Engineering* 24 (**2007**) 381–403.
- [81] W. James, in R.A. Meyers (Editor), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, **2000**, p. 4848.
- [82] F. Chauveau, C. Pestourie, B. Tavitian, *Pathologie Biologie* 54 (**2006**) 251.
- [83] Y. Guo, G. Shen, X. Sun, X. Wang, , *IEEE Sensors J.* 15 (**2015**) 1951–1958.
- [84] L. Hou, L. Jiang, Y. Song, Y. Ding, J. Zhang, X. Wu, D. Tang, *Acta* 183 (**2016**) 1971–1980.
- [85] X. Qin, W. Guo, H. Yu, J. Zhao, M. Pei, *Anal. Methods* 7 (**2015**) 5419–5427.
- [86] M. Roushani, F. Shahdost-fard, *Mater. Sci. Eng. C* 68 (**2016**) 128–135.
- [87] S.M. Taghdisi, N.M. Danesh, A.S. Emrani, M. Ramezani, K. Abnous, *Biosens. Bioelectron.* 73 (**2015**) 245–250.
- [88] Z. Zhao, H. Chen, L. Ma, D. Liu, Z. Wang, *Analyst* 140 (**2015**) 5570–5577.

- [89] L. Zhou, J. Wang, D. Li, Y. Li, An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles dotted graphene modified glassy carbon electrode for label-free detection of bisphenol A in milk samples, *Food Chem.* 162 (2014) 34–40.
- [90] A.-L. Sun, Y.-F. Zhang, G.-P. Sun, X.-N. Wang, D. Tang, *Biosens. Bioelectron.* 89 (2015) 659–665.
- [91] M. Chen, N. Gan, H. Zhang, Z. Yan, T. Li, Y. Chen, Q. Xu, Q. Jiang, *Microchim. Acta* 183 (2016) 1099–1106.
- [92] P. Luo, Y. Liu, Y. Xia, H. Xu, G. Xie, *Biosens. Bioelectron.* 54 (2014) 217–221.
- [93] M. Roushani, F. Shahdost-fard, *Anal. Chim. Acta* 853 (2015) 214–221.
- [94] X. Sun, F. Li, G. Shen, J. Huang, X. Wang, *Analyst* 139 (2014) 299–308.
- [95] A. Bagheri Hashkavayi, J. Bakhsh Raouf, R. Azimi, R. Ojani, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 2557–2565.
- [96] A. Bagheri Hashkavayi, J. Bakhsh Raouf, R. Ojani, E. Hamidi Asl, *Electroanalysis* 27 (2015) 1449–1456.
- [97] G. Bulbul, A. Hayat, S. Andreescu, *Nano* 7 (2015) 13230–13238.
- [98] R. Rapini, A. Cincinelli, G. Marrazza, *Talanta* 161 (2016) 15–21.
- [99] L. Rivas, C.C. Mayorga-Martinez, D. Quesada-González, A. Zamora-Gálvez, A. de la Escosura-Muñiz, A. Merkoçi, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5167–5172.
- [100] G. Evtugyn, A. Porfireva, V. Stepanova, R. Sitdikov, I. Stoikov, D. Nikolelis, T. Hianik, *Electroanalysis* 26 (2014) 2100–2109.
- [101] W. Xu, Y. Wang, S. Liu, J. Yu, H. Wang, J. Huang, *New J. Chem.* 38 (2014) 4931–4937.
- [102] W. Guo, N. Sun, X. Qin, M. Pei, L. Wang, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 691–697.
- [103] D. Jiang, X. Du, Q. Liu, L. Zhou, L. Dai, J. Qian, K. Wang, *Analyst* 140 (2015) 6404–6411.
- [104] X. Qin, Y. Yin, H. Yu, W. Guo, M. Pei, *Biosens. Bioelectron.* 77 (2016) 752–758.
- [105] X. Zhan, G. Hu, T. Wagberg, S. Zhan, H. Xu, P. Zhou, *Microchim. Acta* 183 (2016) 723–729.
- [106] I. Palchetti, M. Mascini, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3103–3114.
- [107] F. Arduini, S. Cinti, V. Scognamiglio, D. Moscone, *Microchim. Acta* (2016) 1–21.
- [108] R.K. Mishra, A. Hayat, G. Catanante, C. Ocaña, J.-L. Marty, *Anal. Chim. Acta* 889 (2015) 106–112.

- [109] K. Yugender Goud, G. Catanante, A. Hayat, S.M.K. Vengatajalabathy Gobi, J.L.Marty, *Sensors Actuators B Chem.* 235 (2016) 466–473.
- [110] A. Hayat, J.L. Marty, *Front. Chem.* 2 (2014) 41.
- [111] N.M. Danesh, M. Ramezani, A.S. Emrani, K. Abnous, S.M. Taghdisi, *Biosens. Bioelectron.* 75 (2016) 123–128.
- [112] A. Vasilescu, J.L. Marty, *Anal. Chem.* 79 (2016) 60–70.
- [113] G. Istamboulié, N. Paniel, L. Zara, L.R. Granados, L. Barthelmebs, T. Noguier, *Talanta* 146 (2016) 464–469.
- [114] Joy Sebastian Prakash, Karunanithi Rajamanickam, *Biomedicines* 2015, 3, 248-269.
- [115] Ezat Hamidi-Asl, Freddy Dardenne, Sanaz Pilehvar, Ronny Blust, Karolien De Wael, *Chemosensors* 2016, 4(3), 16.
- [116] Thiel, K.W.; Giangrande, P.H, *Ther. Deliv.* 2010, 1, 849–861.
- [117] Avino, A.; Fabrega, C.; Tintore, M.; Eritja, R, *Curr. Pharm. Des.* 2012, 18, 2036–2047.
- [118] McNamara, J.O., 2nd; Andrechek, E.R.; Wang, Y.; Viles, K.D.; Rempel, R.E.; Gilboa, E.; Sullenger, B.A.; Giangrande, P.H, *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 1005–1015.
- [119] Thiel, K.W.; Hernandez, L.I.; Dassie, J.P.; Thiel, W.H.; Liu, X.; Stockdale, K.R.; Rothman, A.M.; Hernandez, F.J.; McNamara, J.O., 2nd; Giangrande, P.H, *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, 6319–6337.
- [120] Thiel, K, *Nat Biotechnol.* 2004, 22(6): 649-51.
- [121] Kim, Y. M., K. H. Choi, Y. J. Jang, J. Yu, S. Jeong, *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 300(2): 516-23.
- [122] Mojgan Ahmadzadeh Raji, Ghasem Amoabediny, Parviz Tajik, Morteza Hosseini, Ebrahim Ghafar-Zadeh, *Sensors* 2015, 15(9), 22291-22303.
- [123] Feng, L.; Chen, Y.; Ren, J.; Qu, X, *Biomaterials* 2011, 32, 2930–2937.
- [124] Muhammad Azhar Hayat Nawaz, Sajid Rauf, Gaelle Catanante, Mian Hasnain Nawaz, Gilvanda Nunes, Jean Louis Marty, Akhtar Hayat, *Sensors* 2016, 16(10).
- [125] Azrul Syafiq Zainol Abidin, Ruslinda A. Rahim, Mohd Khairuddin Md Arshad, Mohd Faudzi Fatin Nabilah, Chun Hong Voon, Thean-Hock Tang, Marimuthu Citartan, *Sensors* 2017, 17(5), 1180.
- [126] Jacob Lum, Ronghui Wang, Billy Hargis, Steve Tung, Walter Bottje, Huaguang Lu, Yanbin Li, *Sensors* 2015, 15(8), 18565-18578.
- [127] Guojuan Zhang, Zhiguang Liu, Li Wang, Yujing Guo, *Sensors* 2016, 16(11), 1803.

- [128] Contreras Jiménez G¹, Eissa S, Ng A, Alhadrami H, Zourob M, Siaj M, *Anal. Chem.* **2015** Jan 20;87(2):1075-82.
- [129] Feng C, Dai S, Wang L. a review. *Biosens Bioelectron.* 2014 Sep 15;59:64-74.
- [130] Harriet Khang¹, Kelly Cho¹, Stephanie Chong¹, Ji Hoon Lee, *Biosens Bioelectron.* **2017** Apr 15;90: 46-52.
- [131] Xie, Q.; Tan, Y.; Guo, Q.; Wang, K.; Yuan, B.; Wan, J.; Zhao, X, *Anal. Methods* **2014**, 6, 6809–6814.
- [132] Jegatha Nambi Krishnan, Sang-Hwi Park, Sang Kyung Kim, *Sensors* **2017**, 17(9), 2044.
- [133] Zhang, K.; Liu, M.; Tong, X.; Sun, N.; Zhou, L.; Cao, Y.; Wang, J.; Zhang, H.; Pei, R, *Biomacromolecules* **2015**.
- [134] R. Rapini, G. Marrazza, *Bioelectrochemistry* 118. **2017**. 12 (7).47–61
- [135] J. Fenik, M. Tankiewicz, M. Biziuk, *Anal. Chem.* 30 (**2011**) 814–826.
- [136] Asma Verdian, *j.talanta*. **2017**.08.070.
- [137] A. Puckowski, K. Mioduszevska, P. Łukaszewicz, M. Borecka, M. Caban, J. Maszkowska, P. Stepnowski, a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127 (**2016**) 232–255.
- [138] J. Daprà, L.H. Lauridsen, A.T. Nielsen, N. Rozlosnik, *Biosens. Bioelectron.* 43 (**2013**) 315–320.
- [139] L.R. Schoukroun-Barnes, S. Wagan, R.J. White, *Anal. Chem.* 86 (**2014**) 1131–1137.
- [140] Ezat Hamidi-Asl, Freddy Dardenne, Ronny Blust, Karolien De Wael, *Sensors* **2015**, 15(4), 7605-7618.
- [141] John Wiley & Sons, **2011**.
- [142] S.M. Taghdisi, N.M. Danesh, M. Ramezani, K. Abnous, *Biosens. Bioelectron.* 85(**2016**) 509–514.
- [143] Mokhtarzadeh A, Dolatabadi JE, Abnous K, de la Guardia M, Ramezani M. *Biosens Bioelectron.* **2015** Jun 15; 68:95-106.
- [144] Maureen McKeague, Ranganathan Velu, Annalisa De Girolamo, Stefania alenzano, Michelangelo Pascale, McKenzie Smith, Maria C. DeRosa, *Toxins* **2016**, 8(11), 336.
- [145] Ribes À, Santiago-Felipe S, Bernardos A, Marcos MD, Pardo T, Sancenón F, Martínez-Mañez R, Aznar E. *ChemistryOpen.* **2017**, Aug 2;6(5):653-659.

- [146] Hui Li, Daibin Yang, Peiwu Li, Qi Zhang, Wen Zhang, Xiaoxia Ding, Jin Mao, Jing Wu, *Toxins* **2017**, 9(10), 318.
- [147] X. Chen, Y. Huang, X. Ma, F. Jia, X. Guo, Z. Wang, *Microchim. Acta* **182** (2015) 1709–1714.
- [148] W. Zheng, J. Teng, L. Cheng, Y. Ye, D. Pan, J. Wu, F. Xue, G. Liu, W. Chen, *Biosens. Bioelectron.* **80** (2016) 574–581.
- [149] Eissa S, Siaj M, Zourob M, *Biosens Bioelectron.* **2015** Jul 15;69:148-54.
- [150] L. Hou, L. Jiang, Y. Song, Y. Ding, J. Zhang, X. Wu, D. Tang, *Microchim. Acta* **183** (2016) 1971–1980.
- [151] L. Fetter, J. Richards, J. Daniel, L. Roon, T.J. Rowland, A.J. Bonham, *Chem. Commun.* **51** (2015) 15137–15140.
- [152] Y. Liu, X. Zhang, J. Yang, E. Xiong, X. Zhang, J. Chen, *Can. J. Chem.* **94** (2016) 509–514.
- [153] P. Yu, Y. Liu, X. Zhang, J. Zhou, E. Xiong, X. Li, J. Chen, *Biosens. Bioelectron.* **79** (2016) 22–28.
- [154] D. Wu, Y. Wang, Y. Zhang, H. Ma, X. Pang, L. Hu, B. Du, Q. Wei, *Biosens. Bioelectron.* **82** (2016) 9–13.
- [155] Yunxia Luan, Anxiang Lu, Jiayi Chen, Hailong Fu, Li Xu, *Applied sciences.* **2016**, 6, 432.
- [156] Rebeca Miranda-Castro, Noemí de-los-Santos-Álvarez, Arturo J. Miranda-Ordieres, María Jesús Lobo-Castañón, *Biosensors* **2016**, 6, 16.
- [157]. Clark, L.C, and Lyons, C. (1962). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **102**, 29.
- [158] Anh Tuan Mai. Thèse de doctorat en matériaux. Université Claude Bernard -Lyon I, **2004**. France.
- [159] Pelmont, J. **1995**, Presses universitaires de Grenoble.
- [160] H. JARRAR, Ecole Nationale Supérieure De Chimie De Montpellier. France. Décembre **2011**.
- [161] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Michaelis_Menten_curve_2.svg (Consulté le 30-04-2018)
- [162] Jessica Baur, Thèse de doctorat en chimie biologique. Université de Grenoble, **2010**.
- [163] L.F.B.L. Pontes, J.E.G. de Souza, A. Galembeck, C.P. de Melo, *Sensors and Actuators B: Chemical* Volume 177, February 2013, Pages 1115-1121.

- [164] Baker, M. D.; Senaratne, C. In *Electrochemistry of Novel Materials*; Lipkowski, J., Ross, P. N., Eds.; VCH Publisher: New York, 1994; pp 339–380.
- [165] Jyh-Myng Zen And Annamalai Senthil Kumar, *American chemical society*. June 1, 2004/ *Analytical Chemistry*.
- [166] Yassine Bentahar. Thèse de doctorat. 2016. Université Côte d'Azur, France.
- [167] S. Caillère, S. Hénin, M. Rautereau, (1982. Tome 1, 2^{ème} édition Masson, Paris.
- [168] Y. Deng, G. N. White, J. B Dixon, (2002, *Journal of Colloid and Interface Science*, Vol. 250, pp. 379-393.
- [169] S. W. Bailey, (1980), *Mineralogical Society*, London, 1-123.
- [170] Mathieu Gautier, Fabrice Muller, Lydie Le Forestier, Jean-Michel Bény, Régis Guégan, *Applied Clay Science*, Elsevier, 2010, 49 (3), pp.247-254.
- [171] C. Tournassat; M. Bizi; G. Braibant; C. Cruzet, in: *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011; Vol. 364, pp 443-54.
- [172] Bergaya, F, et G Lagaly. 2006. « General introduction: clays, clay minerals, and clay science ». *Handbook of clay science*, vol. 1, p. 1-18.
- [173] R. Morel, *Les sols cultivés*, Lavoisier, Paris, 1996.
- [174] E.C. Gaucher, D. Guyonnet and D. Cazaux, *Environment & Technique* 256 (2006), pp. 29–33.
- [175] Pivato and Raga, 2006 A. Pivato and R. Raga, *Waste Management* 26(2006), pp. 123–132.
- [176] Guyonnet et al, Guyonnet, E. Gaucher, H. Gaboriau, C.-H. Pons, C. Clinard, V. Norotte and G. Didier, *Journal of Geotechnical and Geoenvironmental Engineering* 131(2005), pp. 740–749
- [177] Gurpreet Kaur, Shibu Saha, Vinay Gupta, *Technology*. Volume, January 2016, Pages 144-150.
- [180] Qiaojuan Gong, Yongdong Wang, Haiying Yang, *Biosensors and Bioelectronics* Volume 89, Part 1, 15 March 2017, Pages 565-569.
- [181] Mallikarjunarao Ganesana Elefterios Trikantzo poulos B. Jill Venton, *Procedia Technology*. Volume 27, 2017, Page 229.
- [183] Melinda David, Madalina M. Barsan, Christopher M.A. Brett, Monica Iorescu, *Sensors and Actuators B: Chemical* Volume 255, Part 3, February 2018, Pages 3227-3234.
- [184] Singh BD, *J Mol Catal B*. 2009;74:1_5.

- [185] Guisan JM, 2nd ed. New Jersey (NJ): Humana Press Inc.; **2006**. p. 1_13.
- [186] Obzturk B, Izmir Institute of Technology; **2001**. p. 40.
- [189] N.S.Hettiarachchy, D.J.Feliz, J.S.Edwards, R.Horax. A volume in Woodhead. Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition 2018, Pages 569–59.
- [190] Yongjin Chung, Marcelinus christwardana, Daniel Chris Tannia, Ki Jae Kim, Yongchai Kwon, Journal of Power Sources Volume 360, 31 August 2017, Pages 172-17.
- [191] Muamer Dervisevic, Esmadervisevic, Mehmet Senel, Emre Cevik, Huseyin Bekir Yildiz, Pinar Camurlu, Enzyme and Microbial Technology Volume 102, July **2017**, Pages 53-59.
- [192] Gandhi Alamsyah, Vania Anisya Albels, Muhammad Sahlan, Heri Hermansyah, Energy Procedia 136 (**2017**) 47–52.
- [193] Yongjin Chung, Yeonjoo Ahn, Do-Heyoung Kim, Journal of Power Sources. Volume 337, 1 January 2017, Pages 152-158.
- [194] Green, NM (**1975**).
- [200] Haddour, N.; Cosnier, S.; Gondran, C. J. Am. Chem. Soc. **2005**, 127 (16), 5752–5753.
- [201] Balland, V.; Hureau, C.; Cusano, A. M.; Liu, Y.; Tron, T.; Limoges, B. Chem. Eur. J. **2008**, 14 (24), 7186–7192.
- [203] Mousty, C., **2010**. Biosensing applications of clay-modified electrodes: a review. Anal. Bioanal. Chem. 396, 315–325.
- [204] Zhao, G.H., Wang, J.Z., Li, Y.F., Chen, X., Liu, Y.P., **2011b**, J. Phys. Chem. C 115, 6350–6359.
- [205] Yu, W.H., Li, N., Tong, D.S., Zhou, C.H., Lin, C.X., Xu, C.Y., **2013a**, a review. Appl. Clay Sci. 80, 443–452.
- [206] Yu, W.H., Fang, M., Tong, D.S., Shao, P., Xu, T.N., Zhou, C.H., **2013b**, Biochem. Eng. J. 70, 97–105.
- [207] Yu, W.H., Li, N., Tong, D.S., Zhou, C.H., Lin, C.X., Xu, C.Y., **2013c**, a review. Appl. Clay Sci. 80–81, 443–452.
- [208] Yu, W.H., Tong, D.S., Fang, M., Shao, P., Zhou, C.H., **2015**, J. Mol. Catal. B Enzym. 111, 43–50.
- [209] Liang, Y.Y., Zhang, L.M., Li, W., Chen, R.F., **2007**, Colloid Polym. Sci. 285, 1193–1199.

- [210] Chang, M.Y., Juang, R.S., **2005**, *Enzym. Microb. Technol.* 36, 75–82.
- [211] Sanjay, G., Sugunan, S., **2008**, *J. Porous. Mater.* 15, 359–367.
- [212] Ding, X.L., Henrichs, S.M., **2002**, *Mar. Chem.* 77, 225–237.
- [213] Szabo, T., Bakandritsos, A., Tzitzios, V., Papp, S., Korosi, L., Galbacs, G., Musabekov, K., Bolatova, D., Petridis, D., Dekany, I., **2007**, *Nanotechnology* 18, 285602 (9 pp).
- [214] Sinegani, A.A.S., Emtiazi, G., Shariatmadari, H., **2005**, *J. Colloid Interface Sci.* 290, 39–44.
- [215] Gopinath, S., Sugunan, S., **2007**, *Appl. Clay.Sci.* 35, 67–75.
- [216] Alkan, S., Ceylan, H., Arslan, O., **2005**, *J. Serb. Chem. Soc.* 70, 721–726.
- [217] Serefoglou, E., Litina, K., Gournis, D., Kalogeris, E., Tziaila, A.A., Pavlidis, I.V., Stamatidis, H., Maccallini, E., Lubomska, M., Rudolf, P., **2008**. *Chem. Mater.* 20, 4106–4115.
- [218] Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernandez-Lafuente, R., Huguet, J., Guisan, J.M., **1998**. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 486–493.
- [219] Kim, B.H., Jung, J.H., Kim, J.W., Choi, H.J., Joo, J., **2001**. *Synth. Met.* 117, 115–118.
- [220] Pérez-Santano, A., Trujillano, R., Belver, C., Gil, A., Vicente, M.A., **2005**. *J. Colloid Interface Sci.* 284, 239–244.
- [221] Fiorito, T.M., Icoz, I., Stotzky, G., **2008**. *Appl. Clay Sci.* 39, 142–150.
- [222] Bernd, W., Margarita, D., Pilar, A., Eduardo, R.H., **2011**. Phospholipid sepiolite biomimetic interfaces for the immobilization of enzymes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3,4339–4348.
- [223] Fujimori, A., Arai, S., Soutome, Y., Hashimoto, M., **2014**. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 448, 45–52.
- [224] Ning An , Chun Hui Zhou , Xiao Yu Zhuang , Dong Shen Tong ,Wei Hua Yu, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **2015**.Vol. 29, No. 2, 205-220.
- [225] Ozturk, N., Akgol, S., Arısoy, M., Denizli, A., **2007**Sep. *Purif. Technol.* 58, 83–90.
- [226] Joshi, M.D., Sidhu, G., Pot, I., Brayer, G.D., Withers, S.G., McIntosh, L.P., 2000.*J. Mol. Biol.* 299, 255–279.
- [227] Sanjay, G., Sugunan, S., **2005a**. *Catal. Commun.*6, 525–530.
- [228] Sanjay, G., Sugunan, S., **2005b**. *Catal. Commun.* 6, 81–86.

- [229] de Fuentes, I.E., Viseras, C.A., Ubiali, D., Terreni, M., Alcantara, A.R., **2001**, J. Mol. Catal. B Enzym. 11,657–663.
- [230] Chang, M.Y., Kao, H.C., Juang, R.S., **2008**. Int. J. Biol.Macromol. 43, 48–53.
- [231] Reshmi, R., Sugunan, S., **2013**. J. Mol.Catal. B Enzym. 97, 36–44.
- [232] You, Q.H., Yin, X.L., Zhao, Y.P., Zhang, Y., **2013**, Bioresour. Technol. 148, 202–207.
- [233] Chang, M.Y., Juang, R.S., **2007**, Biochem. Eng. J. 35, 93–98.
- [234] A. Garwood, M. M. Mortland et T. J. Pinnavaia, Journal of Molecular Catalysis, 22 (**1983**) 153 – 163.
- [235] Rorrer, G.L., Hsien, T.Y., Way, J.D., **1993**, Ind. Eng. Chem. Res. 32, 2170–2178.
- [236] Mbouguen, J.K., Ngameni, E., Walcarius, A., **2006**, Anal. Chim. Acta 578, 145–155.
- [237] Bergaya, F., Lagaly, G. (Eds.), **2013**. Handbook of Clay Science, 2nd ed . Developments in Clay Science vol. 5. Elsevier, Amsterdam.
- [238] B. Xie, K. Ramanathan And B. Danielsson, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 19, pp. 340-349, **2000**.

Chapitre II
Partie A : Elaboration d'un
biocapteur pour la détection du
bisphénol A par immobilisation
d'un aptamère.

II.1 Introduction

Le bisphénol A est utilisé dans la production du plastique polycarbonate. Une exposition au BPA est présente dans les populations humaines en raison de son utilisation répandue dans les produits de consommation. Le BPA est un perturbateur endocrinien pouvant affecter la santé humaine. Des études approfondies ont indiqué son effet nocif et l'ont impliqué dans une grande variété de résultats de santé défavorables chez les humains [1-2]. En raison de sa menace sérieuse pour l'environnement et la santé humaine, la détection du BPA de manière rapide, est d'une grande importance nécessaire pour le contrôle de la sécurité et la surveillance environnementale. Les méthodes actuelles de détection du BPA se concentrent principalement sur les méthodes instrumentales. Cependant, toutes ces méthodes sont limitées dans la détection sur site en raison du coût élevé des instruments, du temps de prétraitement des échantillons et du besoin de personnel expert. Comparativement, le capteur à résonance des plasmons de surface et le test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) ont également été adoptés pour la détection rapide du BPA. Au cours de ces dernières années, un certain nombre de biocapteurs pour le BPA basés sur différents types de transduction ont été développés en utilisant un aptamère comme élément de reconnaissance [3-6]. Parmi ces méthodes, les aptasensors électrochimiques ont reçu une attention considérable en raison de leurs avantages de réponse rapide, de facilité d'utilisation, et de faible coût. Les capteurs potentiométriques basés sur le changement de charge de surface sont des outils bien établis pour mesurer les ions et les espèces biologiques. Cependant, leur utilisation pour la détection de petites molécules avec une sensibilité élevée et une bonne sélectivité est à améliorer. Dans ce travail, un aptacapteur impédancemétrique pour les petites molécules est présenté, en utilisant le bisphénol A comme modèle.

II.2 Bisphénol A

Le Bisphénol A ou 4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane [7], noté BPA, est un composé organique présentant deux groupements fonctionnels phénol, ce qui le classe dans la famille des aromatiques.

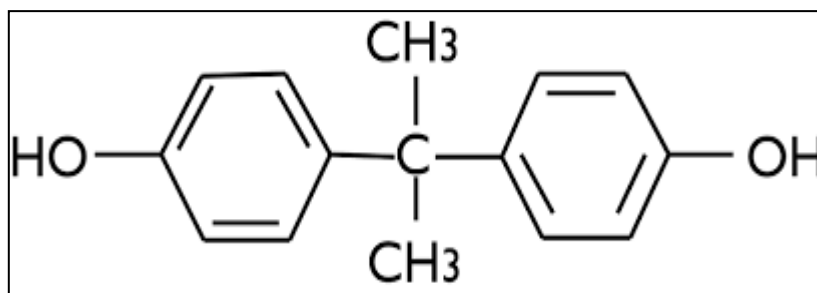


Figure II.1 : Bisphénol A ou BPA en formule semi-développée.

Le BPA est utilisé comme "additif" dans la fabrication des matières plastiques de polycarbonate rendant le matériau plus dur et plus transparent. Il est utilisé dans l'industrie pour la production des polycarbonates et de résines époxydes ^[8-9-10] spécialement utilisés dans les emballages alimentaires en plastique ou en papiers ^[11] et aussi les revêtements des récipients (bouteilles en plastiques, biberons, boîtes de conserves en métal et l'électroménager) ^[12-13]. Le BPA a été synthétisé par A. P. Dianin en 1891 et ses propriétés oestrogéniques ont été utilisées dans la recherche d'oestrogènes de synthèse dans les années 1930 puis a été abandonné lorsque le diéthylstilbestrol (DES) s'est avéré plus efficace ^[14]. Depuis 1940, le BPA a été largement utilisé dans la production d'une variété de produits de consommation ^[15]. Dans les années 1960, plusieurs études ont été basées sur l'hypersensibilité et le métabolisme du BPA dans les différents systèmes ^[16-18]. Chose importante, en 1993, Krishnan et ses collègues ont accidentellement découvert que le BPA était lessivé des flacons de polycarbonate autoclavés et a montré, pour la première fois, son effet positif sur le taux de prolifération de la lignée cellulaire humaine MCF-7 ^[19]. La population se trouve exposée au BPA car il peut migrer à faible dose des matériaux en plastiques, notamment en présence de détergents puissants ou encore de liquides à haute température. Cette fuite est favorisée par la chaleur et les conditions acides ou basiques qui accélèrent l'hydrolyse des liaisons ester reliant le BPA. Depuis lors, une recherche exhaustive a été menée sur les effets de ce produit chimique perturbateur endocrinien (EDC) sur les animaux et les humains ^[14-20]. En 2001, le rapport de l'examen, par les pairs, à faible dose du programme national de toxicologie des États-Unis, reconnaissait qu'il existait des preuves crédibles mais non concluantes que de faibles doses de BPA pouvaient avoir des effets sur des paramètres spécifiques ^[21]. Depuis 2006, de nombreuses évaluations scientifiques ont été réalisées sur le BPA par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), concluant à plusieurs reprises qu'il n'y a pas de préoccupation pour la santé humaine ^[22]. Le métabolisme et la toxicocinétique du BPA ont été étudiés chez les

rongeurs ^[23-24], les primates non humains ^[23-25] et les humains ^[26-27]. L'évaluation du profil cinétique d'excrétion de BPA chez un nombre limité de volontaires humains soumis à une dose orale unique de BPA deutéré a révélé un pic rapide et une demi-vie terminale inférieure à 6 h ^[26-27]. Ces données ont été déduites comme indiquant une clairance rapide et complète du BPA chez l'homme. Cependant, des données de biosurveillance à grande échelle ont révélé que les taux de BPA ne diminuent pas rapidement avec le temps de jeûne, suggérant une plus longue clairance du BPA ^[28], ce qui est corroboré par le fait que, dans l'étude de Volkel de 2002, a été détecté au-delà de 20 h d'exposition ^[26]. Compte tenu des résultats des études mondiales, la législation européenne a supprimé en 2011 l'utilisation du BPA dans la fabrication des biberons ^[29] et en 2012 l'autorité européenne de la sécurité des aliments (EFSA), a décidé de procéder à une nouvelle évaluation des risques du BPA ^[22], réduction de la dose journalière tolérable (DJT) établie (de 0,05 mg / kg à 4 g / kg de poids corporel / jour). Cependant, l'exposition professionnelle au BPA, qui entraîne des niveaux d'exposition significativement plus élevés que ceux résultant d'une exposition environnementale, n'a pas été prise en compte jusqu'à présent. Les recherches sont toujours en cours pour trouver les effets du BPA sur la santé humaine surtout sur la perturbation endocrinienne ^[30-34]. Tout système contrôlé par les hormones ; peut être compromis par les perturbateurs endocriniens, qui peuvent induire des tumeurs cancéreuses, des malformations congénitales et des problèmes de développement. ^[35-41]. Pour connaître la présence de bisphénol A, il y a un sigle pour les plastiques numéroté de 1 à 7. Par exemple, le 1 correspond au Polyéthylène téréphtalate (PET). Le 7 signifie « Plastique non répertorié » c'est-à-dire un autre plastique. Tous les sigles de 1 à 6 ne contiennent pas de bisphénol. Par contre, le numéro 7 peut en contenir, en particulier, s'il y a la mention PC « polycarbonate » ou PVC « Polychlorure de vinyle ».

II.3 Méthodes d'analyse existantes du bisphénol A

II.3.1 Méthodes analytiques

De par les effets nocifs du BPA sur la santé, il est très important de développer des méthodes sensibles et faciles pour le quantifier et des procédures expérimentales permettant son élimination de l'environnement ^[42-43]. Jusqu'à présent, différentes méthodes d'analyse ont été utilisées avec succès pour la quantification du BPA. La détermination du BPA par l'analyse instrumentale implique un certain nombre de processus, y compris la préparation des échantillons, la séparation, la détection et l'analyse des données ^[44]. Actuellement, les méthodes les plus largement appliquées pour la détection de BPA

s'appuient sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS) ^[45-46] et la chromatographie en phase liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS) ^[47-48]. Bien que ces méthodes s'avèrent être très efficaces, le processus d'extraction et de purification des échantillons est coûteux et soumis à des exigences strictes, qui ont entravé l'application plus large de ces approches chromatographiques. D'autres stratégies ont été adoptées pour la détection du BPA, notamment la spectrométrie de fluorescence ^[49], la photométrie ^[50], et les tests ELISA ^[51].

Cette dernière méthode présente une haute spécificité et une limite de détection très compétitive avec une LOD de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ pour les échantillons de sérum humain ^[52] et une gamme de linéarité de $0,3$ à $100 \mu\text{g L}^{-1}$; mais son fonctionnement est facilement affecté par les conditions du site car il dépend fortement de l'activité enzymatique. Même si la photométrie est opérationnellement simple, elle est sensible à des substrats complexes et nécessite une grande pureté d'échantillon. Parmi toutes les techniques de détection, la spectrométrie de masse MS est la méthode la plus utilisée ^[53]. L'American Society for Testing and Materials (ASTM) recommande des méthodes LC-MS pour tester le BPA dont la limite de détection est de 5 ng.L^{-1} avec la gamme linéaire de $20-600 \text{ ng. mL}^{-1}$ ^[54]. Par conséquent, de nouvelles alternatives pour la détermination du BPA sont en cours d'études.

II.3.2 Dosage immuno-enzymatique (ELISA)

Le test ELISA (En anglais Enzyme-Linked Immunosorbent Essay), repose sur le couplage de l'albumine du sérum bovin (BSA) et l'ovalbumine (OVA); afin de produire le revêtement et les antigènes immunisants. Ces derniers sont ensuite injectés dans des animaux pour isoler des anticorps spécifiques au BPA qui seront utilisés dans la détection du BPA en solution aqueuse ^[55-56]. Il a été ensuite développé pour l'analyse du BPA dans les boîtes de conserves contenant des légumes, dans les bouteilles d'eau et les boissons gazeuses, à base d'anticorps polyclonaux avec une limite de détection de $(0.10 \pm 0.03) - (0.20 \pm 0.04) \mu\text{g L}^{-1}$ ^[57]. Le test ELISA traite des petits volumes d'échantillons sans faire de prétraitement. La sélectivité et la sensibilité montrée par les anticorps spécifiques pour la cible, sont les avantages de cette méthode. Par contre ELISA présente des inconvénients dus à la longue durée de l'analyse avec l'exigence d'équipements et d'opérateurs professionnels.

II.3.3 Immunocapteurs optiques

Les immunocapteurs optiques comprennent un transducteur qui convertit les signaux provenant de l'anticorps et l'antigène se liant à un signal optique, et sont classés en

résonance des plasmons de surface (SPR) et de fluorescence. Les capteurs SPR ont été utilisés pour caractériser et quantifier les interactions biomoléculaires en raison de leur spécificité et de leur rapidité élevées. Hegnerova et al. ont également développé un capteur SPR pour détecter le BPA dans les eaux usées. Ce système, qui peut être régénéré, a donné une limite de détection de $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ [58]. Ici, une méthode fluorescente magnétique "à allumage" séparée pour la détection de BPA a été proposée, basée sur le transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET) entre l'aptamère de BPA marqué à la fluorescéine et le graphène oxydé magnétique (MGO). A différentes concentrations de BPA, l'intensité de fluorescence du système de détection a varié. La limite de détection de $0,071 \text{ ng / mL}$ a été obtenue avec une gamme linéaire de $0,2-10 \text{ ng / mL}$ [59]. Une nouvelle méthode fluorescente à base d'aptamère pour l'analyse du bisphénol A (BPA) a été développée sur la base de la reconnaissance spécifique des aptamères et l'effet de filtre interne (IFE) de nanoparticules d'or (AuNPs) sur la fluorescence de points quantiques CdTe (tellure de cadmium QDs). L'efficacité de l'IFE peut être ajustée par le BPA dans la mesure où la reconnaissance spécifique entre le BPA et les aptamères pourrait montrer des influences différentes sur l'agrégation induite par le sel des AuNP, et moduler de manière correspondante le processus IFE. Dans des conditions optimales, une bonne corrélation linéaire à la concentration de BPA était de 10 ng / mL à 80 ng / mL ($R^2 = 0,99$) avec une limite de détection de $1,86 \text{ ng / mL}$, inférieure aux limites maximales de résidus de BPA dans l'eau potable [60].

II.3.4 Méthodes électrochimiques

Les capteurs électrochimiques sont prometteurs pour la détection du BPA en raison de leur sensibilité élevée et de la simplicité opérationnelle.

a. Détection électrochimique du BPA à base de nanoparticules

Des matériaux de pointe tels que les nanotubes de carbone à paroi multi-graphène ou des nanoparticules d'or ont été utilisés pour améliorer la sensibilité et la limite de détection et aussi pour augmenter la surface des électrodes et améliorer les signaux d'oxydation. Hu et al. ont réussi à détecter le BPA avec une limite de détection qui varie de $2,4-2,9 \text{ nM}$ [61] en utilisant la spectroscopie d'impédance et la voltamétrie cyclique. Un autre biocapteur électrochimique à base d'aptamère sans marqueur, a été développé pour la détection sensible du bisphénol par électrodéposition de nanoparticules d'or (AuNPs) sur une électrode de carbone vitreux. Avidin-HRP-AuNP et le bisphénol A ont été choisis comme indicateurs de double signalisation. Les mesures électrochimiques ont été effectuées avec

la voltampérométrie impulsionnelle différentielle (DPV). Le BPA a été détecté dans une gamme linéaire de 0,001 à 1 nM avec une limite de détection de 0,41 pM^[62]. Un aptacapteur électrochimique sans étiquette a été élaboré pour la détermination sensible et sélective du bisphénol A (BPA) à base de nanotubes de carbone multiparois fonctionnalisés / nanoparticules d'or (f-MWCNTs / AuNPs) électrode en or modifiée par un film nanocomposite. Le procédé du capteur électrochimique a été étudié par voltamétrie cyclique (CV) et la spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) en présence de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ / $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. Une bonne relation linéaire a été observée entre la concentration de BPA et le courant dans la gamme de 0,1 à 10 nM avec une limite de détection de 0,05 nM^[63].

b. Capteurs électrochimiques à base de polymère à empreinte moléculaire

Les polymères à empreinte moléculaire (MIP_s) permettent la formation des sites de reconnaissance spécifiques dans les polymères. Ces matériaux se lient aux molécules cibles, en fonction de leur forme, de la charge et de la fonctionnalité, ce qui conduit à des variations de paramètres physiques, telles que la masse, l'absorbance ou l'indice de réfraction. Les molécules cibles sont éliminées par de nombreuses étapes de lavage pour perturber les interactions entre le gabarit et les monomères. Ce procédé permet d'obtenir des polymères synthétiques possédant des cavités spécifiques complémentaires au modèle de taille, de forme et la position du groupe fonctionnel^[64-65]. Apodaca et al. ont utilisé l'impédance électrochimique (EIS) pour mesurer la présence du BPA sur la matrice (MIP_s). Ce capteur a fourni une courbe d'étalonnage linéaire dans la gamme 0-12 mM avec une bonne spécificité^[66].

II.3.5 Immunocapteurs électrochimiques

Ils utilisent les anticorps comme biorécepteur et la détection électrochimique pour suivre la liaison spécifique de l'interaction anticorps-antigène. Il est considéré comme un outil simple, spécifique et sensible pour la détection et le dépistage d'une variété d'analytes^[67]. Pour la détection du BPA, Piao et al. ont développé un immunocapteur potentiométrique sans étiquette en immobilisant un anticorps polyclonal (PAb) sur une électrode en carbone. La différence de potentiel avant et après l'immuno-réaction, avait une bonne relation linéaire avec la concentration de BPA dans la gamme de 1,0 à 30,0 ng mL⁻¹. Cet immunocapteur simple et direct a montré une bonne sélectivité et sensibilité (LOD de 0,6 ng mL⁻¹)^[68]. Ying Huang et al. ont proposé un immunocapteur qui a montré une bonne reproductibilité et sélectivité, en utilisant l'impédance électrochimique. La gamme linéaire

de la courbe d'étalonnage basée sur la relation entre la réponse en courant et la concentration en BPA, était de $1,0 \times 10^{-8}$ à $1,0 \times 10^{-6}$ M avec une limite de détection de $8,7 \times 10^{-9}$ M [69]. Des anticorps ont été générés et utilisés pour un biocapteur électrochimique à base de nanoparticules d'or (AuNPs) pour la détection du BPA via des tests de compétition et de déplacement. L'étude s'est focalisée sur le comportement électrochimique des biocapteurs en utilisant ces deux formats d'analyse. La limite de détection (LOD) dans le test de compétition et le test de déplacement étaient respectivement de $12,35 \mu\text{g L}^{-1}$ et de $4,11 \mu\text{g L}^{-1}$ [70].

II.4 Section expérimentale

II.4.1 Objectif de l'étude

Depuis la première sélection en 2011 de l'aptamère anti-BPA [71] qui a été découvert par un groupe de chercheur coréen, de nombreux périphériques et aptasensors [72-81] basés sur les mesures spectroscopiques et électrochimiques ont été rapportés. À la lumière de ces préoccupations, et afin de pallier les limitations des techniques mentionnées précédemment, on propose dans le cadre de cette partie de la thèse, une approche pour la détection du bisphénol A dans l'eau. L'approche proposée consiste à développer un biocapteur à base d'aptamères. Les aptamères sont une alternative possible à l'utilisation d'anticorps dans l'analyse. Que la cible reconnue soit une petite molécule, un oligosaccharide, un peptide ou une protéine, les aptamères peuvent soit se replier pour incorporer leur molécule cible, telle qu'un ion métallique, soit se replier pour s'incorporer dans une cible plus grande, telle qu'une protéine [82]. Une telle flexibilité fait des aptamères des candidats idéaux pour les biocapteurs.

Cette partie de ce travail de doctorat a été effectuée au sein de l'équipe BEA du département de chimie moléculaire de l'université Grenoble-Alpes. repose sur l'élaboration d'un aptacapteur à transduction électrochimique pour la détection du BPA.

L'aptamère sélectionné par le procédé SELEX, a été immobilisé sur une électrode de carbone vitreux [précédemment modifiée par le film de poly (pyrrole)-NTA- Cu^{+2}], par la formation de la liaison entre l'aptamère comportant une queue poly histidine et les terminaisons $-\text{NTA}-\text{Cu}^{+2}$ sur l'électrode modifiée.

L'immobilisation de l'aptamère a été confirmée et optimisée en utilisant la voltamétrie cyclique (CV). L'interaction entre l'aptamère et la cible a été étudiée par la sonde électrochimique d'hydroquinone et contrôlée par la spectroscopie électrochimique d'impédance et la voltamétrie à signaux carrés de potentiel (SWV).

II.4.2 Synthèse de l'aptamère

L'aptamère qu'on a utilisé a été synthétisé par le Dr Nicolas Spinelli qui fait parti de l'équipe I2BM du département de chimie moléculaire de l'université de Grenoble (Figure II-2). L'aptamère BPA couplé au tag poly histidine a été synthétisé en adaptant une procédure déjà publiée^[83]. Cet aptamère présente une constante de dissociation K_D égale à 8,3 nM^[84]. Cette valeur est faible et elle est comprise dans l'intervalle de la haute affinité ciblant les biomolécules qui varie de 3 à 10 nM. Cette constante varie en sens inverse de l'affinité : plus le K_D est faible plus l'affinité entre l'aptamère et la cible est forte. L'aptamère BPA pour d'une fonction 5'diol^[85] (5' X GGGCCG TTC GAA CAC GAG CAT GCC GGT GGG TGG TCA GGT GGG ATA GCG TTC CGC GTA TGG CCC AGC GCA TCA CGG GTT CGC ACC AGG ACA GTA CTC AGG TCA TCC TAG 3'; X = diol) a été synthétisé par la procédure de synthèse supportée automatisée (synthétiseur ABI 3400) en utilisant la méthode dite « aux phosphoramidites » sur une échelle de 0.2 μmol . Il a ensuite été déprotégé et clivé du support par traitement à l'ammoniaque 28% (1.5mL) pendant 16h à 55°C. Après évaporation il a été resuspendu dans de l'eau ultra pure (200 μL) puis soumis a un traitement au periodate de sodium (0.86 mg, 4 μmol) pendant 30min puis dessalé sur des colonnes Sephadex G-25 (NAP-10, GE healthcare). Le couplage avec le peptide penta –histidine porteur d'une fonction hydroxylamine (0.23mg, 0.3 μmol) a été effectué dans une solution tamponnée d'acétate d'ammonium (0.4 mol L⁻¹, pH 4.5) pendant 4h à température ambiante. L'aptamère (50 μg , 1.5 μmol , rdt 0.5%) a été obtenu après purification sur gel d'électrophore en conditions dénaturantes.

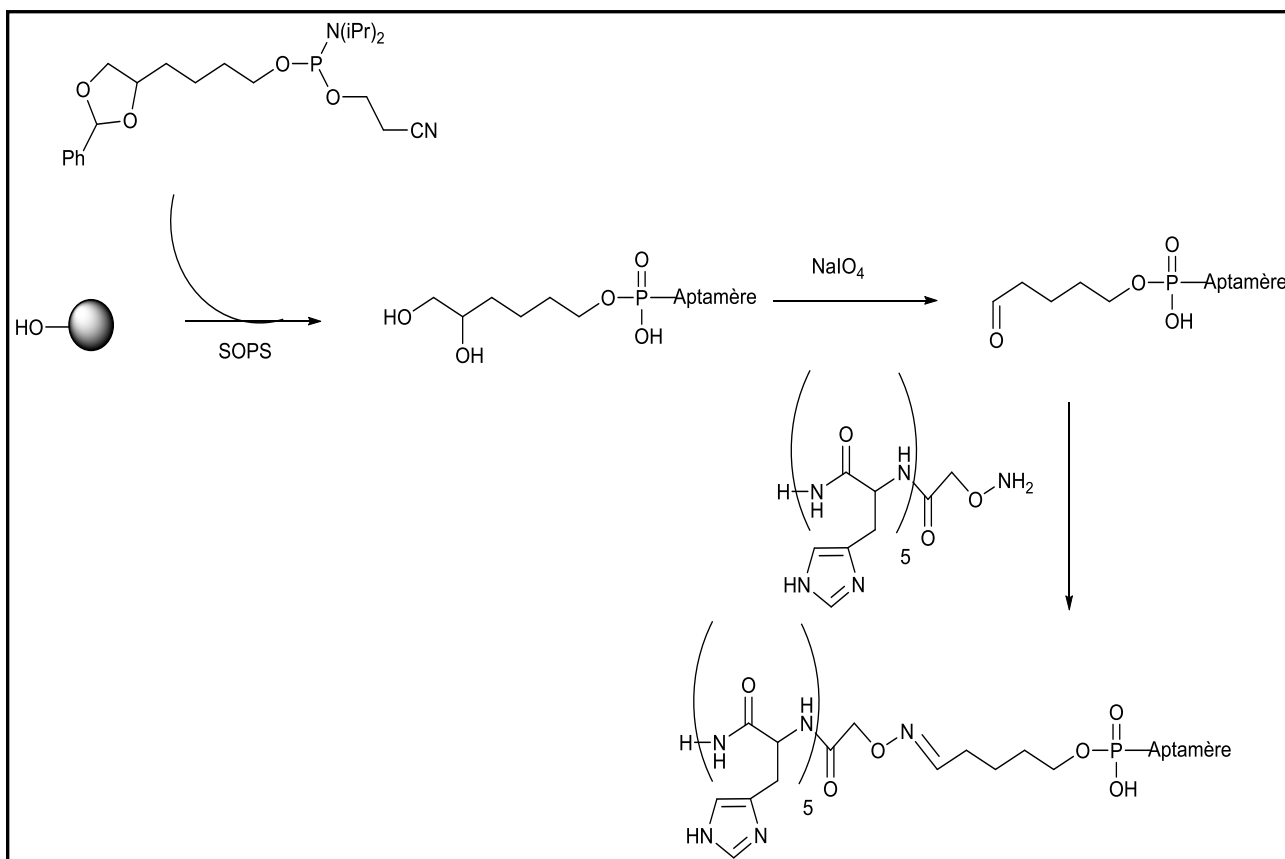


Figure II-2 : Illustration du mécanisme de la synthèse de l'aptamère et de l'incorporation du tag histidine.

II.4.3 Préparation et immobilisation de l'aptamère

Cette étape d'immobilisation est un paramètre critique pour la mise au point du travail

à effectuer. Cette méthode a été déjà utilisée par l'équipe BEA du département de chimie moléculaire ^[83-85] pour élaborer les immunosenseurs et les biocapteurs. Elle comporte plusieurs étapes. La première consiste à électropolymériser le pyrrole-NTA sur la surface d'une électrode de carbone vitreux préalablement bien nettoyée, pour ensuite l'incuber dans une solution de Cu^{+2} . La seconde étape est la fixation de l'aptamère sur l'électrode modifiée par le poly (pyrrole)-NTA- Cu^{+2} . Avant l'utilisation, l'aptamère subit une dénaturation thermique. La dénaturation est un processus qui conduit à transformer un double brin d'ADN en deux simples brins, en rompant les liaisons hydrogène entre les bases nucléiques des deux chaînes complémentaires de l'ADN. L'augmentation de la température induira à l'ouverture de la double hélice qui permet à l'aptamère de capter les petites molécules ^[86] comme le BPA. Une concentration de $2.9 \times 10^{-7} \text{M}$ d'aptamère a été

dénaturée en la chauffant à 90 ° C pendant 5min, puis refroidie rapidement à 4 ° C pendant 15 min pour ensuite l'incubée à 25 ° C pendant 5 min pour permettre à l'aptamère d'atteindre la conformation la plus stable, ce qui est une condition nécessaire à sa fixation à la molécule cible. La dernière étape est le dépôt de 15µl sur l'électrode déjà préparée pour ensuite la conserver 45 minutes à 5°C. Après ce temps écoulé, l'électrode est rincée 10 minutes dans une solution de tampon phosphates 0.1 M et pH égale à 7.4 en changeant la solution chaque cinq minute. L'électrode résultante a été ensuite utilisée comme aptasensor dans ce travail.

II.4.4 Etudes électrochimiques

II.4.4.a Réactifs

Toutes les solutions aqueuses ont été préparées avec de l'eau ultra-pure (résistivité > 18 MΩ.cm). Toutes les études électrochimiques en milieu organique ont été réalisées dans des solutions d'acétonitrile (CH₃CN, qualité HPLC de Rathburn), en utilisant le perchlorate de lithium ((LiClO₄, de Fluka) comme électrolyte support, en présence ou non de l'acide perchlorique. Le monomère pyrrole-nitrilotriacétique nommée pyrrole-NTA, a été synthétisé au laboratoire de chimie moléculaire de l'université Grenoble-Alpes.

La contre électrode est constituée par une verrerie à double poreux contenant une solution de LiClO₄ (lithium perchlorate) de concentration 0,1 mol.L⁻¹ dans de l'acétonitrile (CH₃CN) dans laquelle est placée un fil de platine. L'électrode de référence est formée par une verrerie à double poreux dont l'un des compartiments est constitué d'un fil d'argent plongé dans une solution de nitrate d'argent (AgNO₃) de concentration 0,01 mol.L⁻¹ dans du LiClO₄ 0,1 mol.L⁻¹ / CH₃CN et dans l'autre

compartiment se trouve du LiClO₄ 0,1 mol.L⁻¹ / CH₃CN. L'électrode nommée AgNO₃ / Ag est utilisée comme électrode de référence en milieu organique et l'électrode de calomel saturée a été utilisée en milieu aqueux.

La solution mère de BPA a été tout d'abord préparée dans l'éthanol absolu à une concentration de 10⁻⁴ mol. L⁻¹ et conservée à 4 °C.

Les solutions diluées de BPA sont fraîchement préparées dans du tampon de phosphate à pH 7,4 avec du NaCl 10 mmol. L⁻¹, MgCl₂ 1mmol L⁻¹ et KCl 5 mmol .L⁻¹. Les solutions d'hydroquinone à 1 mmol/L ont été fraîchement et quotidiennement préparées dans un tampon phosphate ; pH = 7,4.

II.4.4.b Appareillage

Des études électrochimiques ont été effectuées à l'aide d'un montage à trois électrodes classique couplé à un PGSTAT 100. L'électrode de travail est une électrode en carbone vitreux (diamètre 3 mm) soigneusement nettoyé à l'aide la pâte diamantée de 2 μm puis rincée successivement avec de l'acétone, de l'éthanol et de l'eau distillée avant chaque utilisation. Les mesures d'impédance électrochimique ont été effectuées en utilisant un logiciel de FRA, et traitées avec le logiciel Zview et les mesures de voltampérométrie cyclique et voltamétrie à signaux carrés de potentiel (SWV), ont été effectuées en utilisant le logiciel GPES à 25° C en immergeant l'électrode dans un tampon phosphate (pH 7,4) contenant de l'hydroquinone (10^{-3} mol. L⁻¹) utilisée comme sonde rédox. Pour les mesures d'impédance électrochimiques, le balayage de fréquence est de 50 Hz à 0,01Hz à un potentiel de 0.325V / ECS, avec une amplitude de 5 mV_{rms}. Le potentiel de 0,325 V a été choisie pour être dans la partie linéaire de la courbe stationnaire $I = \text{logiciel } f(E)$. Les voltampérogrammes à ondes carrées ont été enregistrées à partir de 0,00 V à 0,80 V avec $\Delta E = 5,1$ mV_{rms} et une amplitude de 0,025 V.

II.5 Résultats et discussions

Les différentes étapes d'élaboration du biocapteur sont représentées sur la figure II-3

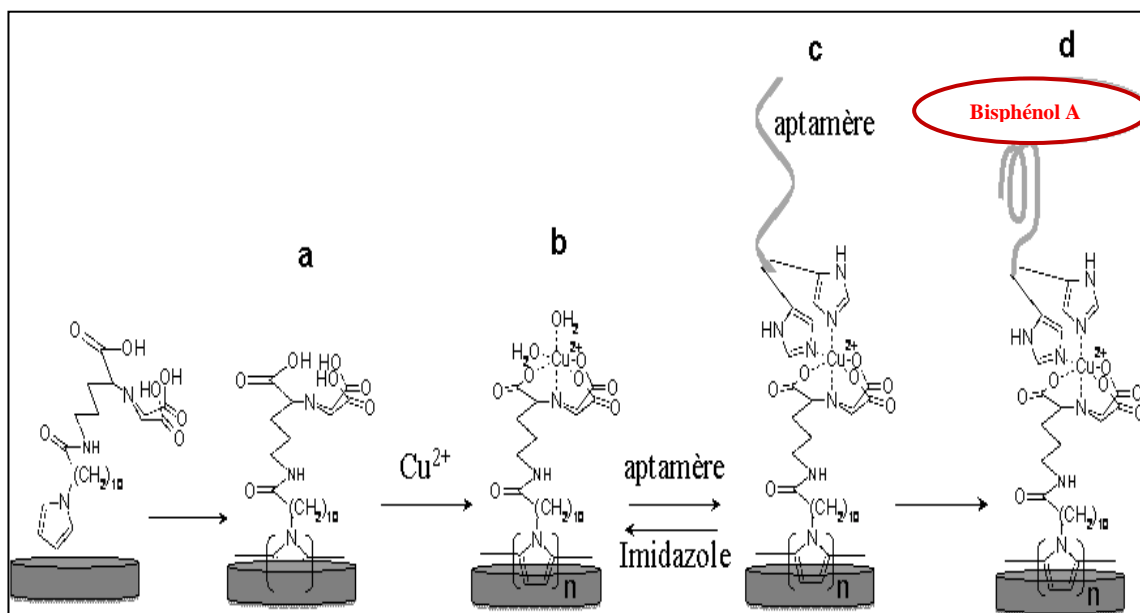


Figure II-3 : Les différentes étapes d'élaboration du biocapteur. a. électro polymérisation du pyrrole-NTA sur une électrode de carbone vitreux par chronopotentiométrie, b. incubation de l'électrode modifiée dans une solution de CuCl_2 , c. Immobilisation de l'aptamère possédant un tag histidine *via* les ions cuivre, d'incubation de l'électrode fonctionnalisée avec l'aptamère dans une solution du polluant (BPA).

La première étape commence par l'obtention d'un film de polypyrrole-NTA (étape a) à la surface d'électrode, suivi de l'immobilisation de l'aptamère histidinylé via la coordination par des cations Cu^{2+} par l'intermédiaire de l'azote du cycle imidazole des histidines qui peut former des liaisons de coordination avec des ions métalliques (étapes b et c). Chaque étape est caractérisée par la spectroscopie d'impédance en introduisant dans la solution d'étude un couple redox comme expliqué précédemment. L'incubation de l'aptamère et l'addition du bisphénol A en solution aqueuse devrait induire des modifications physicochimiques détectables en électrochimie.

II.5.1 Caractérisation du pyrrole-NTA et poly (pyrrole-NTA)

II.5.1.a Electrochimie du monomère en solution

L'étude préliminaire commence par caractériser le pyrrole-NTA (Figure II-4) par voltampérométrie cyclique afin de vérifier qu'il présente le signal électroactif caractéristique d'un N-alkyl pyrrole, entre 0,8 et 1,2V vs Ag^+/Ag ^[87]. Pour cela, une solution de pyrrole-NTA à $5.10^{-3}\text{mol.L}^{-1}$ dans l'acétonitrile contenant du perchlorate de lithium à $0,1\text{mol.L}^{-1}$ en présence de 3 équivalents d'acide perchlorique afin de solubiliser le monomère, a été préparée.

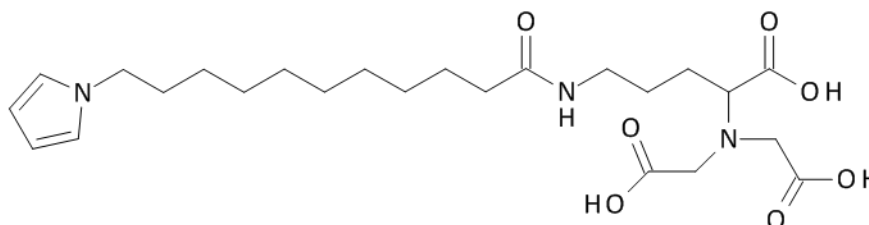


Figure II.4 : Structure du monomère de pyrrole-NTA.

Le voltampérogramme obtenu sur carbone vitreux (Figure II-5) confirme la présence d'un pic anodique irréversible à 1,08 V vs. Ag^+/Ag correspondant à l'oxydation irréversible du pyrrole ^[88-89].

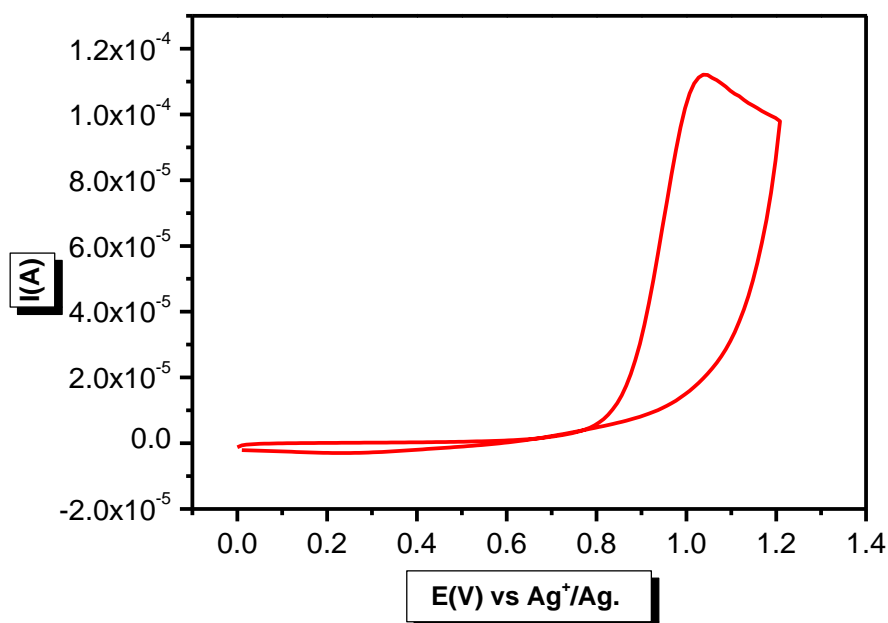


Figure II.5 : Voltampérogramme d'une solution de pyrrole-NTA à $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans CH_3CN contenant LiClO_4 à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ acidifiée avec 3 équivalents de HClO_4 sur électrode de carbone vitreux ($\text{Ø}=3\text{mm}$), $v=0,1\text{V.s}^{-1}$

II.5.1.b Electropolymérisation du pyrrole-NTA par voltampérométrie cyclique

Ensuite on procède à la formation du poly-pyrrole-NTA en effectuant 10 balayages successifs entre 0 et 0,85V (figure II-6). On observe la croissance d'un signal redox réversible centré sur 0,30 V vs Ag^+/Ag correspondant au signal redox du poly (pyrrole-NTA). L'intensité augmente au fur et à mesure des cycles ce qui est caractéristique à la formation d'un film de poly (pyrrole) électroactif à la surface de l'électrode ^[88-89].

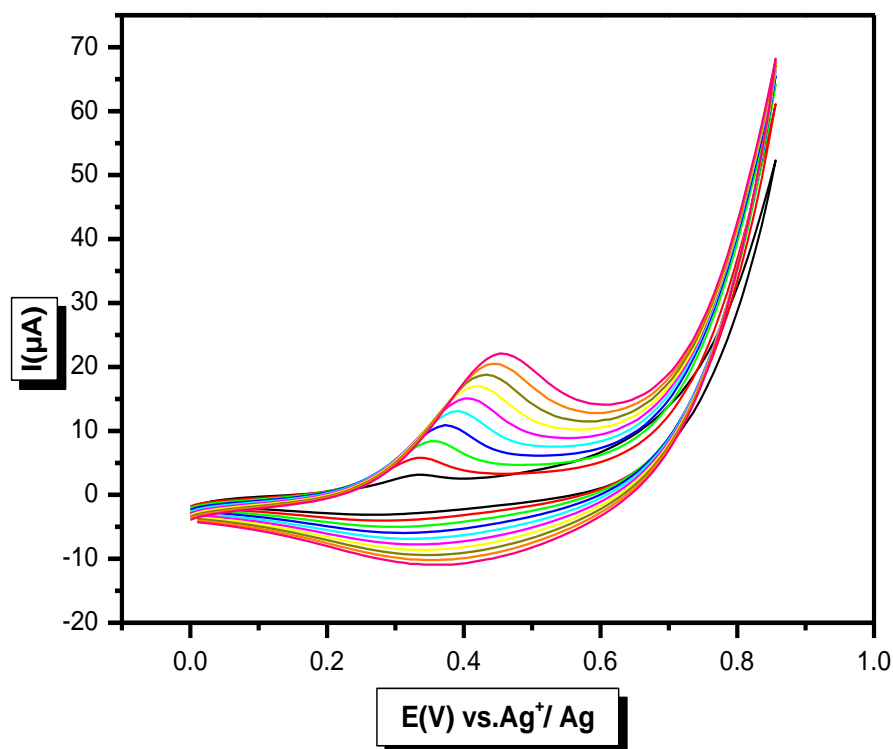


Figure II.6 : Voltampérogrammes cycliques de formation du poly (pyrrole-NTA). 10 cycles successifs dans une solution de pyrrole-NTA à $5.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans CH_3CN contenant LiClO_4 à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ acidifiée avec 3 équivalents HClO_4 sur électrode de carbone vitreux ($\text{Ø}=3\text{mm}$) $v = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$.

II.5.1.c Electrodeposition du pyrrole-NTA à potentiel contrôlé

L'électropolymérisation du pyrrole-NTA a été réalisée également par chronopotentiométrie. Cette technique, permet de contrôler le courant et le temps de polymérisation pour déposer des films de poly (pyrrole-NTA) à la fois fins et couvrant ^[83]. Pour obtenir une charge d'électropolymérisation de $2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$ sur des électrodes de 3 mm de diamètre, on a choisi une durée de 18 s en appliquant un courant de $10 \mu\text{A}$. On remarque durant l'élaboration du polymère que le potentiel se stabilise à 0,8V (figure II-7). C'est une valeur qu'il ne faudra pas dépasser pour ne pas suroxyder le film de polymère et l'endommager.

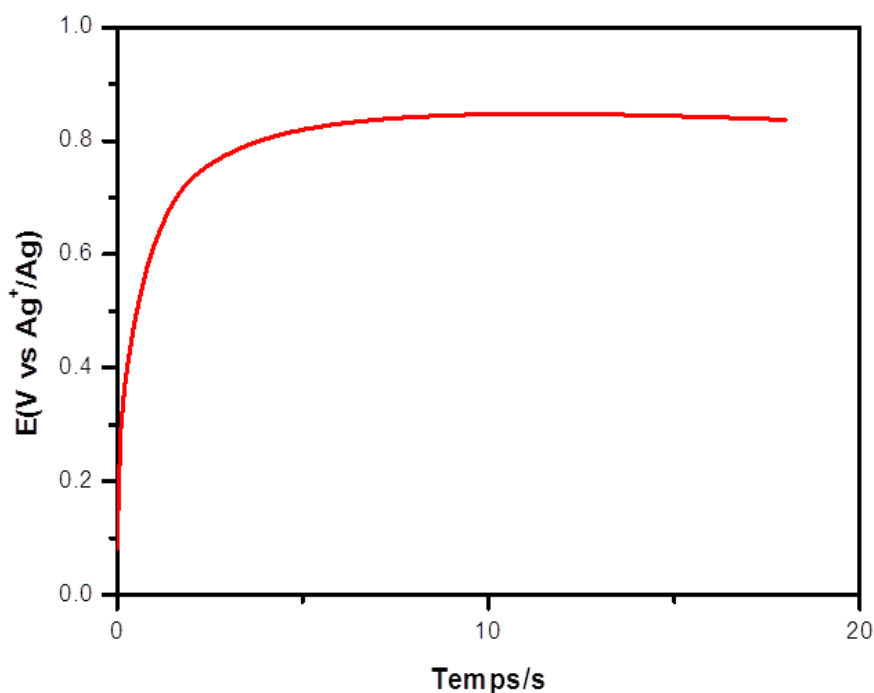
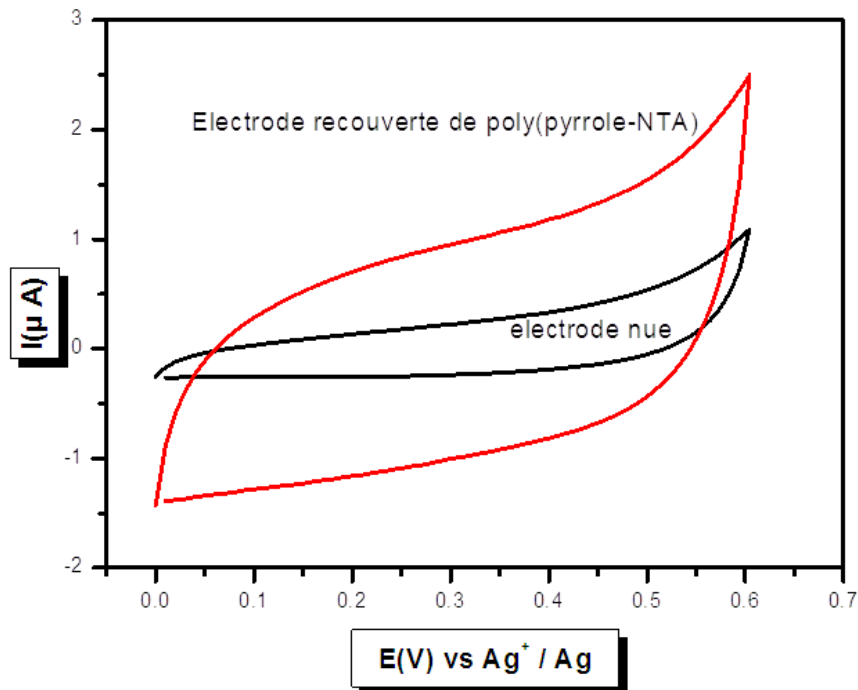


Figure II-7 : Chronopotentiogramme obtenu lors de la polymérisation à 10 μ A pendant 18s dans une solution à 5.10⁻³mol.L⁻¹ dans CH₃CN contenant LiClO₄ à 0,1 mol.L⁻¹ acidifiée avec 3 équivalents de HClO₄ sur électrode de carbone vitreux (\varnothing =3mm).

Les électrodes ainsi modifiées par le film de poly (pyrrole-NTA) sont ensuite caractérisées par la voltampérométrie cyclique dans l'acétonitrile avec du perchlorate de lithium à 0,1mol.L⁻¹ (Figure II-8). On observe le signal caractéristique de l'électroactivité du polypyrrole centré autour de 0,30V (figure II-6), ce qui prouve la présence du film à la surface de l'électrode ^[88-89].



**Figure II-8 : Voltampérométrie cyclique d'une électrode de carbone vitreux modifiée par un film de poly (pyrrole-NTA) dans CH_3CN contenant LiClO_4 à $0,1\text{mol.L}^{-1}$. Electrode de carbone vitreux ($\text{Ø} = 3\text{mm}$).
 $\nu = 0,1\text{V.s}^{-1}$.**

II.5.1.d Evaluation du rendement d'électropolymérisation du poly (pyrrole-NTA)

Les voltampérogrammes obtenus après la polymérisation du pyrrole-NTA par chronopotentiométrie permettent de calculer le rendement d'électropolymérisation pour chaque électrode, qui est le rapport entre la quantité d'espèces électroactives immobilisées à la surface de l'électrode $\Gamma_{\text{réel}}$ et la quantité d'espèces immobilisées théoriquement $\Gamma_{\text{théorique}}$ selon l'équation suivante :

$$\eta = \frac{\Gamma_{\text{réel}}}{\Gamma_{\text{théorique}}} \times 100$$

Avec $\Gamma_{\text{réel}}$, le taux de recouvrement réel de l'électrode est calculé à partir de l'équation :

$$\Gamma_{\text{réel}} (\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}) = \frac{Q_{\text{int}}}{n \times F \times S}$$

$$\Gamma_{\text{théorique}} (\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}) = \frac{Q_{\text{polymérisation}}}{n' \times F \times S}$$

Avec :

n : le nombre d'électrons échangés par le système soit 0,33

n' : le nombre d'électrons nécessaires à la polymérisation soit 2,33

F : la constante de Faraday soit 96500 C.mol⁻¹

S : la surface de l'électrode soit 0,0707 cm².

Q_{inté}: la quantité d'électricité intégrée sous le signal du poly (pyrrole-NTA) en Coulomb

$$\text{Soit } Q_{inté} = \frac{Q_{+} + |Q_{-}|}{2}$$

Avec :

Q_{polymérisation}: la charge utilisée pour polymériser le film.

Q₊, Q₋ : les charges anodique et cathodique obtenues sous le signal du poly (pyrrole-NTA).

La charge utilisée est de 2.5 mC.cm⁻² .pour une électrode de 3 mm donc 0.18 mC.

Le tableau suivant résume les calculs du rendement de polymérisation qui sont variables entre 11 % et 22 %. Le rendement moyen du dépôt de polymère par voie électrochimique est de l'ordre de $\eta = 16\%$. Cette faible valeur de rendement est probablement due à la suroxydation du film de poly (pyrrole) et va influencer sur la propriété d'être un bon conducteur électronique^[90]

Tableau II.1 : Electropolymérisation du pyrrole-NTA sur 8 électrodes et calculs du rendement de polymérisation.

Electrode	Q ₊ (C)	Q ₋ (C)	Q _{int} (C)	Γ reel (mol.cm ⁻²)	Γ théorique (mol.cm ⁻²)	η (%)
1	5.06E-06	-2.57E-06	3.81E-06	1.71E-09	1.13E-08	15
2	3.89E-06	-1.71E-06	2.80 E-06	1.26E-09	1.13E-08	11
3	3.98E-06	-1.71E-06	2.84E-06	1.27E-09	1.13E-08	11
4	4.81E-06	-1.86E-06	3.33E-06	1.49E-09	1.13E-08	13
5	5.35E-06	-4.39E-06	4.87E-06	2.18E-09	1.13E-08	19
6	1.94E-06	-7.38E-06	4.66E-06	2.09E-09	1.13E-08	18
7	8.55E-06	-2.97E-06	5.76E-05	2.58E-09	1.13E-08	22
8	6.98E-06	-3.82E-06	5.40E-06	2.42E-09	1.13E-08	21

II.5.1.e Caractérisation impédancemétrique des films de poly (pyrrole-NTA)

Les films de poly(pyrrole-NTA) ont été caractérisés par la spectroscopie d'impédance électrochimique (SIE) dans solution d'hydroquinone à $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du tampon phosphate à $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH}=7,4$. Pour le choix du potentiel continu de l'étude, un voltampérogramme en régime stationnaire a été réalisé. Le potentiel choisi est situé sur la partie linéaire de la courbe $I = f(E)$, ce qui permet d'observer le transfert de charge et la diffusion en impédance soit à $0,325 \text{ V}$ à 25° C (Figure II.9).

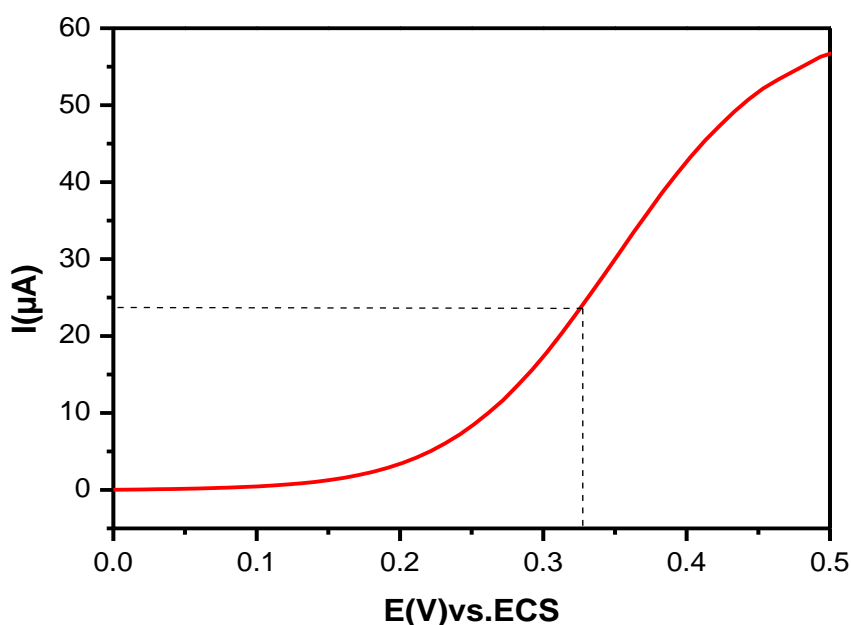


Figure II-9 : Voltampérogramme en régime stationnaire d'une électrode carbone vitreux modifiée avec un film de poly(pyrrole-NTA). Le film de poly (pyrrole-NTA) est formé par chronopotentiométrie ($Q = 2,5 \text{ mC.cm}^{-2}$, $t = 18 \text{ s}$), Sonde redox : hydroquinone 1 mmol.L^{-1} dans du tampon phosphate $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ $\text{pH} 7,4$. Température 25° C , $v_b = 10 \text{ mV.s}^{-1}$, $\Omega = 1000 \text{ tour.min}^{-1}$.

Une fois le choix du potentiel est résolu, les spectres d'impédance comporteront 54 points entre 50 kHz et 1 Hz et 6 points entre 1 et 0,1 Hz. Ainsi, le domaine de fréquence choisi s'étend de 50 kHz à 0,1 Hz. Les spectres sont réalisés sur un film de poly-(pyrrole-NTA) avec plusieurs vitesses de rotation de l'électrode tournante 500, 750 et 1000 tr.min^{-1} à température égale à 25° C (Figure II-10).

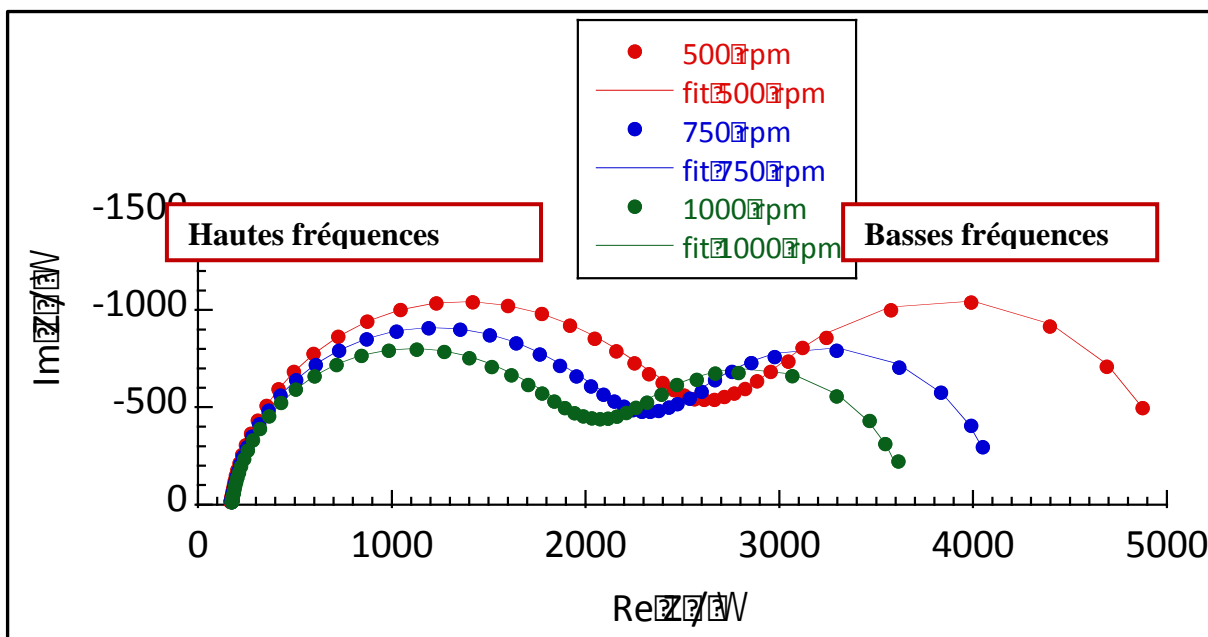


Figure II-10 : Diagrammes de Nyquist obtenus pour différentes vitesses de rotation d'une électrode tournante de carbone vitreux ($\varnothing = 3$ mm) à 500, 750 et 1000 $\text{tour}\cdot\text{min}^{-1}$. Le film de poly-(pyrrole-NTA) est formé par chronocoulométrie ($Q = 2,5$ $\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$, $t = 18$ s). Gamme de fréquences 50 kHz à 0,1 Hz, $E_c = 0,325$ V vs. ECS, $\Delta E = 10$ mVrms, Sonde redox : hydroquinone 10^{-3} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dans du tampon phosphate 10^{-2} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4 Température 25 ° C.

Quand la vitesse de rotation de l'électrode tournante augmente, les spectres d'impédance diminuent avec un écart visible aux basses fréquences où la boucle liée à la diffusion des espèces en solution est affectée par ce changement de vitesse. On a utilisé le circuit équivalent représenté sur la figure II-11 pour réaliser la simulation des spectres obtenus sur la figure II-10 avec le logiciel Z-view. Les paramètres obtenus permettent de valider le choix du circuit de Randles utilisé ^[91] et sont présentés sur le tableau 2.

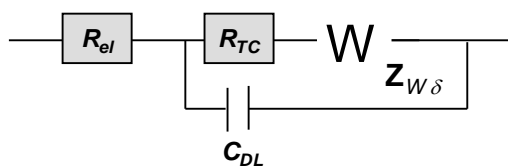


Figure II-11 : Circuit électrique équivalent de Randles.

Tableau II-2 : Valeurs issues de l'ajustement des données avec par le circuit équivalent de Randles choisi.

R_{sol} : résistance de l'électrolyte, R_{tc} : résistance de transfert de charge, C_{DC} : capacité de double couche, f^0 : fréquence du point se trouvant au sommet du premier demi-cercle, n : exposant CPE caractéristique du décentrage du premier demi-cercle par rapport à l'axe des réels, R_{δ} : résistance de la diffusion de l'hydroquinone, τ_{δ} : constante de temps de la diffusion de l'hydroquinone, n_{δ} : angle de Warburg.

	R_{sol}	R_{tc} / Ohm	n	C_{DC} / F	f^0 / Hz	R_{σ} / Ohm	τ_{σ} / s	n_{σ}
500 rpm	168.3	2208	0.929	8.17E-07	88.21	2660	0.96	0.47
750 rpm	171.8	1925	0.928	8.37E-07	93.46	2034	0.63	0.46
1000 rpm	174.7	1687	0.926	8.72E-07	101.60	1797	0.50	0.45

En analysant les valeurs obtenues lors de l'ajustement, une légère variation des paramètres : R_{sol} , C_{DC} , f^0 , n et n_{σ} a été observée sauf la résistance de transfert de charge R_{tc} . Une variation non-négligeable a été notée pour les paramètres liés à la diffusion des espèces en solution. La résistance de la diffusion R_{σ} et le temps de transition τ_{σ} sont attribués à la boucle de diffusion avec n_{σ} . Donc, cette boucle qui correspond à l'impédance de Warburg dans le modèle de Randles, est affectée par la vitesse de rotation de l'électrode poly(pyrrole)-NTA, et l'épaisseur de la couche de diffusion est modifiée sans troubler la vitesse de transfert de charge.

Il s'agit alors de vérifier que les paramètres R_{σ} et τ_{σ} obéissent bien aux équations 2 et 3 et les courbes $R_{\delta} = f(\Omega^{-1/2})$ et $\tau^{1/2} = f(\Omega^{-1/2})$ doivent donc être linéaires selon l'équation 3. Les courbes $R_{\delta} = f(\Omega^{-1/2})$ et $\tau^{1/2} = f(\Omega^{-1/2})$ représentées sur la figure II-12-A et B, sont linéaires suivant les équations 1, 2 et 3 ; avec un facteur de corrélation : $R=0.98821$ et $R=0.9963$ respectivement.

Avec :

D_k : les coefficients de diffusion de la sonde en solution en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$

ν : la viscosité cinématique de la solution en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$

C_k : la concentration de la sonde en $\text{mol}.\text{cm}^{-3}$

P_m : la perméabilité du film en $\text{cm}.\text{s}^{-1}$

Ω : la vitesse de rotation de l'électrode tournante en $\text{rad}.\text{s}^{-1}$.

δ : épaisseur de la couche de diffusion.

Equation 1
$$\tau_{\delta} = \frac{2,54}{2 \pi f_{\delta}} = \frac{\delta^2}{D}$$

Equation 2
$$R_{\delta} = \frac{RT}{n^2 F^2} \frac{\delta}{A D_K C_K}$$

Equation 3
$$\delta = 1,613 D^{\frac{1}{3}} \gamma^{1/6} \Omega^{-\frac{1}{2}}$$

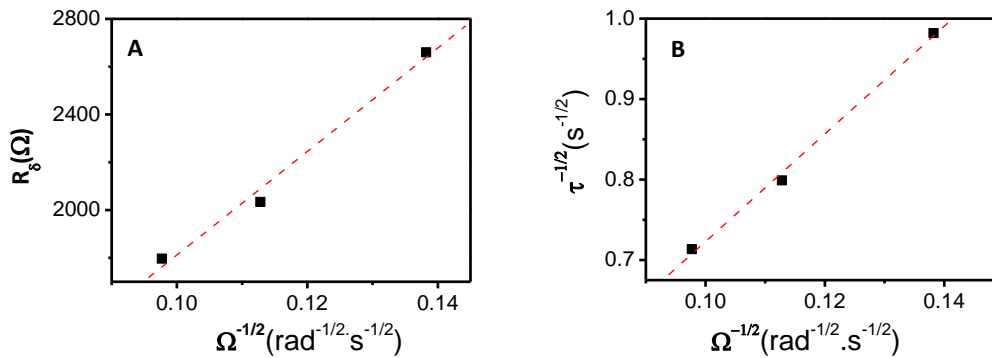


Figure II-12 : A – Evolution de la résistance de diffusion R_{δ} en fonction de l'inverse de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode ($\Omega^{-1/2}$) et B – évolution de $\tau^{1/2}$ en fonction de $\Omega^{-1/2}$.

Ce résultat confirme que l'impédance de Warburg présente un caractère diffusif dû à la diffusion de l'hydroquinone dans la solution. La valeur de la capacité de la double couche $12 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ est cohérente avec l'interface électrode/solution qui est de l'ordre d'une dizaine de microfarad par centimètre carré. Ces résultats permettent de valider le circuit équivalent proposé.

II.5.2 Etude de la réponse du biocapteur

II.5.2.a Etude des étapes d'élaborations de l'aptacapteur

L'élaboration de l'aptacapteur pour la détection du BPA, passe par plusieurs étapes dont l'immobilisation est la plus déterminante. Elle repose sur l'ancrage par interactions affines du système NTA-Cu⁺² / Histidine^[92]. Après la formation du film de poly (pyrrole)-NTA sur l'électrode de carbone vitreux, cette dernière est ensuite incubée dans une

solution de chlorure de cuivre de concentration $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ (préparée dans du tampon acétate $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8) pendant 20 minutes, puis rincée sous vive agitation dans une solution de chlorure de sodium de concentration $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ pendant 15 minutes. L'aptamère déjà préparé comme expliqué précédemment, est immobilisée sur le film de poly (pyrrole-NTA) via les ions cuivre (Figure II-3). Après, des volumes bien défini de bisphénol A, sont ajoutés dans la cellule progressivement pour arriver à des concentrations finales de 10^{-11} à 10^{-6} de BPA dans la cellule qui contenait auparavant 3 ml d'une solution d'hydroquinone dans du tampon phosphate. Il est à noter que le spectre de SIE et le voltampérogramme en SWV, sont enregistrés après une pause de 30 mn après l'ajout du BPA, pour avoir une bonne stabilité du système.

II.5.2.b Caractérisation de l'aptacapteur développé

Pour caractériser le processus d'élaboration étape par étape, une voltamétrie cyclique a été effectuée. Les Voltamogrammes cycliques de la fonctionnalisation de l'électrode et la détection du BPA sont présentés sur la figure II-13. Comme montré sur la figure II-13-a, Le signal d'oxydoréduction de l'hydroquinone se compose d'un couple de pics anodiques et cathodiques à 0,345 et -0,151 V respectivement ($\Delta E_p = 0,496 \text{ V}$). Après que l'aptamère est assemblé sur l'électrode, ces pics sont décalés respectivement à 0,400 et -0,185 V ($\Delta E_p = 0,585 \text{ V}$) indiquant la formation d'une barrière pour la diffusion et / ou le transfert d'électrons de la sonde électrochimique. Ce phénomène reflète l'ancrage de l'aptamère par la coordination de ses groupements histidine sur le complexe Cu^{2+} chélaté par les groupements NTA polymérisés. La diffusion associée au transfert d'électrons de l'hydroquinone est ralenti en présence de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ de bisphénol A dans la solution d'électrolyte, comme peut être prouvé par la diminution des deux intensités anodiques et cathodiques associés à une augmentation de ΔE_p de 0,585 V à 0,738 V. Ces résultats suggèrent un réarrangement de la conformation^[93] de l'aptamère pour combiner avec le BPA, ce qui est moins favorable pour la diffusion de l'hydroquinone vers la surface sous-jacente de l'électrode.

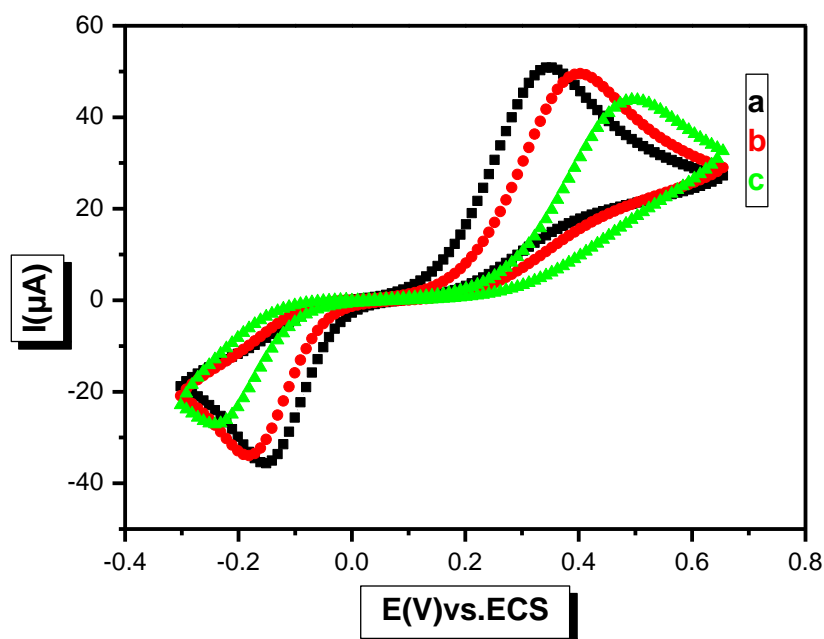


Figure II-13 : Voltamogrammes cycliques d'hydroquinone (1mmol L^{-1}) dans des solutions tampons phosphates de $10^{-2}\text{mole.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$. Jusqu'à un potentiel d'inversion de $0,65\text{ V}$. Vitesse de balayage 100 mV s^{-1} . (a) Electrode modifié par le polymère ; (b) Après ancrage de l'aptamère et (c) Détection de $10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ de BPA. Référence : ECS.

Pour confirmer l'accrochage de l'aptamère et la détection du bisphénol A, des mesures de perméabilité ont été effectuées avant et après immobilisation de l'aptamère et aussi après ajout de 10^{-6} de BPA. La perméabilité électrochimique P_m d'un polymère déposé sur la surface d'une électrode donne des informations sur sa capacité à laisser diffuser les espèces de la solution vers l'électrode et vice-versa. Cette technique est basée sur l'équation de Koutecky-Levich qui permet de relier l'intensité limite (I_{lim}) à la vitesse de rotation de l'électrode (Ω). Comme représenté sur la figure II-14, les voltampérogrammes sont réalisés sur une électrode de poly pyrrole -NTA à différentes vitesses de rotation (250, 500, 750, 1000, 1250 et 1500 tour. min^{-1}).

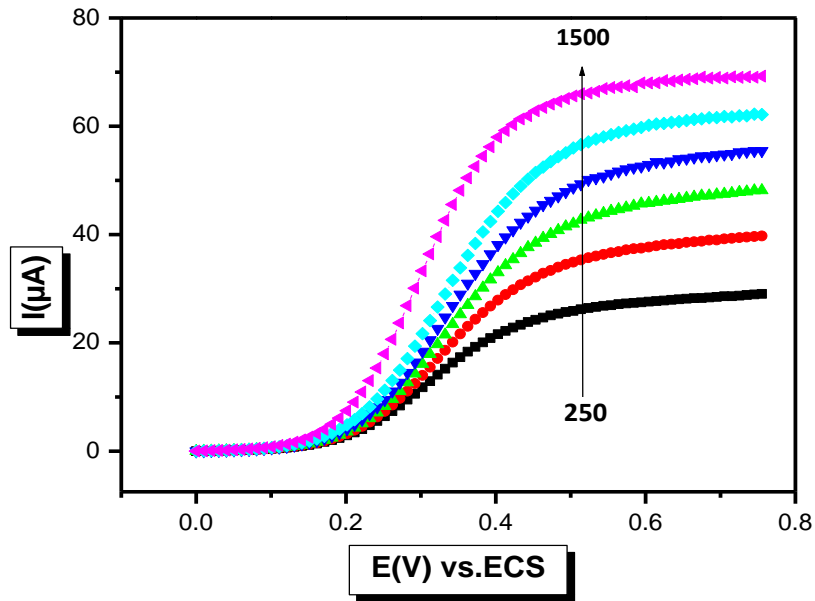


Figure II.14 : Voltampérométrie de l'hydroquinone $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ dans du tampon phosphate $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ pH7, 4. Température 25°C sur une électrode de carbone vitreux ($\varnothing : 3 \text{ mm}$) modifiée par un film de poly-(pyrrole-NTA). Vitesses de rotation de l'électrode $\Omega : 250, 500, 750, 1\ 000, 1\ 250$ et $1500 \text{ tour.min}^{-1}$, $v_b = 10 \text{ mV.s}^{-1}$.

La perméabilité P_m est calculée en utilisant l'équation de Koutecky-Levich (Equation 4)

Equation 4

$$\frac{1}{i_{\text{limite}}} = \frac{1}{i_s} + \frac{1}{i_m} = \frac{1}{0.62 n F D_s^{2/3} v^{-1/6} C_0 \Omega^{1/2}} + \frac{1}{n F P_m C_0}$$

Avec :

i_s : la densité de courant de diffusion en solution en A.cm^{-2}

i_m : la densité de courant de diffusion dans la membrane de polymère en A.cm^{-2}

D_s, D_m : les coefficients de diffusion de la sonde en solution et dans la membrane en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$

v : la viscosité cinématique de la solution en $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$

C_0 : la concentration de la sonde en mol.cm^{-3}

P_m : la perméabilité du film en cm.s^{-1}

Ω : la vitesse de rotation de l'électrode en rad.s^{-1} .

Plus la vitesse de rotation de l'électrode augmente et plus l'intensité limite de stabilisation au plateau est élevée.

On sait que :

$$i_{\text{limite}} = \frac{I_{\text{limite}}}{S}$$

Avec I_{limite} l'intensité du courant au plateau et i_{limite} la densité de courant.

Ces mesures ont été réalisées pour le film de poly (pyrrole-NTA) seul, après immobilisation de l'aptamère et après ajout de à 10^{-6} M de BPA. Chaque tracé de

i^{-1} en fonction de $\Omega^{-1/2}$ donne une droite (figure II-15) dont l'ordonnée à l'origine dépend du coefficient de perméabilité P_m . Le Tableau II.3 présente les valeurs de perméabilité obtenues.

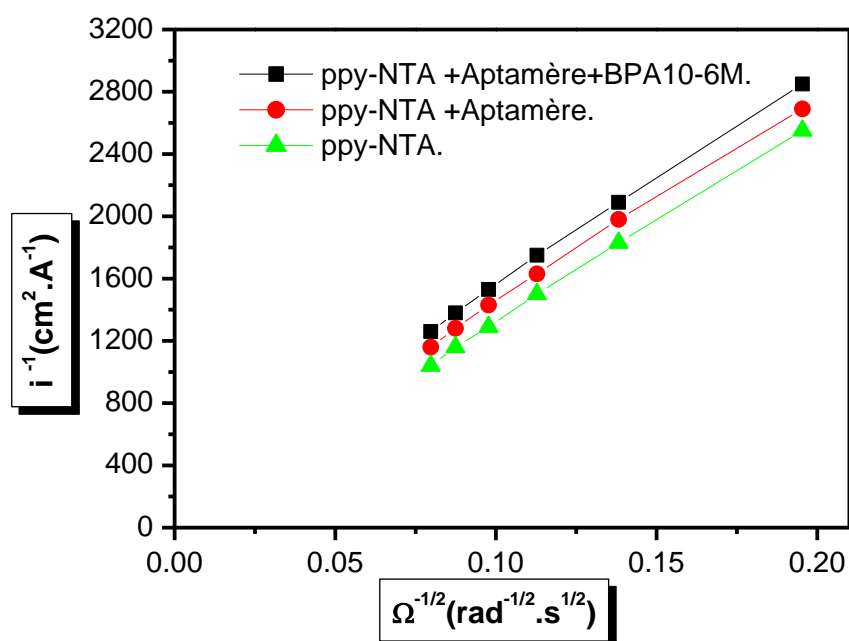


Figure II.15 : Courbes de Koutecky-Levich obtenues à partir des voltampérogrammes réalisés entre 0 et 0,8 V vs.ECS, $v_b = 10$ mV.s⁻¹, d'une électrode tournante de carbone vitreux (\varnothing : 3 mm) sur laquelle un film de poly (pyrrole-NTA) a été électropolymérisé, fonctionnalisé avec l'aptamère puis incubé dans du BPA 10^{-6} M. Sonde redox : hydroquinone 10^{-3} mol.L⁻¹ dans du tampon phosphate 10^{-2} mol.L⁻¹ pH7.4. Température 25°C.

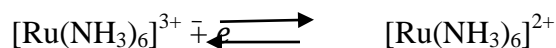
Tableau II.3 : Valeurs de perméabilité P_m obtenues pour les différents états de modification du film de poly-(pyrrole-NTA).

Etat de modification de l'électrode	Poly(pyrrole-NTA)	Poly(pyrrole-NTA)-Aptamère	Poly(pyrrole-NTA)-Aptamère-BPA 10^{-6} mol/L
P_m (cm.s ⁻¹)	$3,57 \times 10^{-1}$	3.97×10^{-2}	$2,72 \times 10^{-2}$

A partir des résultats obtenus, Le film de poly (pyrrole-NTA) étudié ici présente une valeur de perméabilité élevée pour un film de poly (pyrrole-N-alkyl substitué^[83] ($3.57 \times 10^{-1} \text{ cm.s}^{-1}$). Par contre, quand l'aptamère est immobilisé sur le film, la valeur est divisée par 9 ($3.97 \times 10^{-2} \text{ cm.s}^{-1}$), preuve du succès de cette étape d'élaboration. La diminution de la perméabilité après l'ajout de 10^{-6} mol/L de BPA ($2.72 \times 10^{-2} \text{ cm.s}^{-1}$), est du à la détection de ce dernier par l'aptamère, ce qui confirme une affinité et une spécificité élevées pour le bisphénol A.

II.5.2.c Détermination de la quantité d'aptamère immobilisé

Le ruthénium hexamine : est une espèce cationique électroactive couramment utilisé pour estimer la concentration de surface de séquences d'ADN immobilisées^[94]. Le ruthénium hexamine est un complexe octaédrique composé d'un atome central de ruthénium entouré de six ligands NH_3 . Il porte une charge trois fois positive dans sa forme oxydée, tandis que sa forme réduite est chargée deux fois positivement. Du fait de leurs charges positives, les deux formes du complexe peuvent interagir de manière électrostatique avec le squelette désoxyribose-phosphate de l'aptamère, chargé négativement en milieu neutre. Le passage d'une forme à l'autre implique le simple transfert d'un électron d'après la réaction suivante :



Afin de déterminer la quantité d'aptamère immobilisé à la surface de l'électrode modifiée, cette dernière a été incubée dans une solution de $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]^{3+} 10^{-2} \text{ mol. L}^{-1}$ dans du tampon phosphate $\text{pH} = 7,4$ (Figure II-16-A). Après rinçage de l'électrode modifiée à plusieurs reprises sous agitation dans un tampon phosphate, le voltammogramme cyclique enregistré entre $0,00\text{V}$ et $-0,50\text{V}$, présente un pic de réduction situé à $-0,39\text{V}$ lors du balayage aller. Au balayage retour, un pic d'oxydation est détecté associée à l'oxydation de Ru^{II} en Ru^{III} situé à $-0,28 \text{ V}$. Cette courbe affiche un système redox caractéristique de l'électroactivité du couple $\text{Ru}^{\text{III}} / \text{Ru}^{\text{II}}$, ce qui indique l'immobilisation réussie du complexe sur l'électrode modifié par l'aptamère. (Figure II-16-B). L'intensité du courant de ce système varie linéairement avec la vitesse de balayage. Cela corrobore que le procédé n'est pas contrôlé par un processus de diffusion $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, mais attribué à l'immobilisation de ce composé redox par des interactions électrostatiques sur l'aptamère chargé négativement au pH neutre.

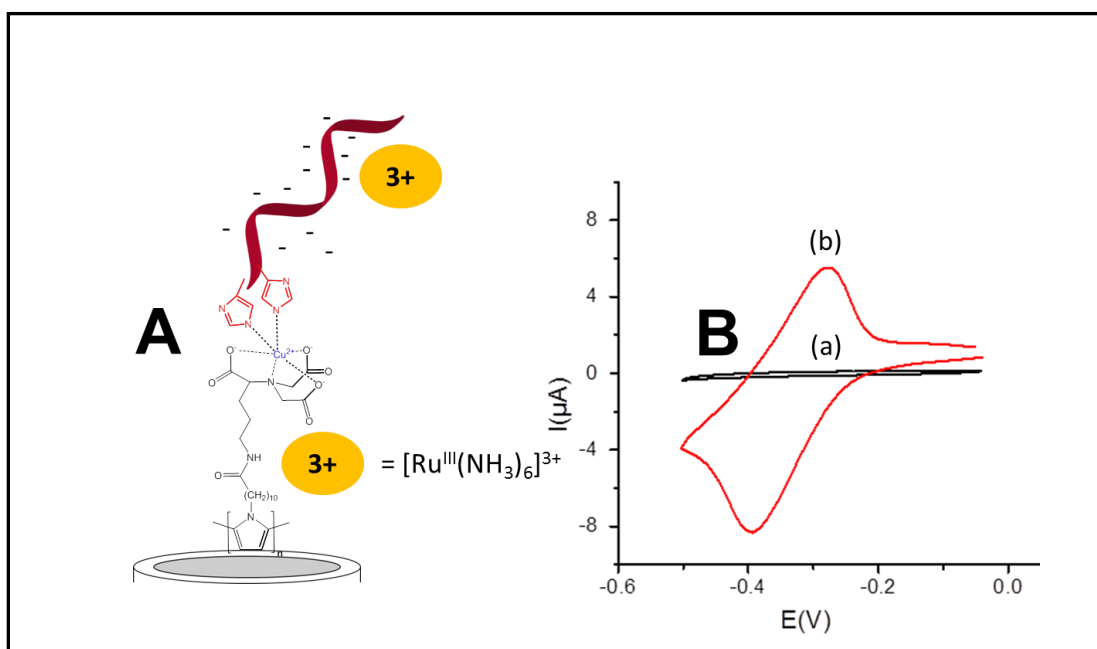


Figure II-16-A. Représentation schématique de l'immobilisation de $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ à la surface de l'électrode modifiée par l'aptamère afin de déterminer le recouvrement de la surface .B.voltampérométrie cyclique de l'électrode modifiée par l'aptamère enregistrée à une vitesse de balayage 50 mV.s^{-1} : (a) sans et (b) après incubation de l'électrode dans une solution de tampon phosphate $10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ contenant $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]^{3+} 10^{-2} \text{ mol. L}^{-1}$ et après le rinçage de l'électrode sous agitation. Electrode de référence : ECS

Cette immobilisation est le résultat de la compensation de trois résidus de phosphates chargés -1 par un complexe de Ru chargé +3. En intégrant le signal sous le système redox ($Q = 1,44 \times 10^{-5} \text{ C}$), la concentration en surface de Ru^{III} a été estimée à

$$\Gamma = 6,63 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}.$$

$$\Gamma_{\text{Ru}} = Q / (nFS)$$

Γ : est le taux de recouvrement surfacique,
 n : est le nombre d'électrons échangés qui est égale à 1,

F : est la constante de faraday et S est la surface de l'électrode.

Cette valeur permet de calculer le taux de recouvrement surfacique de l'ADN ($\Gamma_{\text{ADN}} = 3 \times \Gamma_{\text{Ru}} / 108$). Elle est égale à $1,84 \times 10^{-10} \text{ mol.cm}^{-2}$; en considérant que les 108 groupes phosphate de l'aptamère sont disponibles pour interagir électrostatiquement avec le cation ruthénium.

II.5.2.d Optimisation des conditions expérimentale

Nombreux paramètres clés, y compris la concentration et la préparation de l'aptamère, le temps de réaction avec le BPA, la composition de la solution support et son pH, ont été optimisés pour l'élaboration de l'aptacapteur à BPA [95]. La formation de certaine structure est très souvent dépendante des conditions physicochimiques environnantes et en particulier de la présence, dans la solution, de cations monovalents et bivalents. Ces derniers, ainsi que les molécules d'eau sont indispensables à la stabilisation thermodynamique des structures tertiaires des aptamères pour la stabilité des jonctions d'ADN. Ils sont nécessaires pour stabiliser cette structure et pour commencer le processus de pliage en interagissant avec les groupes phosphate du squelette en particulier, en faisant écran à la répulsion électrostatique entre les charges négatives des sites actifs, c'est-à-dire les réarrangements conformationnels [96]. Par conséquent ; il fallait tester différents ions avec également plusieurs concentrations et on a trouvé que la stabilité de l'aptamère est acquise en présence des ions Na^+ , Mg^{+2} et K^+ avec des concentrations de 10 mM, 1mM et 5mM respectivement. Ces ions ont été introduits dans la dilution de la solution mère du bisphénol A. Le challenge de sélectionner un aptamère présentant une forte affinité est d'autant plus difficile que la molécule est de petite taille. En effet plus la cible présente une taille importante, plus il y aura de liaisons possibles permettant une bonne interaction cible – aptamère [97]. Pour cela, des spectres d'impédance ont été effectués en fonction du temps. 30 minutes a été choisi car il permet d'obtenir un bon repliement de l'aptamère et un spectre d'impédance stable.

II.5.2.e Détection du bisphénol A par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) et de voltamétrie à signaux carrés de potentiel (SWV)

Après immobilisation de l'aptamère, les électrodes ainsi préparées ont été testées pour la détection du bisphénol A. Des quantités progressives allant de 10^{-11} à 10^{-6} ont été ajoutées. Les mesures de spectroscopie d'impédance ont été effectuées à 0,325 V en utilisant la sonde redox hydroquinone dans 10^{-2} mol.L⁻¹ tampon phosphate (pH 7,4) pour chaque concentration considérée.

La figure 17 montre les spectres d'impédance obtenus expérimentalement sans BPA (courbe a) et en présence de différentes concentrations en BPA (courbes b à g) dans la gamme 10^{-11} mol. L⁻¹ à 10^{-6} mol. L⁻¹ ainsi que les spectres obtenus par extrapolation des points expérimentaux en utilisant le circuit électrique présenté sur la figure II-11. Il est observé d'une manière générale que lorsque la concentration en BPA augmente, il y a une

augmentation générale de l'impédance du système due au repliement de l'aptamère. Les spectres de Nyquist indiquent une augmentation de l'impédance, en corrélation avec l'augmentation de la résistance de transfert de charges R_{tc} après chaque addition du BPA pour des concentrations comprises entre 10^{-11} et 10^{-6} mol/L. L'augmentation de R_{tc} est attribuée au changement de la conformation de l'aptamère suite à sa liaison avec le bisphénol A, ce qui à son tour réduit l'accessibilité du couple redox à la surface de l'électrode. Ce blocage est traduit par une augmentation de la résistance de transfert de charge après chaque ajout (Figure II-17).

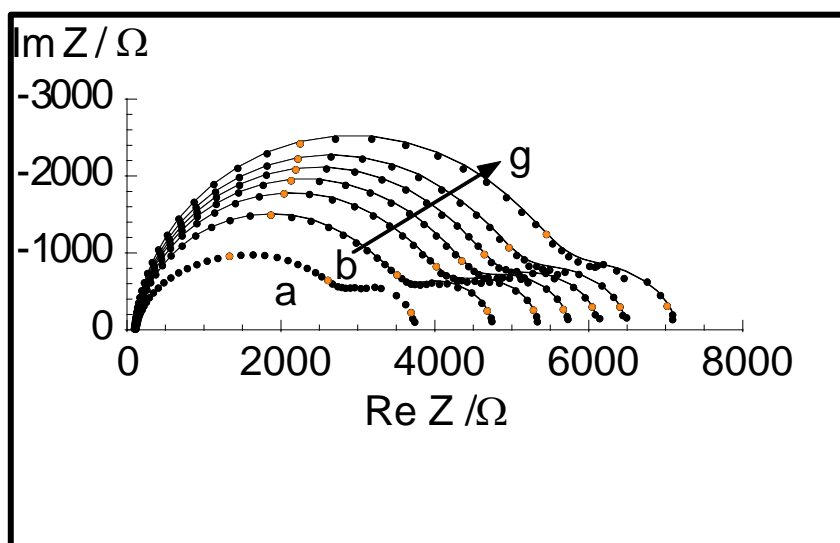


Figure II-17 Tracé des spectres Nyquist d'impédance obtenu à différentes concentrations de BPA sur l'électrode de poly pyrrole -NTA / Cu^{+2} / aptamère : (a) 0 ; (b) 10^{-11} ; (c) 10^{-10} ; (d) 10^{-9} ; (e) 10^{-8} ; (f) 10^{-7} et (g) 10^{-6} mol L⁻¹. Des mesures d'impédance ont été réalisées à 0,325 V par rapport à SCE à l'aide d'hydroquinone 1mmol. L⁻¹ à 10^{-2} mol L⁻¹ de tampon phosphate, pH 7,4. L'électrode de référence : ECS .Expérimentale (points) et les données ajustées (lignes) sont présentées. Les trois points rouges sur un spectre, correspondent à 59,3 ; 7,7 et 0,25 Hz.

Le comportement électrique de ce système électrochimique peut être représenté par un circuit électrique équivalent. Il est appliqué pour ajuster les données expérimentales et extraire les informations nécessaires sur les paramètres électriques responsables des modifications apportées à l'interface électrode/électrolyte. Le circuit est constitué de la résistance ohmique de la solution d'électrolyte et du film R_{el} , la résistance de transfert de charge R_{tc} , en série avec l'impédance de Warburg limitée par la diffusion et parallèle à une double couche de C_{DC} capacité classique.

La courbe passant par les points de données de la Figure II-17, représente la courbe d'ajustement en utilisant ce circuit équivalent décrit ci-dessus. Sa superposition sur les

points de données, a indiqué une bonne adéquation du modèle avec les données mesurées. Les valeurs des éléments du circuit équivalents obtenus par l'ajustement des données expérimentales sont présentées dans le tableau 4.

Tableau II-4 : valeurs des éléments du circuit équivalent (R_{tc} , C_{DC} , n et R_{diff}) obtenues pour le montage des données expérimentales qui correspondent aux variations de l'impédance de l'électrode modifiée par l'aptamère lors de la détection de différentes concentrations de BPA.

C_{BPA} (mol/L)	$R_{tc}(\Omega)$	$C_{DC} (\mu F cm^{-2})$	N	$R_{diff}(\Omega)$	$Z_{\omega=7.7 Hz}$ (Ω)
10^{-11}	3350 ± 50	10.5 ± 0.2	0.912	1310 ± 20	3582
10^{-10}	3880 ± 60	9.7 ± 0.2	0.928	1400 ± 30	4103
10^{-9}	4230 ± 70	9.3 ± 0.2	0.934	1440 ± 30	4441
10^{-8}	4530 ± 70	9.1 ± 0.2	0.939	1520 ± 30	4743
10^{-7}	4830 ± 80	8.9 ± 0.2	0.941	1590 ± 30	5074
10^{-6}	5320 ± 80	8.8 ± 0.2	0.943	1756 ± 30	5589

On peut observer une forte augmentation de la résistance de transfert de charge passant de 3 350 Ω à 5 320 Ω pour une concentration de BPA de 10^{-11} mol .L⁻¹ à 10^{-6} mol.L⁻¹ alors que la résistance de diffusion, obtenue à des plus faibles fréquences, augmente plus faiblement de 1 310 Ω à 1 756 Ω . L'augmentation de ces 2 résistances est dû au changement de la conformation de l'aptamère suite à sa liaison avec le bisphénol A. L'augmentation de la résistance de diffusion est inférieure à celle de la résistance de transfert de charge. La diffusion est donc moins affectée par la présence du BPA que le transfert de charge. Le changement de la configuration de l'aptamère après reconnaissance du bisphénol A a également un impact direct sur deux autres paramètres énumérés dans le tableau 4, qui sont la capacité de la double couche, C_{DC} et le paramètre de l'homogénéité de l'interface, n . La capacité de la double couche d'environ $10 \mu F.cm^{-2}$ diminue avec l'augmentation de la concentration du BPA, ce qui est en faveur d'une augmentation de l'épaisseur de la double couche. En ce qui concerne le paramètre n , il augmente avec l'augmentation de la concentration du bisphénol A donc une meilleure homogénéité de l'interface, une courbe d'étalonnage a été établie en traçant R_{tc} en fonction du logarithme de la concentration du BPA. Une gamme de linéarité est obtenue entre 10^{-11} et 10^{-6} mol.L⁻¹ avec une sensibilité de $372 \pm 6 \Omega$ par ordre de grandeur démontrant les caractéristiques

efficaces du biocapteur conçu ($R^2 = 0,991$). Pour réaliser un dosage à une fréquence qui permettrait de gagner du temps au niveau de l'analyse, la fréquence de 7,7 Hz a été choisie, car une forte variation du module de l'impédance est obtenue à cette fréquence (figure II-18). Cette stratégie a été utilisée précédemment et constitue un moyen plus facile et plus rapide qu'effectuer des spectres d'impédances à différentes fréquences [97]. Comme attendue, une relation linéaire similaire entre 3582Ω et 5589Ω a été obtenue dans la gamme de concentration entre 10^{-11} et 10^{-6} mol.L⁻¹ avec une sensibilité presque identique (pente = 379 ± 6 Ω par ordre de grandeur avec $R^2 = 0,991$ (Figure II-18).

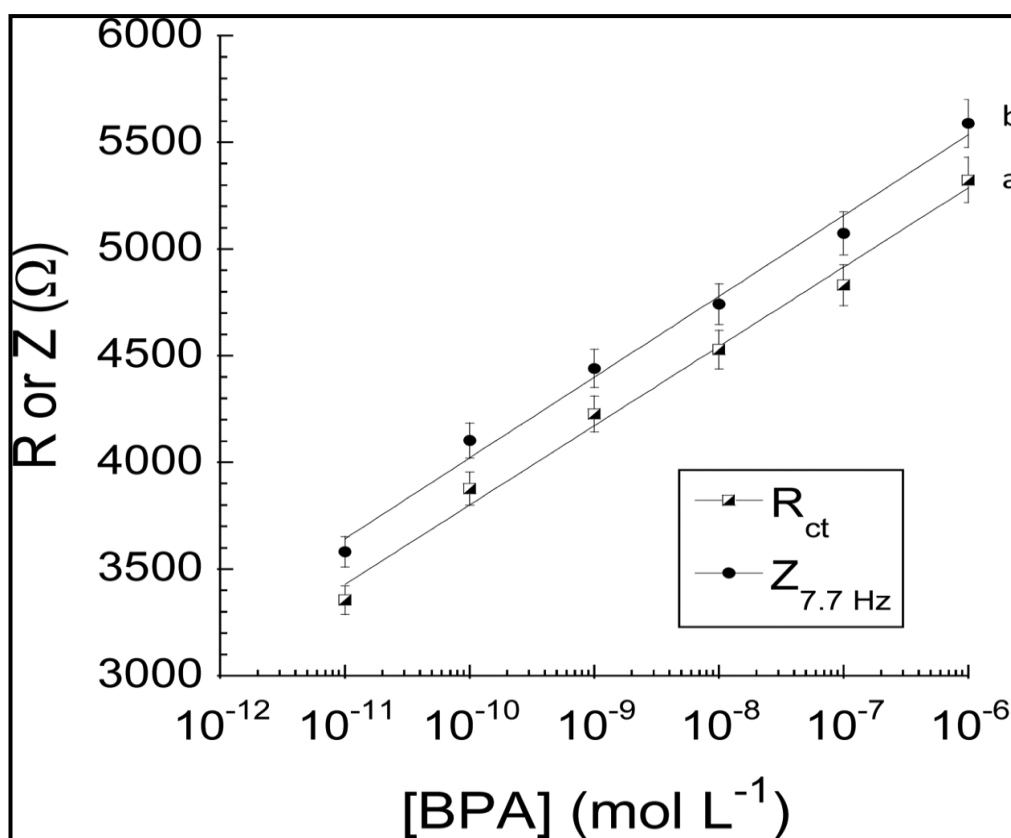


Figure II-18 : Courbe d'étalonnage du biocapteur à BPA correspondant aux variations de l'impédance de l'électrode lors de la détection de concentrations de BPA différentes (a) R_{ct} : résistance de transfert de charges obtenues par ajustement des données expérimentales ; $Z_{7.7 \text{ Hz}}$: Module de l'impédance obtenu à 7,7 Hz. Expérimental (points) et la régression linéaire (droites) sont présentées. Les conditions expérimentales sont identiques à la figure II-17.

Les résultats obtenus précédemment par spectroscopie d'impédance ont été confirmés par des mesures de la voltamétrie à signaux carrés de potentiel (figure II-19). Le pic du courant anodique associé à l'oxydation de l'hydroquinone diminue avec les concentrations croissantes de BPA de 10^{-11} mol .L⁻¹ à 10^{-6} mol .L⁻¹ tandis que le potentiel augmente de 0,365 à 0,386 V par rapport à ECS. Cela indique clairement que le

changement de la configuration de l'aptamère induite par la reconnaissance du BPA génère de nouveaux empêchements stériques à la diffusion de l'hydroquinone vers la surface de l'électrode. De plus, un épaulement est détecté $E_{pa} = 0,615$ V sur les courbes de SWV pour une concentration de 10^{-7} mol. L⁻¹ de BPA et des concentrations plus élevées de BPA. Ce système est attribué à l'oxydation de BPA ^[98] piégées dans l'aptamère à la surface de l'électrode.

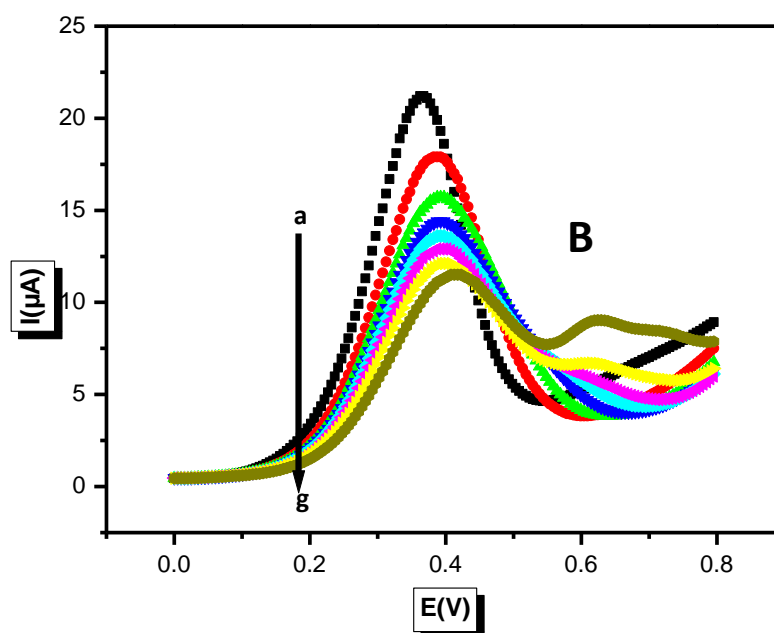


Figure II-19: Voltampérométrie carrée (SWV) d'une solution d'hydroquinone 10^{-3} mol.L⁻¹ dans 10^{-2} mol.L⁻¹ de tampon phosphate, pH 7.4 obtenue à différentes concentrations de BPA sur une électrode de polypyrrole -NTA / Cu⁺² / aptamère : (a) 0 (b) 10^{-11} ; (c) 10^{-10} ; (d) 10^{-9} ; (e) 10^{-8} ; (f) 10^{-7} et (g) 10^{-6} mol L⁻¹. Les mesures SWV ont été effectuées jusqu'à un potentiel de 0,65V. Référence : ECS.

Pour les courbes de la SWV, la courbe d'étalonnage a été tracée en reportant la différence $\Delta j = (j - j_0)$ entre la densité de courant mesurée en présence du bisphénol A (j) et sans BPA (j_0) en fonction du logarithme de la concentration de BPA (figure II-20). Comme le montre la figure II-20, le BPA peut être quantifié sur une gamme de concentration de 10^{-10} à 10^{-6} mol.L⁻¹ avec une relation linéaire entre les courants et la concentration du BPA et une sensibilité de $12,32 \mu A.cm^{-2}$. Lorsqu'on compare la courbe d'étalonnage à celle obtenue avec l'EIS, on constate que la gamme dynamique linéaire est inférieure d'un ordre de grandeur montrant l'efficacité de la méthode impédimétrique.

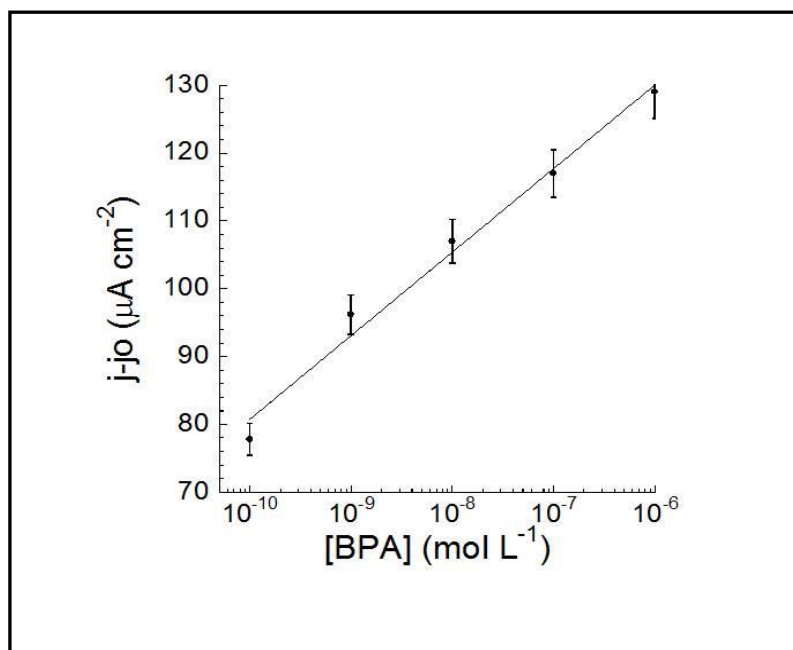


Figure II-20 : Courbe de calibration du biocapteur BPA, indiquant la variation des densités de courant en fonction de la concentration en BPA. Expérimental (points) et la régression linéaire (pointillés) sont présentées. Les conditions expérimentales sont identiques à la figure II.19.

En résumé, ce nouveau capteur impédimétrique offre une limite de détection très compétitive 10^{-11} mol.L⁻¹ avec une gamme de linéarité plus élevée (cinq ordres de grandeur ou décades) par rapport aux aptacapteurs électrochimiques récents décrits dans la littérature. Jusqu'à présent, seuls quelques exemples d'aptacapteurs ont signalés une limite inférieure. En 2013, Xue et al ^[99] ont conçu un aptasensor avec une limite de détection de $1,24 \times 10^{-12}$ mol.L⁻¹ et une gamme de linéarité de 4 décades en utilisant le bleu de méthylène comme intercalant. Le principe est basé sur la reconnaissance concurrentielle de BPA et d'un ADN complémentaire. Bien que la limite de détection est très concurrentiel, il est basé sur un "signal off" alors que notre capteur impédimétrique est basé sur un "signal on" avec une augmentation du module d'impédance. L'aptacapteur électrochimique le plus récent ^[100] basé sur le « signal on », présente une limite de détection de $1,9 \times 10^{-13}$ mol.L⁻¹, avec une gamme de linéarité de 2 décades alors que le capteur élaboré au cours de ce travail, présente une linéarité de 5 décades sachant que la gamme de linéarité étant un paramètre clé dans la conception des biocapteurs.

Tableau 5 : Publications récentes relatives aux aptacapteurs à BPA.

Méthode de transduction	Limite de détection (mol.L ⁻¹)	Gamme de linéarité (mol.L ⁻¹)	Référence
Fluorescence	8,15x10 ⁻⁹	4,38x10 ⁻⁸ à 50x10 ⁻⁷	Li et al, 2016 ^[101]
Electrochimique	1,9x10 ⁻¹³	10 ⁻¹² à 10 ⁻¹⁰	Yu et al, 2016 ^[100]
Fluorescence	1,86x10 ⁻⁹	2x10 ⁻⁹ à 10 ⁻⁷	Yildirim et al, 2014 ^[102]
Electrochimique	5x10 ⁻⁹	10 ⁻⁸ à 10 ⁻⁵	Zhou et al, 2014 ^[103]
Photoélectrochimique	1,8x10 ⁻¹¹	1,8x10 ⁻¹¹ à 3,2x10 ⁻⁹	Zhang et al, 2013 ^[104]
Electrochimique	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹¹ à 10 ⁻⁶	Ce travail.

II.5.2.f Spécificité du biocapteur

La spécificité peut être définie comme la capacité de discrimination entre des molécules de structure proche en compétition pour un ligand commun. Pour des applications pratiques, il est nécessaire de tester la sélectivité de cet aptacapteur en présence d'autres interférents. Pour ce faire, l'aptacapteur a été testé en présence d'autres molécules pouvant se présenter dans les mêmes échantillons environnementaux et avec une structure chimique proche au bisphénol A. Les molécules étudiées 4,4'-dihydroxybiphényle (DHB) et le 4,4'-(1,4-Phénylène-di-isopropylidène) (bisphénol P) présentent de fortes homologues structurales avec le bisphénol A comme en témoigne la figure II-21 :

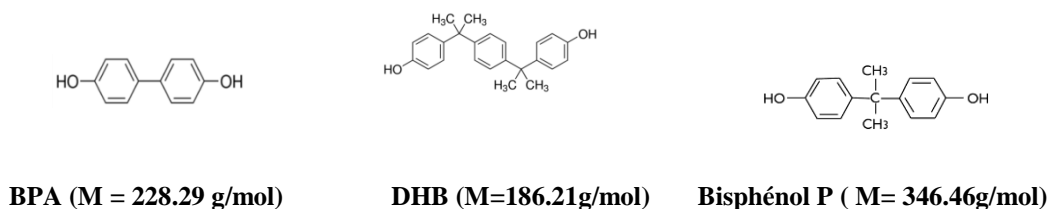


Figure II.21 : Molécules sélectionnées lors de l'étude de la sélectivité.

L'étude de la spécificité de cet aptamère vis-à-vis du bisphénol A, a été réalisée avec plusieurs interférents avec une concentration de 10⁻⁶ M. La spécificité de l'aptasensor proposé a été examinée également en évaluant le changement de R_{tc} en présence de 10⁻⁶ mol

L^{-1} de ces deux agents interférents. Cette valeur a été choisie, car elle est à la limite de la linéarité du système. Sans la présence du BPA, une augmentation de 3,6% de la résistance de transfert de charges a été observée pour le DHB (figure II-22) et 12,3% pour le BPP. La comparaison de ces deux valeurs avec la valeur de 18,8% atteinte pour la plus faible concentration de BPA (10^{-11} mol L^{-1}); montre sans ambiguïté la sélectivité de l'aptacapteur réalisé dans ce chapitre de thèse. En choisissant le module d'impédance à la fréquence 7,7 Hz, une augmentation de 3,5% a été observée pour le DHB alors qu'il est de 11% pour le BPP. La comparaison de ces deux valeurs avec la valeur de 14,5% obtenue pour la plus faible concentration de BPA (10^{-11} mol L^{-1}) est en accord avec les résultats obtenus avec la résistance de transfert de charge.

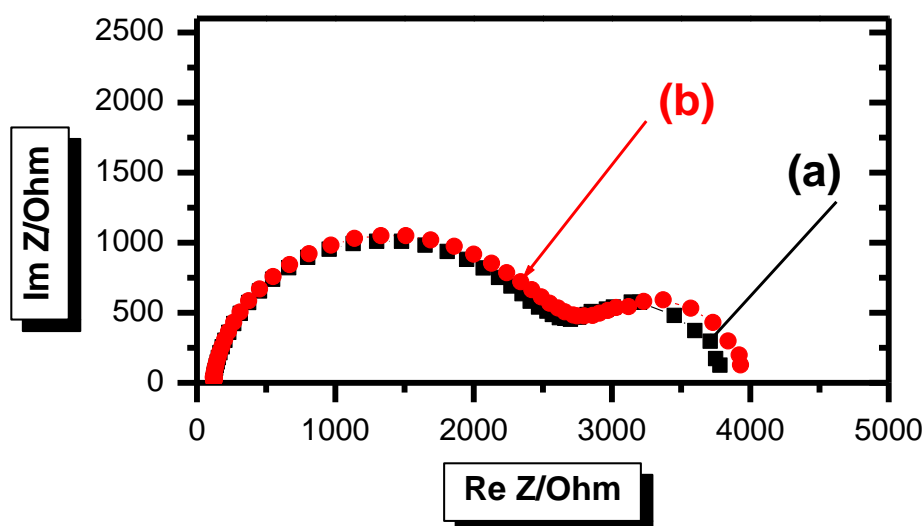


Figure II-22 : Tracé des spectres de sélectivité obtenus sur l'électrode de poly pyrrole -NTA / Cu^{+2} : (a)Aptamère, (b) Ajout du DHB à 10^{-6} mol.L $^{-1}$.

II.6 Conclusion de la partie A

Ce chapitre a été consacré à l'élaboration d'un biocapteur à transduction électrochimique basée sur l'immobilisation d'un aptamère comme élément de biorecognition du bisphénol A dans l'eau. L'interaction NTA/ Cu^{+2} /Histidine a été utilisée pour réaliser l'immobilisation de l'aptamère. La stratégie SELEX chimique est très intéressante pour sélectionner des aptamères qui ciblent des petites molécules, car le compteur SELEX peut être utilisé pour augmenter la spécificité contre des molécules de structure similaire. Ainsi, les aptamères peuvent détecter les petites molécules mieux que les anticorps, en raison de leur plus grande capacité à discriminer les petites différences

structurelles, telles qu'un groupe fonctionnel unique. La détection par spectroscopie d'impédance se révèle être la méthode la plus performante en raison de sa haute sensibilité, et sélectivité. On a abouti au développement d'un aptacapteur, avec une détection sensible, sélective avec des meilleures performances analytiques, en particulier en termes de limite de détection et de stabilité. Une limite de détection très compétitive de 10^{-11} mol L⁻¹ a été déterminée associée à une grande gamme de linéarité de 5 ordres de grandeur et une sensibilité de 372 Ω par ordre de grandeur; ces paramètres étant essentiels pour la conception d'un aptacapteur. Étant donné la facilité de conception de l'aptacapteur réalisé, ce dispositif d'analyse pourrait constituer une méthode prometteuse pour surveiller la présence de BPA dans les aliments, l'eau potable ou l'environnement.

Références bibliographiques de la partie A

- [1] SeonghaCho, MHee-SeokLee, yung-SilHwang, Yong EuiKoo, Youngja H.Park, *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Volume 58, March **2018**, Pages 1-10.
- [2]Zar ChiThent, Gabriele Ruth AnisahFroemming, SuhailaMuid, *Life Sciences*.Volume 198, 1 April **2018**, Pages 1-7.
- [3] Enguang Lv, Jiawang Ding, Wei Qin, *Sensors and Actuators B: Chemical j.snb*.**2017**.12.067.
- [4]Eun-Song Leea, Gae Baik Kima, Su-Hyun Ryua, Hyeon Kimb, Hye Hyun Yoob,Moon Young Yoonc, Jin-Won Leea,Myung Chan Gyea, Young-Pil Kima, *Sensors and Actuators B* 260 (**2018**) 371–379.
- [5] H. Jo, C. Ban, *Exp. Mol. Med.* 48 (**2016**) 1–9 (e230).
- [6] S.G. Kim, J.S. Lee, J. Jun, D.H. Shin, J. Jang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8(**2016**) 6602–6610.
- [7] Staples, C. A.; Dome, P. B.; Klecka, G. M., Oblock, S. T.; Harris, L. R. *Chemosphere***1998**, 36, 2149-2173.
- [8] Podlipna.D , Cichna-Markl.M.*Eur.Food.Res.Technol* **2007**,224,629-634.
- [9] Soto.A.M,Sonnenschein.C,*Nat.Rev.Endocrinol***2010**,6,363-370.
- [10] Robin.B.S,*Steroid.Biochem.Mol.Biol***2011**,127,27-34.
- [11] Valentina Becerra, Jurgen Odermatt, *Analyst*, **2012**, 137, 2250–2259.
- [12] Grain.DA, Eriksen.M,Iguchi.T, Jobling.S, Lanfer.H,Le blanc.GA, Guillette.LJ, *Reprod.toxicol* **2007**,24,225-239.

- [13] Hideyuki.Y, Hajine.H Hitoshi.N, Masatoshi.Y. *Anal.Chem.Acta* **2003**,488,211-221.
- [14] Vandenberg, L.N.; Maffini, M.V.; Sonnenschein, C.; Rubin, B.S.; Soto, A.M, *Endocr. Rev.* **2009**, 30, 75–95.
- [15] Geens, T.; Goeyens, L.; Covaci, A, *Int.J. Hyg. Environ. Health* **2011**, 214, 339–347.
- [16] Fregert, S.; Rorsman, H, *J. Investig. Dermatol.* **1962**, 39, 471–472.
- [17]Knaak, J.B.; Sullivan, L.J, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1966**, 8, 175–184.
- [18] Gaul, L.E, *Arch. Dermatol.* **1960**, 82, 1003. *Toxics* **2017**, 5, 22 12 of 16.
- [19] Krishnan, A.V.; Stathis, P.; Permuth, S.F.; Tokes, L.; Feldman, D, *Endocrinology* **1993**, 132, 2279–2286.
- [20] Rochester, J.R, *Reprod. toxicol.* **2013**, 42, 132–155.
- [21] Melnick, R.; Lucier, G.;Wolfe, M.; Hall, R.; Stancel, G.; Prins, G.; Gallo, M.; Reuhl, K.; Ho, S.M.; Brown, T.;et al, *Environ. Health Perspect.* **2002**, 110, 427–431.
- [22] European Food Safety Authority (EFSA). Bisphenol A: Disponible en ligne : <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol.htm> (accessible le 19 Mars 2018).
- [23] Doerge, D.R.; Twaddle, N.C.; Vanlandingham, M.; Fisher, J.W. *Toxicol. Lett.***2011**, 207, 298–305.
- [24] Doerge, D.R.; Twaddle, N.C.; Vanlandingham, M.; Fisher, J.W, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, 247, 158–165.
- [25]Doerge, D.R.; Twaddle, N.C.; Woodling, K.A, *Toxicol, J.W.. Appl. Pharmacol.* **2010**, 248, 1–11.
- [26] Völkel, W.; Colnot, T.; Csanády, G.A.; Filser, J.G.; Dekant, W, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15, 1281–1287.
- [27] Völkel, W.; Kiranoglu, M.; Fromme, H, *Toxicol. Lett.* **2008**, 179, 155–162.
- [28] Stahlhut, R.W.; Welshons, W.V.; Swan, S.H, *Environ. Health Perspect.* **2009**, 117, 784–789.
- [29] European Commission. Commission Directive 2011/8/eu of 28 January 2011 Amending Directive2002/72/ec as Regards the Restriction of Use of Bisphenol A in Plastic Infant Feeding; Bottles, Brussels, **2011**.
- [30] Fan, R.; Zeng, B.; Liu, X.; Chen, C.; Zhuang, Q.; Wang, Y.; Hu, M.; Lv, Y.; Li, J.; Zhou, Y.; et al, *Environ. Sci. Process. Impacts* **2015**, 17, 667–673.
- [31] Konieczna, A.; Rutkowska, A.; Racho´ n, D, *Rocz. Pa´nstwowego Zakładu Hig.* **2015**, 66, 5–11.

- [32] GORE A.C., CHAPPELL V.A., FENTON S.E. et al , *Endocr. Rev.*, **2015** ; er 2015.1093.
- [33] Edna Ribeiro, Carina Ladeira, Susana Viegas; *Toxics* **2017**, 5, 22;toxics5030022.
- [34] Kirsten S. Eckstrum, Whitney Edwards, Annesha Banerjee, Wei Wang†, Jodi A. Flaws, John A. Katzenellenbogen, Sung Hoon Kim, and Lori T. Raetzman, *Endocrinology Endocrine Society* ,**2017**.
- [35] Chen F, Zhou L, Bai Y, Zhou R, Chen L, *Brain Res.***2014**;1571:12–24.
- [36] Seachrist DD, Bonk KW, Ho SM, et al, *Reprod Toxicol.* **2016**;59:167–82.
- [37] Ziv-Gal A, Flaws JA. *Fertil Steril.* **2016**;106:827–56.
- [38] Mallozzi, M.; Bordi, G.; Garo, C.; Caserta, D. A review on the major concerns. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **2016**, 108, 224–242.
- [39] Patricia A. Hunt, Sheela Sathyanarayana, Paul A. Fowler, and Leonardo Trasande. *J Clin Endocrinol Metab.***2016**Apr ;101(4):1562-70.
- [40] Ribeiro, E.; Ladeira, C.; Viegas, S. *Toxics* **2017**, 5, 5.
- [41] Mallozzi,M.; Leone, C.;Manurita, F.; Bellati, F.; Caserta, D. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2017**, 14.
- [42] Hartono, M. R.; Assaf, A.; Thouand, G. ; Kushmaro, Ariel, Chen X., Marks, S. *Water Air Soil Pollut*, **2015**, 226-382.
- [43] Ragavan, K.V.; Rastogi, N.K.; Thakur, M.S. *TRAC Trend Anal. Chem.* **2013**, 52, 248–260.
- [44] Cao, X.-L., *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **35**, 2795-2829 (**2012**).
- [45] Selvaraj KK, Shanmugam G, Sampath S, et al, *Ecotoxicol Environ Saf.* **2014**;99:13–20.
- [46]Cappiello A, Famiglini G, Palma P, et al, *Anal Bioanal Chem.* **2014**;406:2779–88.
- [47] Noonan GO, Ackerman LK, Begley TH, *J Agric Food Chem.* **2011**;59:7178–85.
- [48] Becerra V, Odermatt J, *Analyst.* **2012**;137:2250–9.
- [49] Ji W, Du L, Zhang Y, et al, *Food Anal Methods.* **2015**;8: 2596–604.
- [50] Mei Z, Chu H, Chen W, et al, *Biosens Bioelectron.* **2013**;39:26–30.
- [51] Lei YJ, Fang LZ, AkashMSH, et al, *Anal Methods.* **2013**;5:6106–13.
- [52] Ohkuma, H., Abe, K., Ito, M., Kokado, A., Kambegawa, A., and Maeda, M, *Analyst*, 127, 93-97 (**2002**).

- [53] Marlene Vila, Maria Celeiro, J. Pablo Lamas, Thierry Dagnac, Maria Llompart and Carmen Garcia-Jares, *Anal. Methods*, **2016**.
- [54] ASTM International, Standard Test Method for Determin. Water (II), 11.01, 1552 (2013).
- [55]. De Meulenaer, B., Baert, K., Lanckriet, H., Van Hoed, V., and Huyghebaert, A., *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5273-5282 (2002).
- [56] Estévez-Alberola, M.C. and Marco, M.P., *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 563-575 (2004).
- [57] Lu, Y., Peterson, J., Gooding, J., and Lee, N., *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 1607-1618 (2012).
- [58] Hegnerová, K., Piliarik, M., Šteinbachová, M., Flegelová, Z., Černohorská, H., and Homola, J., *Anal. Bioanal. Chem.*, **398**, 1963-1966 (2010).
- [59] Liu-YinHu, Da-WeiHuang, LeiZhang, Guang-MingZeng. *Talanta* Volume 168, 1 June **2017**, Pages 196-202.
- [60] Ying, JingyueXu, LuokaiWang, YanjunHuang, JiajiaGuo, XianyiCao, FeiShen., YeliLuo, ChunyanSun., *Sensors and Actuators B: Chemical*. Volume 222, January **2016**, Pages 815-82.
- [61] Hu, L.-s., Fong, C.-C., Zou, L., Wong, W.-L., Wong, K.-Y., Wu, R.S.S., and Yang, M., *Biosens. Bioelectron.*, **53**, 406-413 (2014).
- [62] Liu YJ, Liu Y, Liu B. *J Electroanal Chem.* **2016**;781:265–71.
- [63] Deiminiat B, Rounaghi GH, Arbab-Zavar MH, et al., *Sensors Actuators B Chem.* **2017**;242:158–66.
- [64] Ávila, M., Zougagh, M., Ríos, Á., and Escarpa, A., *Trends Anal. Chem.; TrAC*, **27**, 54-65 (2008).
- [65] Kubo, I., Yokota, N., Fuchiwaki, Y., and Nakane, Y., *ISRN Materials Science*, **2012**, 6.
- [66] Apodaca, D.C., Pernites, R.B., Ponnappati, R., Del Mundo, F.R., and Advincula, R.C., *Macromolecules*, **44**, 6669-6682 (2011).
- [67] Kambiz Varmira, Milad Saed-Mocheshi, Ali R. Jalalvand, *Sensing and Bio-Sensing Research* **15** (2017) 17–33.
- [68] Piao, M.-H., Noh, H.-B., Rahman, M.A., Won, M.-S., and Shim, Y.-B., *Electroanalysis*, **20**, 30-37 (2008).
- [69] Ying Huang , XiaofengLi ,Sining Zheng., *Talanta* **160** (2016)241–246.

- [70] Yang Lu , Mengjuan Li, Minling Ding , Guozhen Liu, Yan Zhang , ShuoWang., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 779 (2016) 34–38.
- [71] Jo, M.; Ahn, J. Y.; Lee, J.; Lee, S.; Hong, S. W.; Yoo, J. W.; Kang, J.; Dua, P.; Lee, D. K.; Hong, S. *Oligonucleotides* **2011**, 21, 85–91.
- [72] Nimet Yildirim, Feng Long, Miao He, Han-Chang Shid, April Z. Gu., *Environ. Sci.: Processes Impacts*, **2014**, 16, 1379–1386.
- [73] Ragavan, K. V.; Selvakumar, L. S.; Thakur, M. S. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 5960–5962.
- [74] Zhang, Y.; Cao, T.; Huang, X.; Liu, M.; Shi, H.; Zhao, G. *Electroanalysis* **2013**, 25, 1787–1795.
- [75] Mei, Z.; Chu, H.; Chen, W.; Xue, F.; Liu, J.; Xu; Zhang, R.; Zheng, L. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 39, 26–30.
- [76] Li, Y.; Xu, J.; Wang, L.; Guo, J.; Cao, X.; Shen, F.; Luo, Y.; Sun, C. *Sens. Actuators, B* **2016**, 222, 815–822.
- [77] Zhou, L.; Wang, J. P.; Li, D. J.; Li, Y. B. *Food Chem.* **2014**, 162, 34–40.
- [78] Mei, Z. L.; Qu, W.; Deng, Y. I.; Chu, H. Q.; Cao, J. X.; Xue, F.; Zheng, L.; El-Nezamic, H. S.; Wu, Y. C.; Chen, W. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 49, 457–461.
- [79] Zhu, Y. Y.; Cai, Y. L.; Xu, L. G.; Zheng, L. X.; Wang, L. M.; Qi, B.; Xu, C. L. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 7492–7496.
- [80] Yu, P.; Liu, Y.; Zhang, X.; Zhou, J.; Xiong, E.; Li, X.; Chen, J. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 79, 22–28.
- [81] Xue, F.; Wu, J.; Chu, H.; Mei, Z.; Ye, Y.; Liu, J.; Zhang, R.; Peng, C.; Zheng, L.; Chen, W. *Microchim. Acta* **2013**, 180, 109–115.
- [82] Ali Khademhosseini et al. (eds.), *Biological Microarrays: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 671, **2011**.
- [83] Quentin Palomar. Thèse de doctorat . Université Grenoble Alpes, **2017**. France.
- [84] Minjoung Jo, Ji-Young Ahn, Joohyung Lee, Seram Lee, Sun Woo Hong, Jae-Wook Yoo, Jeehye Kang, Pooja Dua, Dong-ki Lee, Seunghun Hong, and Soyoun Kim., *Oligonucleotides*. Volume 21, Number 2, **2011**.
- [85] Moreau, J.; Dendane, N.; Schöllhorn, B.; Spinelli, N.; Fave, C.; Defrancq, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 955–958.
- [86] Feriel Melaine. Thèse de doctorat. Université de Grenoble, **2014**.
- [87] Diaz et al., *J. Electroanal. Chem.*, 133 (1982) 233–239.

- [88] A. F. Diaz, J. Castillo, K. K. Kanazawa, J. A. Logan, M. Salmon, O. Fajardo, J. Electroanal.Chem. Interfacial Electrochem. **1982**, 133, 233–239.
- [89] A. Deronzier, J. C. Moutet, Acc. Chem. Res. **1989**, 22, 249–255.
- [90] Jessica Baur., Thèse de doctorat. Université de Grenoble, **2010**.
- [91] Orazem ME, Tribollet B Electrochemical impedance spectroscopy.Wiley, New York.(**2008**).
- [92] Naoufel Haddour, Serge Cosnier, Chantal Gondran, J. Am. Chem. Soc., 127 (**2005**) 5752-5753.
- [93] Chang, Y. M.; Chen; C. K. -M.; Hou, M. H. Int. J. Mol. Sci. **2012**, 13, 3394-3413.
- [94] Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J., Anal. Chem., (**1998**) 70, 4670
- [95] Feng Xue & Jingjing Wu & Huaqin Chu & Zhanlong Mei & Yongkang Ye & Jian Liu & Rui Zhang & Chifang Peng & Lei Zheng & Wei Chen, Microchim Acta (**2013**) 180:109–115.
- [96] Somia MEHENNAOUI.Thèse de doctorat, Université de Québec, Montréal. (**2016**).
- [97] Giroud, F.; Gorgy, K.; Gondran, C.; Cosnier, S.; Pinacho, D. G.;Marco, M.-P.; Sánchez-Baeza, F. J. Anal. Chem. **2009**, 81, 8405–8409.
- [98] Brugnera, M. F.; Trindade, M. A. G.; Zanoni, M. V. B. Anal. Lett.**2010**, 43, 2823-2836.
- [99] Xue, F.; Wu, J.; Chu, H.; Mei, Z.; Ye, Y.; Liu, J.; Zhang, R.; Peng,C.; Zheng, L.; Chen, W. Microchim. Acta **2013**, 180, 109–115.
- [100] Yu, P.; Liu, Y.; Zhang, X.; Zhou, J.; Xiong, E.; Li, X.; Chen, J.Biosens. Bioelectron.**2016**, 79, 22–28.
- [101] Li, Y.; Xu, J.; Wang, L.; Guo, J.; Cao, X.; Shen, F.; Luo, Y.; Sun,C. Sens. Actuators, B **2016**, 222, 815–822.
- [102] Nimet Yildirim, Feng Long,Miao He, Han-Chang Shid, April Z. Gu, Environ. Sci.: Processes Impacts, **2014**, 16, 1379–1386.
- [103] Zhou, L.; Wang, J. P.; Li, D. J.; Li, Y. B. Food Chem. **2014**, 162,34–40.
- [104] Zhang, Y.; Cao, T.; Huang, X.; Liu, M.; Shi, H.; Zhao, G. Electroanalysis **2013**, 25, 1787–1795.

Chapitre II
Partie B- Application de la propriété
d'échange des cations de la
bentonite naturelle à la détection des
ions ammonium.

II-Introduction

L'ammonium est un nutriment important utilisé pour améliorer la production agricole. Cependant, des concentrations élevées en ammonium peuvent causer l'eutrophisation des cours d'eau naturels, ce qui contribue à des changements indésirables dans la qualité de l'eau et la structure de l'écosystème. L'ammonium dans l'eau traduit habituellement un processus de dégradation incomplet de la matière organique. Il provient de la réaction des minéraux contenant du fer avec des nitrates. C'est donc un excellent indicateur de la pollution des nappes phréatiques par des rejets organiques d'origine agricole, industrielle ou municipale telles que les usines de traitement des eaux usées^[1-4]. Les normes de l'Organisation Mondiale de Santé autorisent 0.2mg/L d'ammonium dans l'eau potable (peut aller jusqu'à 0,3mg/l dans une eau anaérobique)^[5]. En conséquence, de nombreuses méthodes, telles que biologique, physique, chimique, ou une combinaison de ces méthodes, ont été développées pour l'élimination de l'ammonium des eaux usées et d'autres sources ponctuelles. Ils comprennent principalement l'échange d'ions et l'adsorption, la technologie biologique, l'extraction à l'air, la chloration au point de rupture, précipitation chimique, osmose inverse et l'oxydation de l'eau supercritique. Il existe plusieurs limitations des technologies actuelles, y compris les coûts élevés, faibles taux d'élimination, haute sensibilité au pH et température et l'introduction de nouveaux polluants. Comparé à d'autres techniques, l'échange d'ions et la technique d'adsorption présentent de nombreuses caractéristiques favorables. Elles démontrent une forte affinité pour l'ammonium, une efficacité élevée, faible coût, simplicité d'application et de fonctionnement ainsi que le respect de l'environnement. Plusieurs travaux de recherche ont porté sur le développement de capteurs à base de récepteurs chimiques ou biologiques pour la détection de l'ammonium^[6-8]. En effet, I. Keda et al.^[9] ont développé une membrane microbienne *Trichosporoncutaneum* qui a été immobilisée pour la surveillance des ions ammonium dans les eaux usées. Différents types de matrices polymères ont été testées, pour optimiser les caractéristiques spécifiques de l'ISFET développées en immobilisant la nonactine sur la surface de celle-ci à l'aide d'une matrice à base de PVC et DNP, en mélangeant la nonactine avec une matrice à base de poly (acrylate de n-butyle)^[10] ou en utilisant le même ligand avec une matrice à base de siloprene (polysiloxane) sur un transducteur à effet de champ^[11]. Certains travaux ont utilisé la zéolite (clinoptilolite) comme échangeur d'ions et siloprene (membrane polymère) ou le PVC et le phtalate de dioctyle comme matrice^[12]. Les études rapportées dans la littérature étaient principalement

axées sur l'utilisation de la membrane microbienne et des zéolithes ou de la nonactine comme ligands. Les résultats obtenus ont montré des dispositifs plus ou moins stables avec des limites de détection comprises entre 10^{-5} et 10^{-6} M. L'argile a été proposée comme agent de dépollution, vu qu'elle est peu coûteuse et écologique en raison de ses propriétés physiques, chimiques et structurales. L'utilisation d'une argile naturelle, dans ce cas la bentonite, pour la production de la partie sensible d'un capteur chimique sera lancée pour la première fois. En effet, les propriétés de la bentonite avec sa forte capacité d'échange cationique et sa capacité d'adsorption aux ions cationiques, suggèrent que son immobilisation sur un transducteur pour la réalisation facile d'un capteur chimique peut donner des résultats satisfaisants. La bentonite est formée par l'altération des cendres volcaniques. Son composant principal est la montmorillonite minérale argileuse, qui est un aluminosilicate de type 2:1. La couche interne est composée d'une feuille octaédrique située entre deux feuilles tétraédriques de SiO_4 . Des substitutions dans la structure en réseau de l'aluminium trivalent pour le silicium quadrivalent dans la feuille tétraédrique et des ions de valence inférieure, en particulier de magnésium, pour l'aluminium trivalent dans la feuille octaédrique entraînent une charge nette négative sur les feuilles d'argile. Le déséquilibre de charge est compensé par des cations échangeables tels que H^+ , Na^+ ou Ca^{2+} sur les surfaces de la feuille ^[13-14]. Dans les solutions aqueuses, les molécules d'eau sont intercalées dans l'espace inter-lamellaire de la bentonite, conduisant à une expansion des minéraux ^[15]. La nature chimique et la structure des pores des bentonites en général déterminent leur capacité d'adsorption ^[16]. Elles ont été utilisées pour éliminer un certain nombre d'espèces chimiques: ions métalliques ^[17-18], ammoniac ^[19], colorants ^[20], surfactants non ioniques ^[21], acide humique ^[22], protéine ^[23], acide salicylique^[24] et autres polluants organiques ^[25]. Cependant, leur capacité d'adsorption en colorant anionique est très faible par rapport aux surfaces de feuilles chargées négativement ^[26].

L'objet de ce chapitre est de décrire l'élaboration et la caractérisation d'un capteur capable de détecter par voie électrochimique les ions ammonium dans l'eau. On a adopté un nouveau mode d'utilisation de la bentonite comme élément de reconnaissance basée sur un échange d'ion et dispersée dans une matrice de PVC-DNP. L'électrode modifiée est ensuite caractérisée par spectroscopie d'impédance électrochimique. La voltampérométrie cyclique vient confirmer les phénomènes interfaciaux liés au courant capacitif produit par la double couche électrique.

II.1 Procédures expérimentales

Ce travail a été effectué au laboratoire LIME à l'université de Jijel. Ce chapitre est divisé en trois sections qui reflètent les étapes d'élaboration et de caractérisation du capteur. La première partie se focalise sur la préparation de la membrane polymérique (Bentonite-polymère). La seconde partie est l'occasion d'identifier le succès des différentes étapes. Enfin, la dernière partie s'intéresse au volet de détection électrochimique de l'ion ammonium grâce au capteur réalisé.

II.2 Elaboration du capteur

La bentonite choisie pour cette étude est une montmorillonite des gisements de hammam Boughrara, situé à 25 km au Nord-Est de Maghnia, à l'ouest Algérien. Le gisement est exploité actuellement par l'Entreprise Nationale des Produits Miniers Non Ferreux et des Substances Utiles (ENOF, SPA). Sa formule structurale moyenne est la suivante :



A l'état brut, cette bentonite se présente sous forme de poudre blanche. Du point de vue minéralogique, l'analyse semi-quantitative par diffraction des rayons X de la bentonite naturelle a montré la présence de la montmorillonite en grande proportion (85%). La composition inclut également le quartz (10 %), la cristoballite (4.0 %) et la beidellite (moins de 1 %). Pour diminuer le nombre de paramètres d'études, il faut s'assurer de la présence d'un seul type de cation dans l'espace interfoliaire de l'argile. Pour cette raison et afin de purifier les échantillons, un dopage est réalisé avec le carbonate de sodium pour avoir des argiles sodiques.

L'« Atelier analyse structurale et texturale via la filiale SPA CRAPC Expertise »^[27] s'est chargé de la réalisation des analyses suivantes:

1. Microscopie Electronique à Balayage couplée à EDX (MEB/EDX).
2. Fluorescence des Rayons X (FRX).
3. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF).
4. Analyse Thermogravimétrique.
5. Analyse de la surface spécifique par BET.
6. Diffraction des rayons X.

Les clichés obtenus par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) révèlent une structure lamellaire cristalline (en feuillets) (Figure II-1). Ce minéral est constitué

essentiellement de silicium, d'aluminium et d'oxygène. Il est donc de la famille des alumino-silicates. A cela, s'ajoutent, en faibles pourcentages, quelques métaux, des alcalins et des alcalino-terreux. Une analyse plus poussée, de la composition, a été réalisée par Fluorescence des Rayons X (FRX). D'autres minéraux et métaux nobles existent en très faibles pourcentages (Tableau II-1).

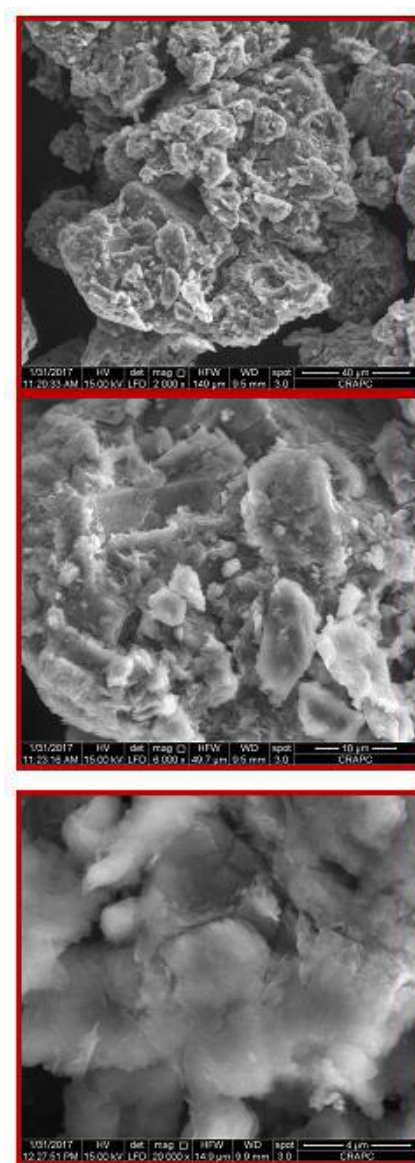


Figure II-1 : Images MEB de la bentonite de Magnia (Hammam boughrara) [27]

Tableau II-1 : Composition chimique de la bentonite de Maghnia (FRX)

Electrode	Composé	Résultats %	Oxyde	Résultats %
1	B	1.16	B ₂ O ₃	3.7413
2	C	1.17	CO ₂	4.3031
3	F	0.428	-	-
4	Na	1.3	Na ₂ O	1.7563
5	Mg	2.41	MgO	3.9935
6	Al	9.42	Al ₂ O ₃	17.7993
7	Si	28	SiO ₂	59.9256
8	P	0.02	P ₂ O ₅	0.0457
9	S	0.157	SO ₃	0.3912
10	Cl	0.872	-	-
11	K	1.7	K ₂ O	2.0436
12	Ca	1.02	CaO	1.4274
13	Ti	0.13	TiO ₂	0.2164
14	Cr	0.0204	Cr ₂ O ₇	0.0298
15	Mn	0.0394	MnO	0.0509
16	Fe	2.01	Fe ₂ O ₃	2.8682
17	Ni	0.0039	NiO	0.005
18	Cu	0.0015	CuO	0.0018
19	Zn	0.0067	ZnO	0.0083
20	Ga	0.0032	Ga ₂ O ₃	0.0043
21	Br	0.001		
22	Rb	0.0291	Rb ₂ O	0.0318
23	Sr	0.0167	SrO	0.0197
24	Y	0.0032	Y ₂ O ₃	0.0041
25	Zr	0.009	ZrO ₂	0.0121
26	Nb	0.0051	Nb ₂ O ₅	0.0074
27	Pb	0.0109	PbO	0.0117

Les spectres enregistrés de Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) confirment les conclusions quant à la structure, à travers les bandes caractéristiques présentées sur la figure II-2. Par ailleurs, cette analyse a permis de distinguer le caractère hygroscopique de ce minéral. Il est donc, conseillé, voir nécessaire de le mettre dans une étuve, à température bien définie avant son emploi.

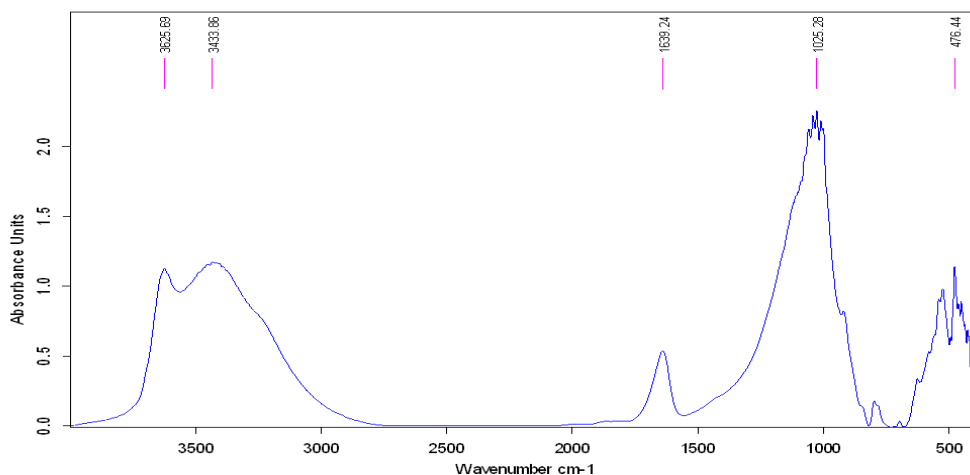


Figure II-2 : Analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier de la bentonite de Maghnia^[27].

Sur le plan propriété thermique, l'échantillon présente une bonne résistance thermique au dessous de 400°C. Des réarrangements moléculaires (déshydroxylation, perte des molécules d'eau) se produisent, jusqu'à sa dégradation totale vers 650°C-700°C (Figure II-3). Ce matériau présente une séparation entre les lamelles qui le compose qui est de l'ordre de 12 nm (analyse DRX). Ce matériau présente aussi une aptitude à s'engager dans des réactions de substitution de cations. Il est fort recommandé à être employé dans des réactions d'adsorption (Résultats BET).

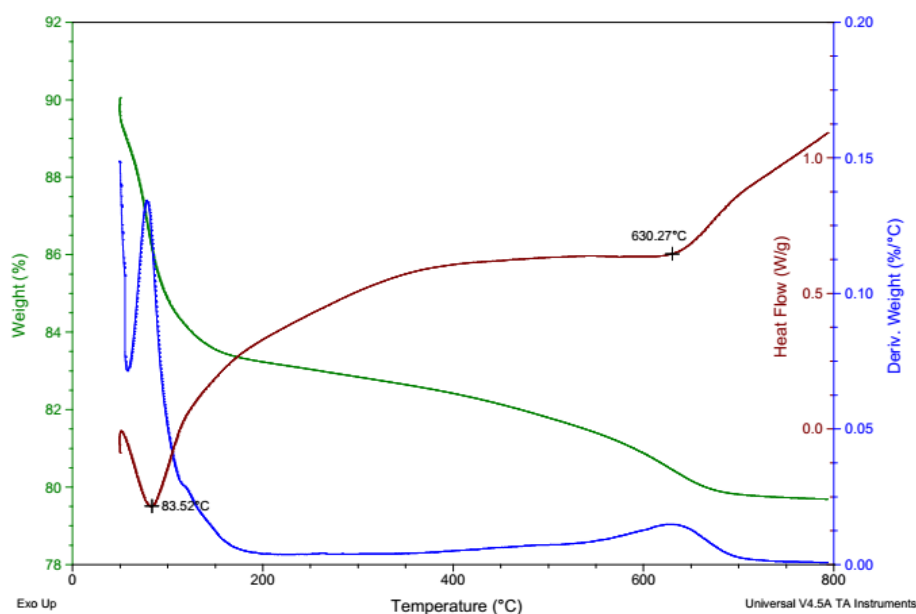


Figure II-3 : Analyse Thermogravimétrique de la bentonite de Maghnia^[27]

II.2.1 Protocole de la mise au point de la membrane

L'immobilisation de cette bentonite sodique constitue la première étape dans la fonctionnalisation de l'électrode modifiée, le protocole de préparation de la membrane polymérique, consiste à mélanger des proportions en masse de la bentonite avec comme matrice le chlorure de polyvinyle (PVC) associé à un plastifiant le dinonyl-phthalate (DNP). Le polymère sert de matrice pour la membrane sensible, le plastificateur assure un milieu favorable pour les composants électroactifs. La composition de la membrane a été choisie en se basant sur les valeurs optimisées par Zougar et al ^[28]. Avant le dépôt de la membrane, les électrodes en or ont été traitées aux ultrasons pendant 10 min dans de l'acétone, puis séchées sous flux d'azote. Après cela, la surface d'or a été nettoyée pendant 1 min avec un mélange de "piranha" fraîchement préparé ($H_2O_2 : H_2SO_4, 3:7, v / v$) et rincé soigneusement. Puis les électrodes en or ont été lavées à l'éthanol, rincées à l'eau et enfin séchées sous flux d'azote ^[29].

Pour la détection des ions ammonium, la membrane polymérique composée de 7% de bentonite, 30% PVC et 62% de DNP par rapport à la masse totale du mélange, a été dissoute dans du tétrahydrofurane (THF). Une goutte de 5 μ l de chaque suspension est déposée sur la surface de l'électrode d'or par la méthode de spin-coating en suivant les paramètres suivants :

rpm = 2500, rpm/s = 2000, t = 30. Après séchage à l'air pendant plusieurs heures, l'électrode fonctionnalisée est plongée dans une solution de chlorure d'ammonium (0.1M à pH 7.2), pendant 12 heures. L'épaisseur de la membrane ainsi que le temps d'immersion ont été optimisés.

II.2.2. Mesures électrochimiques

Toutes les mesures électrochimiques, ont été réalisées avec un analyseur d'impédance potentiostat-galvanostat Voltalab 40 de type Radio-Meter PGZ 301, piloté par le logiciel Volta Master 4 dans une cellule électrochimique à trois électrodes, placée dans une cage de Faraday afin de minimiser l'interférence des ondes électromagnétiques. Une électrode en or ($S= 0,19 \text{ cm}^2$) modifiée avec la membrane PVC-DNP / bentonite, a été utilisée comme électrode de travail, l'électrode au calomel saturée (SCE) comme électrode de référence et une plaque de platine comme électrode auxiliaire (Figure II.4). Les mesures de spectroscopie d'impédance ont été déterminées dans une solution tampon phosphate 0.1 M à pH 7,2 en appliquant un potentiel de -200 mV, et en faisant varier la fréquence dans la

gamme de 100 kHz à 1MHz avec une amplitude de 10 mV. Les spectres d'impédance mesurés ont été analysés en termes de circuits électriques équivalents en utilisant le programme d'analyse ZView (Scribner Associate Inc, Southern Pines, USA).

Les mesures de voltamétrie cyclique ont été effectuées dans une solution de tampon phosphate 0.1 M contenant le couple redox ferri (ferro) cyanure $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. Le potentiel varie de -700 à +700 mV et une vitesse de balayage de 25 mV/s.

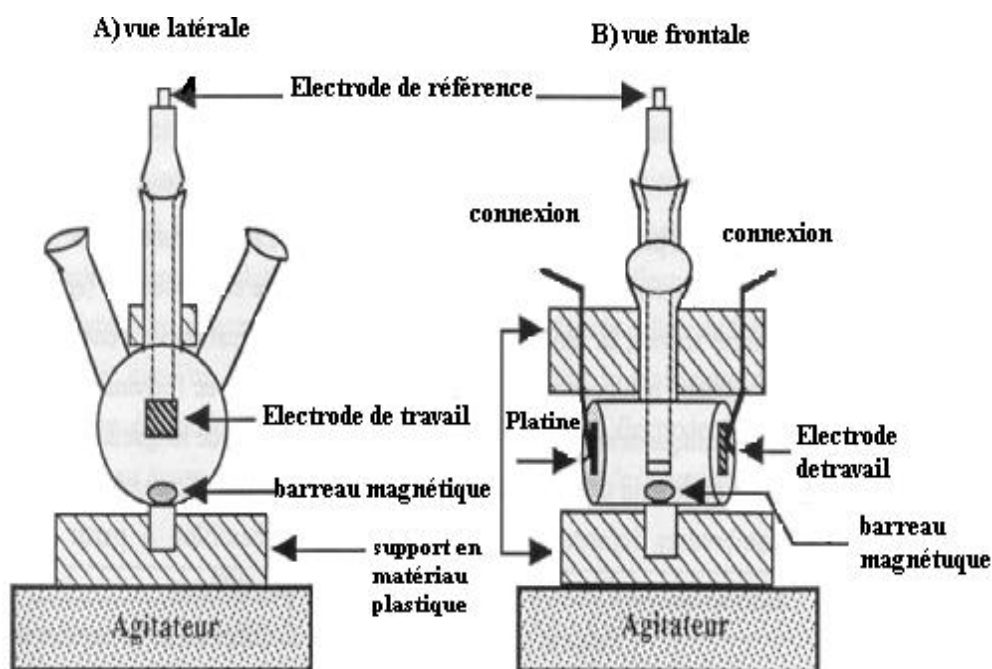


Figure II.4: Vue latérale et vue frontale de la cellule électrochimique de mesure.

II.3 Etude de la réponse du capteur

II.3.1 Etude des étapes d'élaborations du capteur

Pour caractériser les étapes d'élaboration du capteur, une voltamétrie cyclique a été effectuée. La figure II.5 représente les voltammogrammes cycliques de l'électrode d'or nue puis fonctionnalisée par la membrane (bentonite+ PVC). Les pics d'oxydation et de réduction du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ sont visibles avant le dépôt de la couche sensible.

Après le dépôt, ces deux pics sont significativement plus faibles, ce qui est attribué à la diminution du taux de transfert d'électrons à travers le film mince hybride immobilisé. Cette dernière forme une couche presque isolante sur la surface de l'électrode et que les électrons ne peuvent pas être transférés librement vers l'électrode.

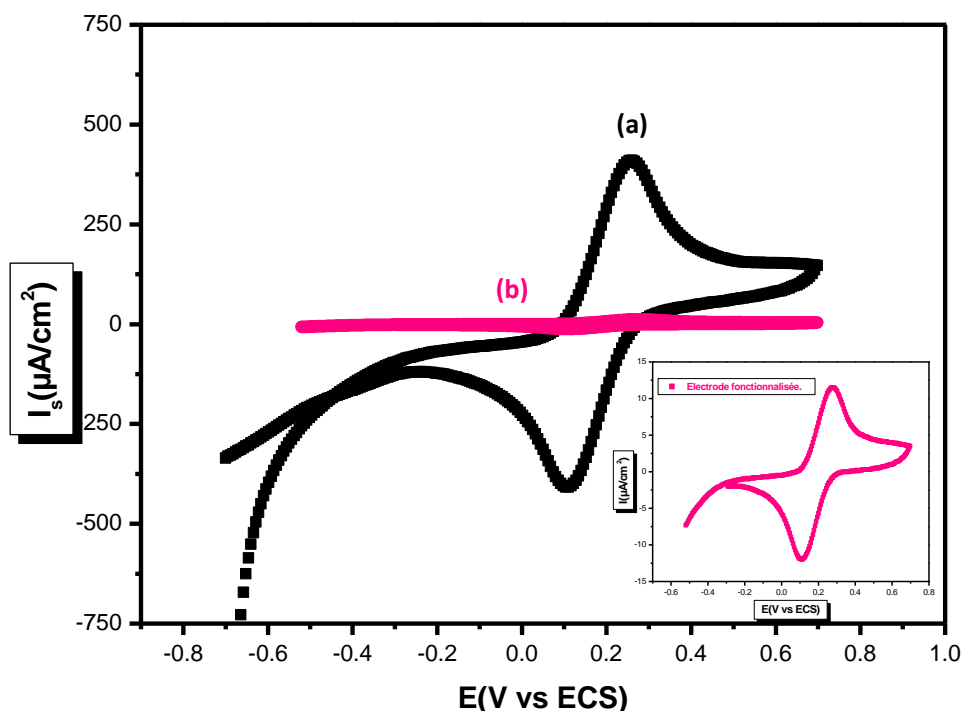


Figure II-5 : Voltamogrammes cycliques du couple redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (2mmol L^{-1}) dans des solutions tampons phosphates de $10^{-1}\text{mole.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,2$.) de -700 à $+700$ mV .Vitesse de balayage 25 mV.s^{-1} . (a) Electrode d'or nue ; (b) Electrode fonctionnalisée (bentonite-PVC).

Les spectres d'impédance confirment les résultats obtenus par voltamétrie cyclique (figure II.6). On observe une augmentation importante de l'impédance après l'étape du dépôt de la membrane PVC-bentonite. Ce résultat confirme que le transfert d'électrons à l'électrode est ralenti par l'ajout de la membrane. Les spectres de Nyquist sont constitués d'un demi-cercle correspondant à un processus de limitation du transfert d'électrons. Le diamètre du demi-cercle représentant la résistance de transfert d'électrons (R_{tc}) à l'interface est étroitement lié à l'empêchement du flux des électrons vers la surface de l'électrode et peut être utilisé pour décrire les propriétés d'interface de l'électrode.

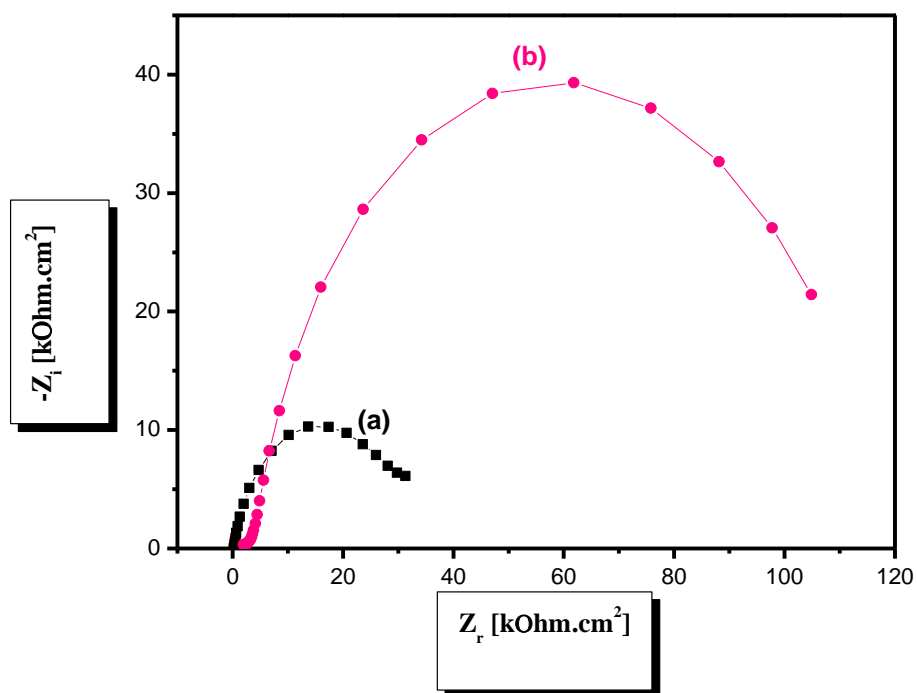


Figure II.6 : Tracé des spectres Nyquist d'impédance sur l'électrode d'or. (a) Electrode d'or nue ; (b) Electrode fonctionnalisée (bentonite-PVC). Des mesures d'impédance ont été réalisées à -0,2 V dans 10^{-1} mol L⁻¹ de tampon phosphate, pH 7,2.

II.3.2 Détection des ions ammonium par spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS) et de voltamétrie cyclique

Après la fonctionnalisation de l'électrode, cette dernière a été testée pour évaluer la réaction entre la bentonite et les ions ammonium. Des quantités progressives allant de 10^{-11} à 10^{-1} ont été injectées. Les mesures de spectroscopie d'impédance ont été effectuées pour chaque concentration considérée. La figure II.7 présente les spectres d'impédance obtenus sans ammonium (courbe a) et en présence de différentes concentrations en NH_4^+ (courbes b à h) dans la gamme 10^{-11} mol. L⁻¹ à 10^{-1} mol. L⁻¹.

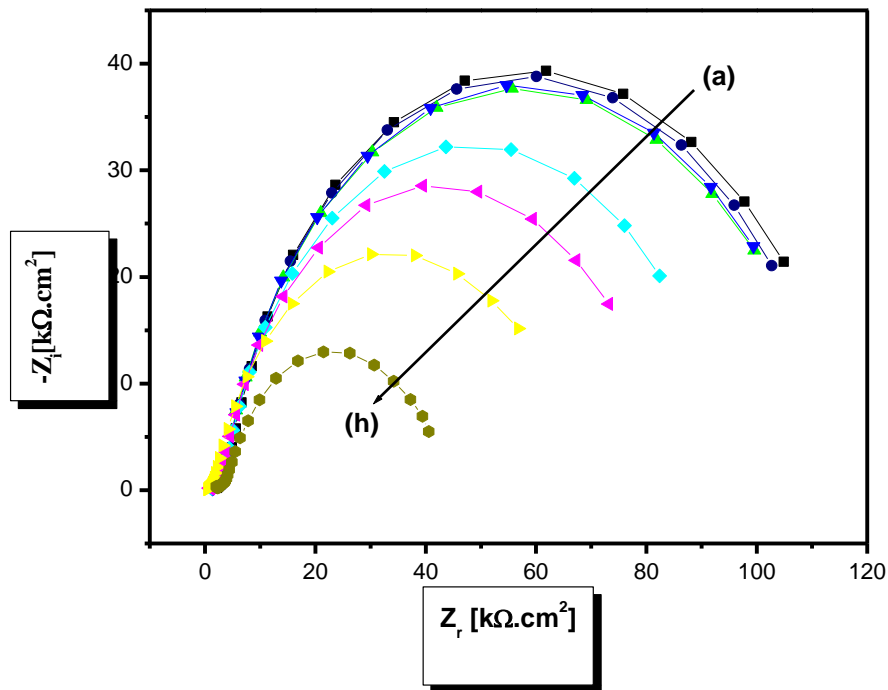


Figure II-7 : Tracé des spectres Nyquist d'impédance obtenus à différentes concentrations de NH_4^+ sur l'électrode de bentonite-PVC : (a) 0 ; (b) 9.9×10^{-11} ; (c) 9×10^{-9} ; (d) 8.26×10^{-7} ; (e) 7.63×10^{-5} ; (f) 7.09×10^{-3} ; (g) 2.62×10^{-2} ; (h) 2.07×10^{-1} mol L^{-1} . Des mesures d'impédance ont été réalisées à $-0,2$ V par rapport à ECS dans une solution tampon phosphate de 10^{-1} mole. L^{-1} , pH = 7,2. L'électrode de référence : ECS.

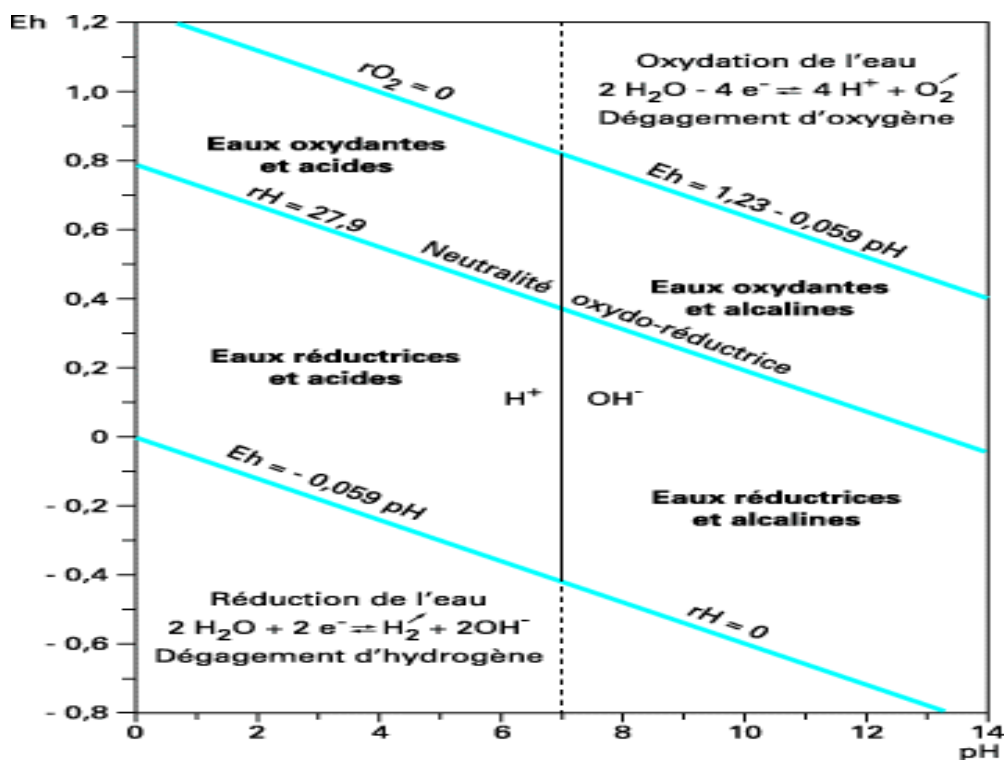
La figure II-7 montre une diminution de l'impédance en fonction de l'augmentation de la concentration des ions ammonium après chaque ajout. Ces variations peuvent être attribuées aux ions ammonium pénétrant dans la membrane PVC-bentonite, ce qui semble caractériser une augmentation de la capacité en parallèle, probablement celle de la membrane et une diminution de la résistance de transfert de charges. Ce phénomène peut être expliqué par une augmentation de la constante diélectrique de la membrane quand la concentration en NH_4^+ en contact augmente. Généralement l'interface électrode-solution peut se modéliser par trois paramètres qui sont la résistance de transfert de charge (R_{tc}), la capacité de la double couche (C_{dl}) et l'impédance de Warburg (Z_w). Les interfaces solide/liquide sont généralement le siège de deux types de processus :

*Des processus non faradiques où l'interface électrode/solution se comporte comme un condensateur plan. L'électrode métallique est soumise à un potentiel (V) donné. La

zone de l'interface électrode/solution dite « double couche » est caractérisée par une capacité de double couche (C_{dl}).

*Les phénomènes faradiques qui concernent les transferts d'électrons à travers l'interface électrode/solution suite à des phénomènes d'oxydation ou de réduction.

Les électrodes sont plongées dans une solution de tampon phosphate (0,1 M, pH=7,2) qui ne possède pas de couple redox facile à obtenir sans une polarisation importante. Le seul couple qui semble thermodynamiquement possible est l'eau, la réduction de l'eau n'a lieu qu'à une vitesse très faible, à moins de polariser à des potentiels très négatifs. Or dans ce cas, on a travaillé dans la zone de stabilité de l'eau.



Dans ce cas, le phénomène de diffusion est négligeable, le circuit obtenu donc ne contient pas l'impédance de Warburg (Z_w). Les diagrammes d'impédances ont été modélisés en utilisant le circuit équivalent présenté sur la figure II-9. Ce circuit comporte une résistance R_s (ou R_{sol}) qui regroupe les résistances de connexions électrique et celle de l'électrolyte. A cette résistance on associe le model de Randles, incluant la capacité (Elément de constante de phase) de la double couche CPE et la résistance de transfert de charge R_{tc} . Le comportement électrique de ce système électrochimique peut être représenté par un circuit électrique équivalent appliqué pour ajuster les données expérimentales de la Figure II-7

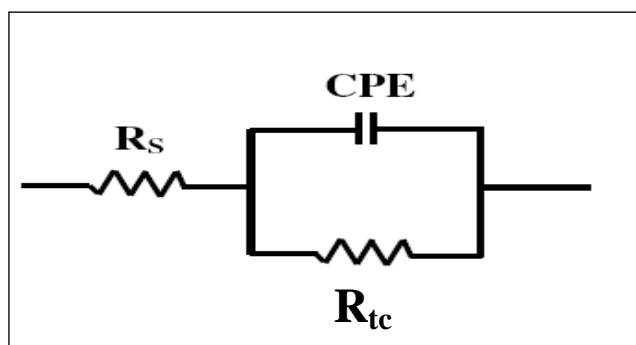


Figure II-9. Circuit électrique équivalent modélisant les diagrammes de Nyquist.

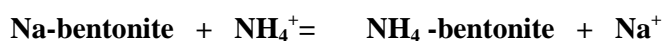
L'ajustement des données expérimentales permet d'extraire les informations nécessaires sur les paramètres électriques responsables des modifications apportées à l'interface électrode/électrolyte. Les paramètres de simulation du schéma électrique équivalent des spectres d'impédances de la structure bentonite-PVC en présence de différentes concentrations d'ammonium NH_4^+ sont représentés dans le tableau II-2.

Tableau II-2 : valeurs des éléments du circuit équivalent (R_s , R_{tc} , C_{dl} et n) obtenues pour le montage des données expérimentales qui correspondent aux variations de l'impédance de l'électrode modifiée par la bentonite/PVC lors de la détection de différentes concentrations de NH_4^+ .

$C(\text{NH}_4^+)$ (mol/L)	$R_s(\Omega)$	$R_{tc}(\text{k}\Omega)$	$C_{dl}(\mu\text{F cm}^{-2})$	n
0	2635 ± 3	$128,96 \pm 24,45$	$3,22 \pm 0,10$	0,73
$9,90 \cdot 10^{-11}$	2544 ± 4	$126,54 \pm 23,83$	$3,43 \pm 0,11$	0,72
$9,01 \cdot 10^{-9}$	2189 ± 4	$120,67 \pm 24,45$	$3,65 \pm 0,12$	0,71
$8,26 \cdot 10^{-7}$	1736 ± 5	$118,43 \pm 24,45$	$4,30 \pm 0,14$	0,69
$7,63 \cdot 10^{-5}$	1675 ± 6	$117,76 \pm 24,45$	$4,60 \pm 0,14$	0,67
$7,09 \cdot 10^{-3}$	1547 ± 7	$115,23 \pm 24,45$	$6,48 \pm 0,16$	0,64
$2,62 \cdot 10^{-2}$	1228 ± 8	$112,88 \pm 25,44$	$7,55 \pm 0,17$	0,63
$2,07 \cdot 10^{-1}$	605 ± 7	$87,94 \pm 21,53$	$9,53 \pm 0,14$	0,63

Les résultats obtenus montrent que la résistance de transfert de charge de la membrane (PVC-bentonite) R_{tc} a diminué en passant de 128.96 k Ω à 87.94 k Ω pour une augmentation de la concentration de l'ion ammonium NH_4^+ de $9,9 \times 10^{-11}$ à $2,07 \cdot 10^{-1}$ mol/L. Par contre, la capacité de la double couche a augmenté de 3.22 $\mu F \cdot cm^{-2}$ à 9.53 $\mu F \cdot cm^{-2}$ avec une diminution du paramètre lié à l'homogénéité de l'interface de 0.73 à 0.63 preuve de la présence des ions ammonium.

En effet, les minéraux argileux sont susceptibles de capter d'importantes quantités de cations présents dans une phase aqueuse mise à leur contact. Ce phénomène de rétention est appelé phénomène d'échange cationique. Au cours de la réaction d'échange, les cations initialement présents dans l'espace interfoliaires (cations compensateurs) sont remplacés par des cations en solution, et sont relâchés dans la phase aqueuse ^[30]. L'ammonium peut interagir par conséquent avec les argiles par échange d'ions. Un échange naturel avec les cations monovalents présents dans l'espace interfoliaire est très facilement possible. Pivato et Raga, ont de plus démontré que l'adsorption des ions ammonium est élevée et conseille l'utilisation de ce matériau dans le fond des sites de stockage pour limiter la pollution par l'ammonium ^[31]. Les ions d'origine de la bentonite sont substitués par les ions ammonium émis lors de l'injection de la solution de chlorure d'ammonium. Ce phénomène est schématisé comme suit:



- * D'autre part, on constate que la variation la plus importante de l'impédance se produit pour les basses fréquences. On a fixé les conditions de fonctionnement du capteur en se plaçant à une fréquence fixe du signal d'excitation (où la variation de l'impédance est importante) et en polarisant le capteur à $E = -200$ mV/ECS. Dans ces conditions on a pu déterminer une loi de variation de l'impédance du capteur ΔR_{tc} en fonction de logarithme de la concentration de l'ion à détecter afin de calibrer le capteur. Cette méthode a permis de constater la limite de détection du capteur vis-à-vis de la concentration des ions NH_4^+ qui est de l'ordre de 10^{-6} M.

ΔR_{tc} est la valeur absolue de la différence entre la résistance de transfert de charge sans ajout de NH_4Cl et la résistance mesurée à chaque injection de ce dernier.

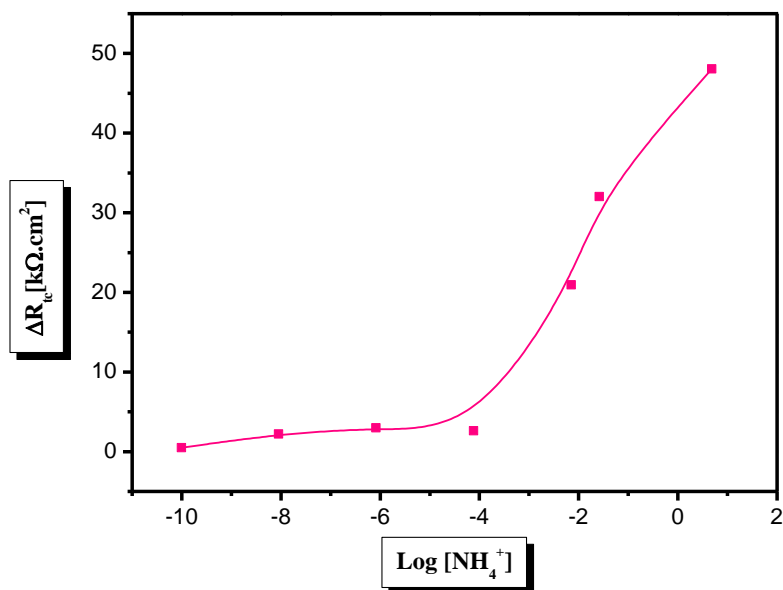


Figure II-10 : Variation de la résistance de transfert de charge R_{tc} en fonction de Logarithme de la concentration en ammonium.

La figure II-10 présente deux domaines visibles. Le premier où une légère variation de ΔR_{tc} a été obtenue dans l'intervalle des concentrations comprises entre $9,9 \cdot 10^{-11}$ M et $7,63 \cdot 10^{-5}$ M. Par contre, le deuxième où la variation est bien remarquable dans l'intervalle des concentrations compris entre $7,63 \cdot 10^{-5}$ M jusqu'à $2,07 \cdot 10^{-1}$ M. Ces variations peuvent être attribuées à une pénétration des ions ammonium dans la membrane PVC-bentonite, par échange d'ion.

II.3.3 Evaluation de la réponse du capteur sans la matrice support

Au cours de cette étape, on a testé la réponse du capteur en utilisant la bentonite sans la matrice PVC-DNP vis-à-vis des ions ammonium suite aux différents ajouts d'une solution de chlorure d'ammonium NH_4Cl . Une électrode nue a été utilisée comme témoin. La figure II-11 présente une comparaison de la variation de la résistance de transfert de charge ΔR_{tc} en fonction de logarithme de la concentration d'ammonium pour l'électrode nue et l'électrode fonctionnalisée par la bentonite.

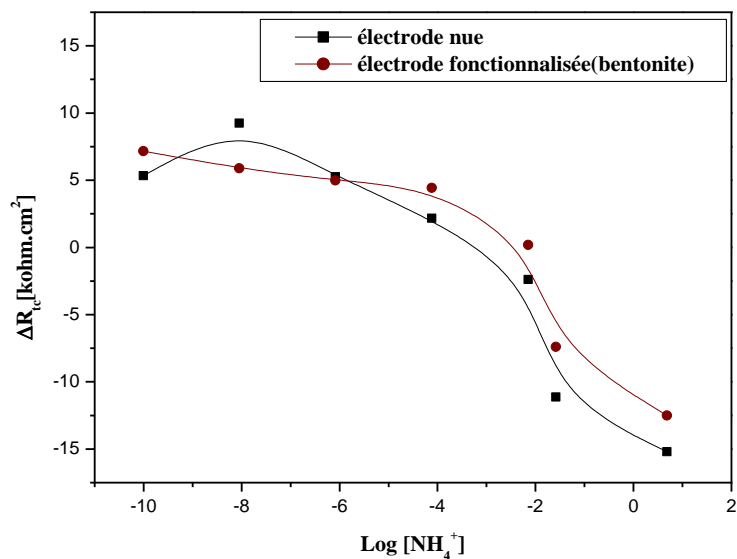


Figure II-11 : Comparaison entre la courbe de calibration de l'électrode nue et l'électrode fonctionnalisée par la bentonite.

D'après cette figure, l'évolution de la variation de la résistance de transfert de charge en fonction du logarithme de la concentration est presque identique pour les deux électrodes (électrode nue et électrode fonctionnalisée par la bentonite). Ce résultat confirme que la couche réceptrice de l'électrode fonctionnalisée n'est pas stable sur le transducteur. Ceci peut être expliqué par le fait que la bentonite se détache de la surface du transducteur. Par conséquent, l'utilisation d'un agent plastifiant et d'une matrice support de l'ionophore est indispensable.

II.3.4 Comparaison entre les quatre systèmes

Afin d'étudier la réponse des dispositifs réalisés, les courbes de calibration correspondantes à la variation de la résistance de transfert de charge (ΔR_{tc}) en fonction des différentes concentrations d'ammonium ont été superposées (figure II.12). Comparant les courbes de calibration de l'électrode nue, l'électrode modifiée par la bentonite, l'électrode modifiée par le PVC, et l'électrode modifiée par la bentonite et le PVC, on constate que : La courbe de calibration de l'électrode modifiée par le PVC est légèrement inclinée, ce qui indique que le PVC contient des sites (pores) qui contribuent à une très faible détection des ions ammonium. La saturation des sites en question est atteinte à très faible quantité en analyte.

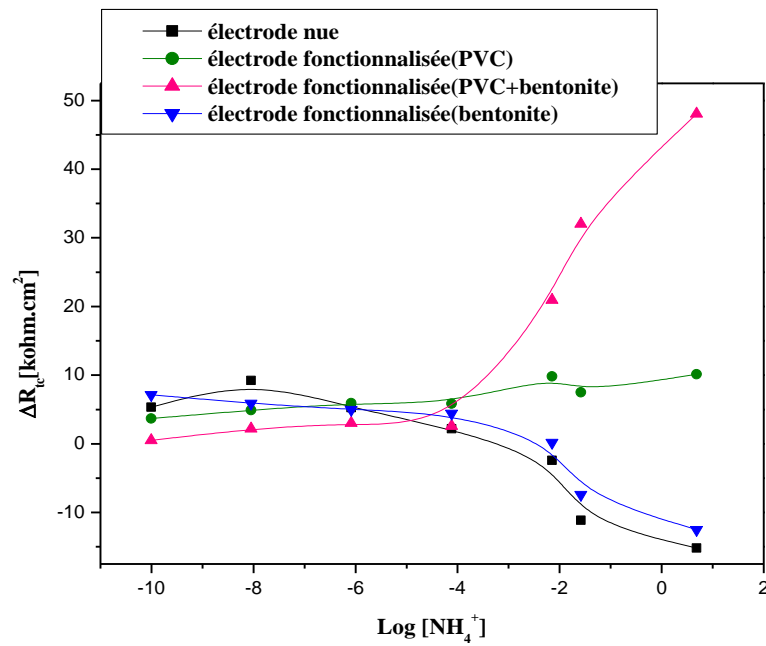


Figure II.12. Courbes de calibration présentant la variation de la résistance de transfert de charge en fonction du logarithme de différentes concentrations d'ammonium pour différentes électrodes.

II.3.5 Etude de la durée de vie du capteur PVC-bentonite

La stabilité du capteur PVC-bentonite dans des conditions de stockage (tampon phosphate de pH 7,2 à température ambiante), a été étudiée dans la même solution avec une concentration de 10^{-6} M d'ions ammonium. Le résultat correspondant montre que la réponse en impédance est toujours conservée après 10 jours puis une déclinaison continue de la réponse jusqu'au 19^{ème} jour de fonctionnement. Après une chute à 25% a été observée au trentième jour. Ce résultat implique que l'électrode est considérablement stable pendant 19 jours (Figure II.13).

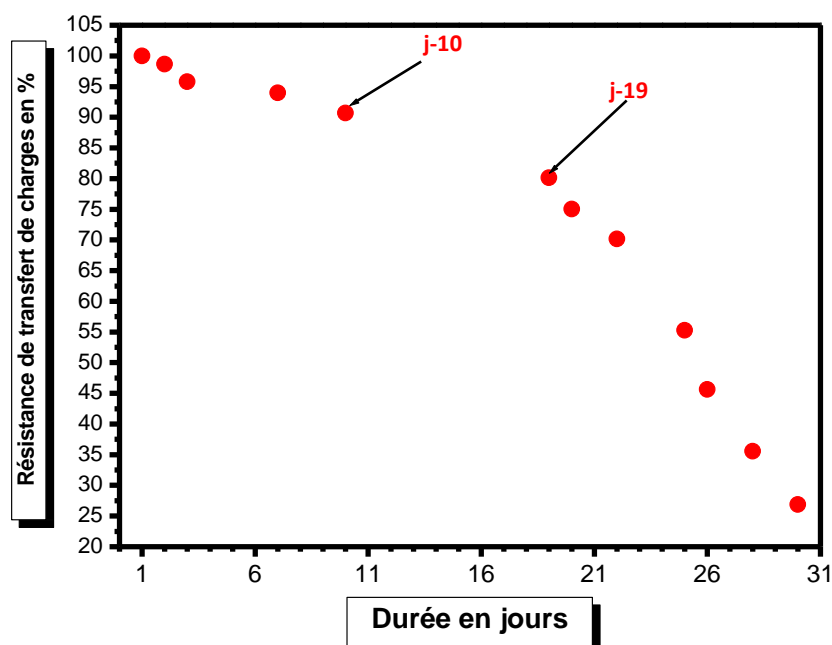


Figure II.13: Stabilité à long terme (30 jours) du capteur et variation en pourcentage de la résistance de transfert de charges en fonction du temps (en jours) pour une concentration en ammonium de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ sur une électrode modifiée par la bentonite-PVC.

II.4 Caractérisation de l'échange d'ammonium à l'interface bentonite/électrolyte

II.4.1 Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (IRTF)

Préparation des échantillons

Des pastilles de KBr ont été préparées en mélangeant 2,5 mg de bentonite avec 1 g de KBr. 300 mg de ce mélange ont été comprimés. Les spectres infrarouges ont été recueillis en utilisant un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier FTIR de type : IRAFFINITY-1 (SHIMADZU) piloté par le logiciel I.RESOLUTION. Le champ de nombre d'ondes étudié s'étend de 400 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} .

A partir du spectre IR de l'argile bentonite représentée sur la figure II-14, une bande de transmittance observée près de 3607 cm^{-1} est affectée à la vibration d'étirement des molécules d'eau faiblement hydrogénées H-O-H liées au Si-O de la surface, tandis que les fréquences de déformation se trouvent près de 922 cm^{-1} . Une large bande observée à 3432 cm^{-1} est attribuée à l'étirement H-O-H fréquence de vibration de l'eau hydratée, tandis que la fréquence de vibration de déformation est située à 1640 cm^{-1} . La large bande trouvée à 1032 cm^{-1} est due à la fréquence d'étirement de la silice. Les pics observés à 523, 468.15 et

671 cm^{-1} sont dus à la déformation des Si–O–Al, Si–O–Mg et Si–O–Si respectivement [33-34].

Les spectres FTIR des adsorbants à base d'argile bentonite modifiés par les ions ammonium sont montrés sur la figure II-15. On note l'apparition de deux bandes à 3370 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} et 789 cm^{-1} qui correspondent respectivement à la vibration d'étirement de NH, la déformation et le basculement de NH_4^+ (Figure II-15). On constate aussi que l'intensité de la bande de déformation dans le plan de l'eau H-O-H située à 1640 cm^{-1} est indicative de la quantité d'eau présente dans l'échantillon et est plus faible avec l'échantillon d'argile ammoniée par comparaison avec l'argile non échangée [32]. Ces résultats montrent que la modification de la bentonite par l'ammonium NH_4^+ ne semble pas modifier la structure. Confirmant la réalité de l'insertion des ions ammonium dans la bentonite.

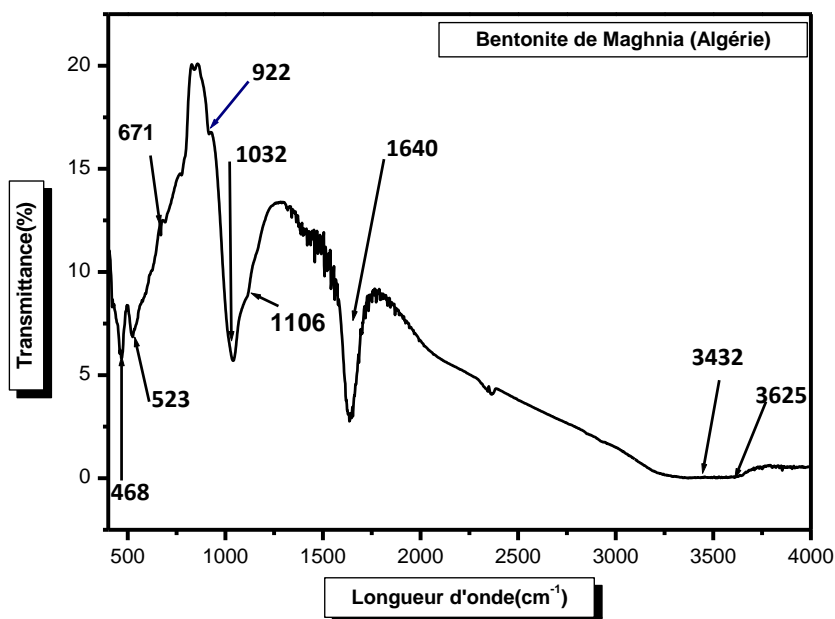


Figure II-14 : Spectres IRTF de la bentonite de Maghnia (Algérie).

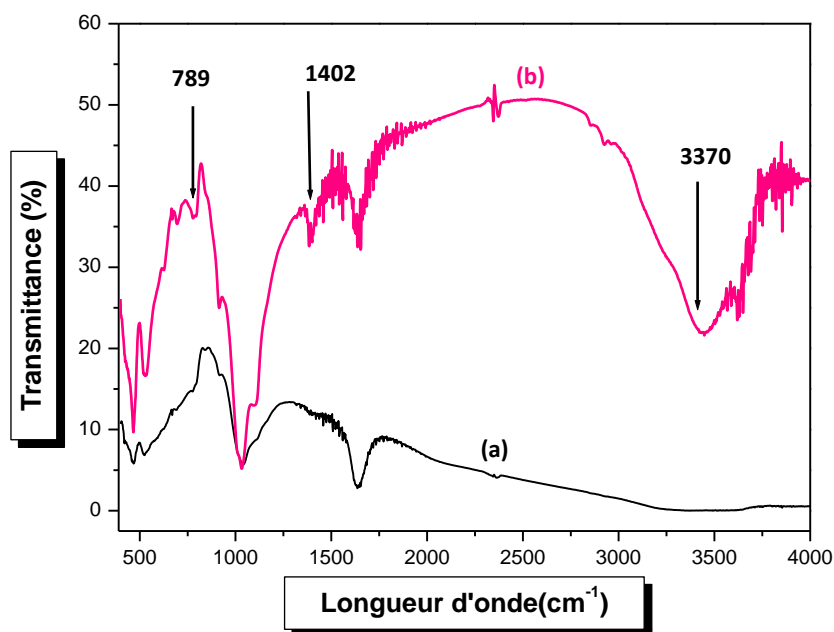


Figure II-15 : Spectres IRTF de la bentonite. (a) avant et (b) après ajout de NH_4^+ .

I.4.2 Caractérisation par la diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X permet de déterminer les distances interlamellaires caractéristiques de la structure des argiles et les positions des cations intercalés entre les feuillets. Les diagrammes de diffraction des rayons X (XRD) ont été enregistrés par le diffractomètre automatisé. Ensuite, la distance inter-réticulaire hkl de chaque échantillon a été calculée en utilisant la loi de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

Avec :

* d : la distance entre deux plans cristallographiques ;

* θ : angle d'incidence des Rayons X ;

* n : ordre de réflexion (nombre entier) ;

* λ : longueur d'onde des rayons X.

La figure II-16 représente les diffractogrammes obtenus pour la bentonite et la bentonite- NH_4^+ .

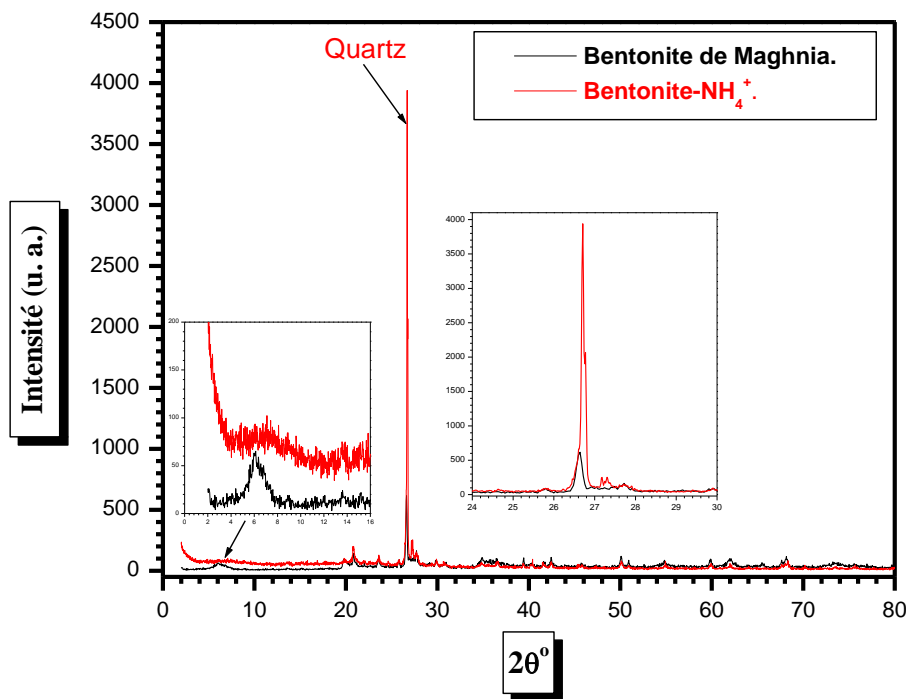


Figure II-16 : Spectres DRX de la bentonite après ajout de NH_4^+ .

Ces diffractogrammes montrent la présence de plusieurs phases cristallines caractéristiques à la montmorillonite (M) ^[35] à $6,24^\circ$, $19,74^\circ$ et à $61,99^\circ$ et les pics situés à $26,57^\circ$, $54,78^\circ$ et $59,96^\circ$ révèlent la présence de quartz (Q). On remarque qu'il y a une disparition du pic de diffraction situé à $6,24^\circ$ avec l'augmentation de l'intensité du pic de diffraction du quartz situé à $26,67^\circ$ sur le spectre de diffraction X de la bentonite-ammonium. Ce qui prouve que l'ion d'ammonium est entré entre les couches de la bentonite. La couche de bentonite tétraédrique-octaédrique-tétraédrique (TOT) a une largeur de $9,6 \text{ \AA}$ ^[35]. Cependant, selon des études antérieures, la largeur est d'environ $9,0 \text{ \AA}$ ^[35]. On peut conclure que lorsque l'ion ammonium était lié entre les couches de bentonite en créant un espace et comme son rayon ionique ($1,46 \text{ \AA}$) pour N seulement et l'hydrogène ($1,54 \text{ \AA}$) est supérieur à celui du sodium ($1,02 \text{ \AA}$), le pic à $6,24^\circ$ a disparu c'est-à-dire il a eu une déformation de la structure. De plus, l'ion NH_4^+ est polyatomique contrairement à Na^+ . Les notions de rayon ionique et d'encombrement ionique sont à considérer avec précaution compte tenu de la géométrie de l'ion NH_4^+ avec une symétrie tétraédrique à 109° .

Les travaux de Diaz Pinthier ont mis en évidence le fait que l'ion NH_4^+ peut établir des liaisons hydrogène avec les oxygènes de surface et que cette configuration particulière permet de multiplier les interactions avec le feuillet. Cette description des interactions entre le cation NH_4^+ et le feuillet va également dans le sens d'une limitation de l'ouverture de l'espace interfoliaire et donc de l'hydratation interfoliaire ^[32].

II.4.3 Caractérisation par la microscopie électronique à balayage complétée par l'EDX.

► Sur les électrodes fonctionnalisées

La figure II-17 montre des images MEB des électrodes fonctionnalisées par la membrane PVC-bentonite avant et après ajout des ions ammonium. Ces images ne révèlent pas qu'il y a une modification visible entre les deux électrodes.

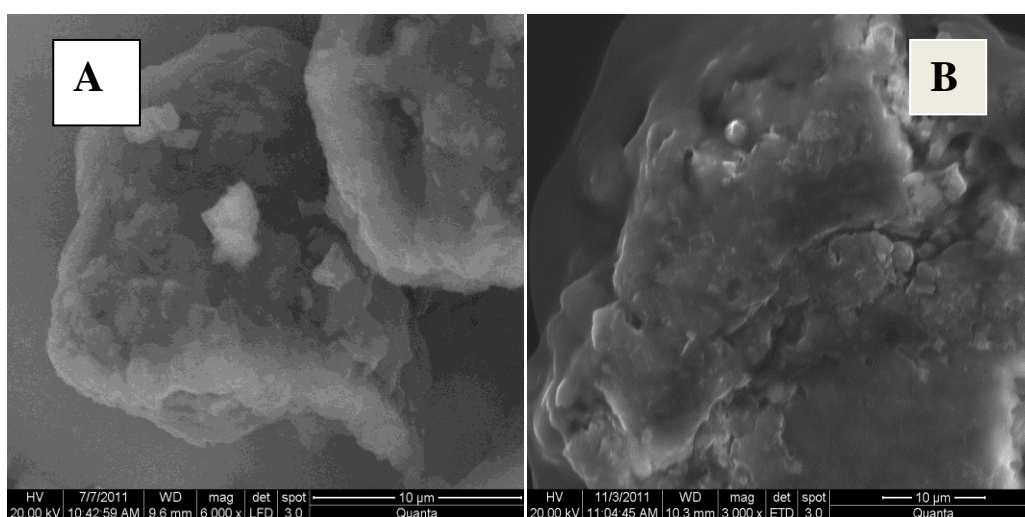
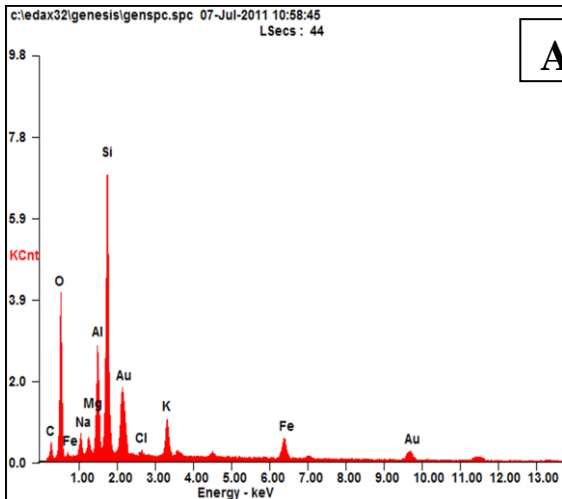


Figure II-17 : Images MEB des surfaces des électrodes fonctionnalisées (PVC-bentonite) (A) avant (B) après l'ajout de l'ion ammonium.

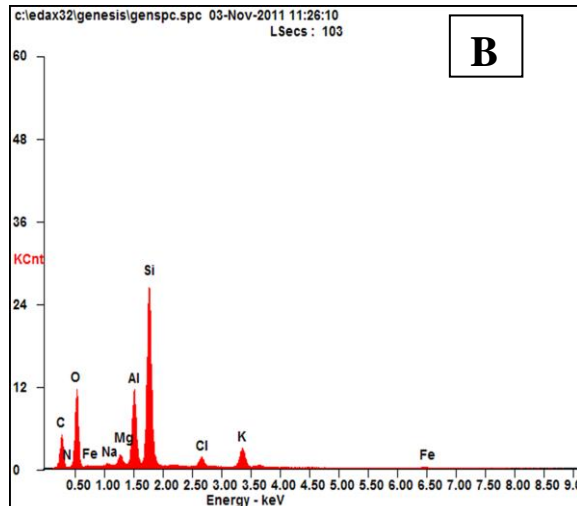
Pour compléter ces résultats, une microanalyse a été réalisée sur l'ensemble de ces électrodes (figure II-18). La figure II-18-B révèle la présence de l'azote sur le spectre correspond à l'électrode PVC-bentonite après l'ajout des ions ammonium. Ce résultat indique leur insertion dans la bentonite et confirme les résultats obtenus par spectroscopie infra-rouge et diffraction X.



KV:20.00 TILT: 0.00 TAKE-OFF:34.63 AMPT:25.6 DETECTOR TYPE :SUTW-SAPPHIRE RESOLUTION :135.25

<i>Element</i>	<i>Wt %</i>	<i>At %</i>
<i>CK</i>	11.34	23.49
<i>OK</i>	28.98	45.07
<i>NaK</i>	01.86	02.01
<i>MgK</i>	00.95	00.97
<i>AlK</i>	06.48	05.98
<i>SiK</i>	16.64	14.74
<i>ClK</i>	00.32	00.22
<i>KK</i>	03.56	02.26
<i>FeK</i>	04.65	02.07
<i>AuL</i>	25.24	03.19

EDAX ZAF QUANTIFICATION STANDARDLESS SEC TABLE :
DFFAIIIT



KV:20.00 TILT: 0.00 TAKE-OFF:35.28 AMPT:25.6 DETECTOR TYPE :SUTW-SAPPHIRE RESOLUTION :135.25

<i>Element</i>	<i>Wt %</i>	<i>At %</i>
<i>CK</i>	36.29	49.23
<i>NK</i>	01.72	02.00
<i>OK</i>	30.35	30.91
<i>NaK</i>	00.25	00.18
<i>MgK</i>	01.05	00.71
<i>AlK</i>	07.24	04.37
<i>SiK</i>	18.37	10.66
<i>ClK</i>	01.15	00.53
<i>KK</i>	02.95	01.23
<i>FeK</i>	00.64	00.19

EDAX ZAF QUANTIFICATION STANDARDLESS SEC TABLE :
DFFAIIIT

Figure II-18 : Spectres EDX des électrodes fonctionnalisées (PVC-bentonite) (A) avant et (B) après l'ajout des ions ammonium

► Sur les poudres de la bentonite et la bentonite modifiée

La figure II-19 montre des clichés obtenus par microscopie électronique à balayage (MEB) pour la poudre de bentonite avant et après exposition aux ions ammonium à deux différentes échelles. Les images obtenues ne permettent pas d'observer de différences significatives de morphologie entre les deux poudres. (Figure II-19A et II-19B).

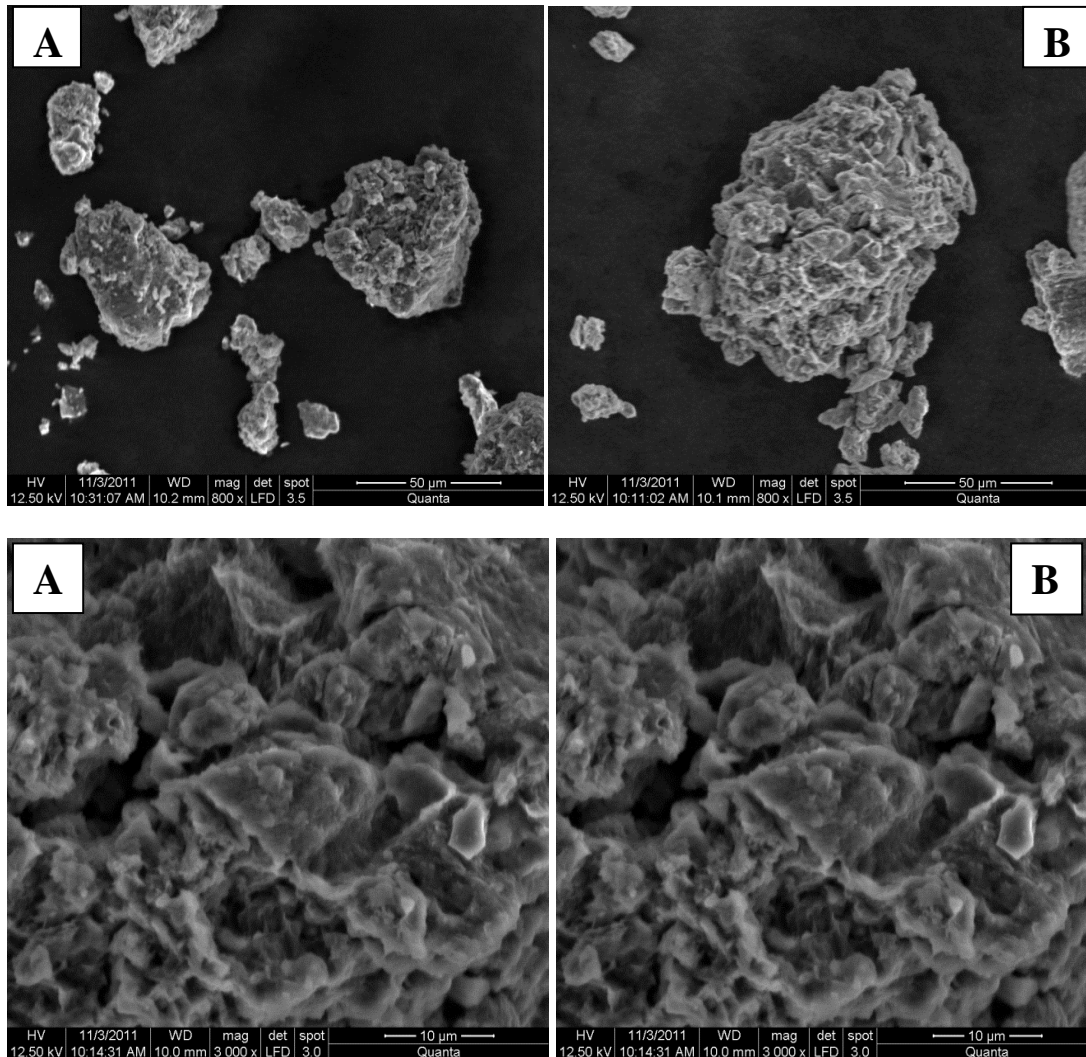


Figure II-19: Images MEB de particules de la bentonite, (A) avant et (B) après échange avec les ions ammonium.

L'analyse semi-quantitative par EDX de l'échantillon de bentonite avant et après échange avec les ions ammonium (figure II-21), montre l'apparition d'un nouvel élément dans la poudre de la bentonite modifiée avec les éléments suivants : C, O, Fe, Na, Al, Si, Mg, K et Ca, qui est l'azote. Ce résultat confirme l'insertion de l'ammonium dans l'argile.

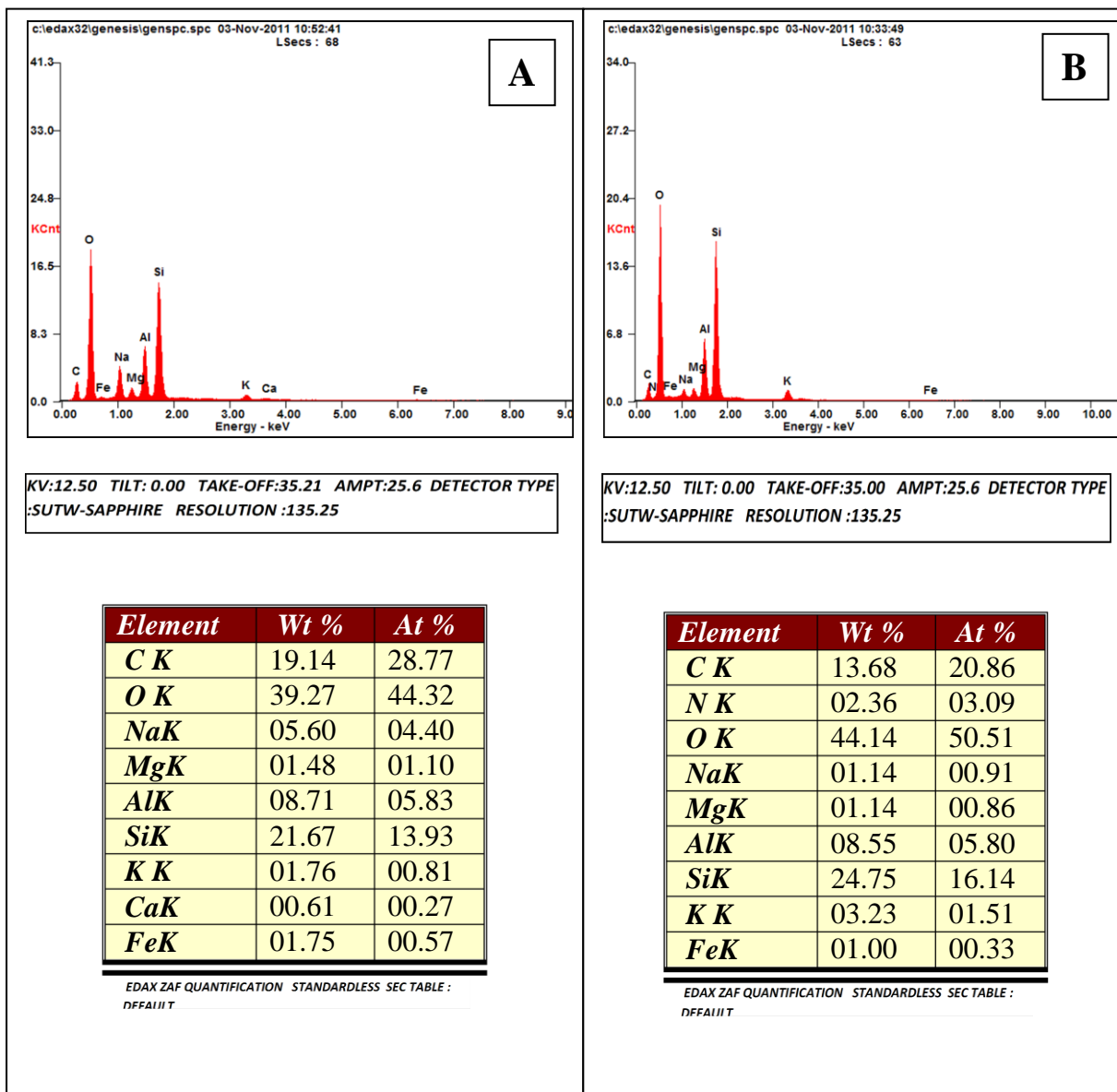


Figure II-20 : Spectre EDX de particules de la bentonite, (A) avant et (B) après échange avec l'ammonium.

II.5 Conclusion de la partie B

Dans ce travail, on a développé un capteur chimique à base d'une matrice polymère (PVC) contenant une argile (bentonite), utilisée comme ionophore, pour la détection de l'ion ammonium dans les milieux aqueux. La sensibilité du capteur développé vis-à-vis des ions ammonium a été étudiée par des mesures d'impédance. Ces mesures ont révélé une diminution de la réponse du dispositif proportionnellement à l'augmentation de la concentration en NH_4^+ . Les diagrammes d'impédance générés par ces mesures et qui révèlent l'excellent échange cationique entre le ligand utilisé et l'ammonium, ont montré

que le capteur présente une bonne sensibilité à l'égard de l'ion ammonium avec une limite de détection de l'ordre de 10^{-6} M. Pour élucider d'éventuels changements dans la texture, la morphologie et la composition ou des déplacements chimiques dans la couche réceptrice après son exposition aux ions ammonium, différentes méthodes physico-chimiques de caractérisation ont été appliquées. Les résultats ont montré que :

L'analyse des diffractogrammes montre que le spectre de la bentonite NH_4^+ ne révèle pas s'il y a une modification notable dans la structure du matériau. Ce qui permet de déduire que l'ion ammonium n'a pas affecté la structure cristallographique principale de la bentonite. Ce résultat est confirmé par la spectroscopie IRTF qui montre que l'exposition de la bentonite aux ions ammonium a provoqué seulement l'apparition de quelques nouvelles bandes caractéristique de la liaison ammonium-bentonite. La comparaison entre les images de la microscopie électronique à balayage réalisée sur la surface du capteur chimique, avant et après son exposition aux ions ammonium, ne révèle pas qu'il y a une modification notable dans la morphologie. En effet la microanalyse réalisée sur l'ensemble de l'électrode indique l'insertion des ions ammonium dans l'argile. Ce résultat confirme bien les résultats de l'infrarouge. Les résultats obtenus dans ce travail sont encourageants surtout du point de vu utilisation de la bentonite dans la conception d'un capteur chimique pour la détection de l'ammonium. Ils ouvrent la voie à plusieurs perspectives notamment pour l'application de ce type de mesure électrochimique pour le suivi de différents polluants dans un milieu réel.

Références bibliographiques de la partie B

- [1] Camargo, J.A., Alonso, Á., Environ. Int , 32, (2006)831–849.
- [2] Chen, P.J., Chua, M.L., Zhang, B., Waste.Manag; 22 (2002) ,711–719.
- [3] La Cour Jansen, J., Spliid, H., Hansen, T.L., Svärd, Å., Christensen,T.H., Waste Manag. 24, (2004)541–549.
- [4] Zhu, M., Zhu, G., Li, W., Zhang, Y., Zhao, L., Gu, Z., Environ. Pollut. 173, (2013)216–223.
- [5]http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/9789241548151_ch12.pdf (consulté le 30-04-2018).
- [6] Y.C. Luo, Jing-Shan Do, Sens. Actuators, B 115 (2006) 102–108.
- [7] N. Jaffrezic-Renault, A. Senillou, C.Martelet, K.Wan, J.M. Chovelon, Sens. Actuators, B.59 (1999) 154–164.
- [8] H.S. Twu, T.R. Ling, T.C. Chou, M.C. Yang, Ultrason. Sonochem. 8 (2001) 41–47.

- [9] M. Ikeda, H. Hachiya, S. Ito, Y. Asano, T. Imato, *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 531–537
- [10] L. Yook Heng, S. Alva, M. Ahmad, *Sens. Actuators, B* 98 (2004) 160–165.
- [11] W. Wróblewski, M. Chudy, A. Dybko, Z. Brzózka, *Anal. Chim. Acta* 401 (1999) 105–110.
- [12] S. Zougar, K.Morakchi, A. Zazoua, S. Saad, R. Kherrat, N. Jaffrezic-Renault, *Mater. Sci.Eng. C* 28 (2008) 1020–1023.
- [13] N. Jovanovic, J. Janackovic, *Appl. Clay Sci.* 6 (1991) 59–67.
- [14] D.C. Rodriguez-Sarmiente, J.A. Pinzon-Bello, *Appl. Clay Sci.* 18 (2001) 173–181.
- [15] A.S. Özcan, B. Erdem, A. Özcan, *J. Colloid Interface Sci.* 280 (2004) 44–54.
- [16] R.S. Juang, S.-H. Lin, K.-H. Tsao, *J. Colloid Interface Sci.* 254 (2002) 234–241.
- [17] E. Eren, B. Afsin, *Dyes Pigments* 76 (2008) 220–225.
- [18] S.J. Zhu, H.B. Hou, Y.J. Xue, *Appl. Clay Sci.* 40 (2008) 171–178.
- [19] M. Seredych, A.V. Tamashausky, T.J. Bandosz, *Carbon* 46 (2008) 1241–1252.
- [20] E. Bulut, M. Ozacar, I.A. Sengil, *J. Hazard. Mater.* 154 (2008) 613–622.
- [21] M. Ghiaci, R.J. Kalbasi, A. Abbaspour, *Colloids Surf., A* 297 (2007) 105–113.
- [22] M. Salman, B. El-Eswed, F. Khalili, *Appl. Clay Sci.* 38 (2007) 51–56.
- [23] X. Sun, C. Li, Z. Wu, X. Xu, L. Ren, H. Zhao, *Chin. J. Chem. Eng.* 15 (2007) 632–638.
- [24] F.P. Bonina, M.L. Giannossi, L.Medici, C. Puglia, V. Summa, F. Tateo, *Appl. Clay Sci.* 36(2007) 77–85.
- [25] H. Koyuncu, *Appl. Clay Sci.* 38 (2008) 279–287.
- [26] Q. Kang, W. Zhou, Q. Li, B. Gao, J. Fan, D. Shen, *Appl. Clay Sci.* 45 (2009) 280–287.
- [27] Rapport de la filiale SPA CRAPC Expertise.
- [28] S.Zougar, K.Morakchi, A. Zazoua, S.Saad, R.Kherrat, N.Jaffrezic-Renault, *Materials Scienc and Engineering C28*, (2008) 1020-1023.
- [29] A. Zazoua, C. Dernane, I. Kazane, M. Belghobsi, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault, *Sens.Lett.* 9 (2011) 2283–2286.
- [30] A. Pivato, A. Raga, *Waste Manage.* 26 (2006) 123–132.
- [31] A. Pivato, A. Raga, *Waste Management*, 26(2006)123-132,
- [32] M. GAUTIER, Thèse doctorat, Université d’Orléans, 2008.
- [33] Erdal Eren, *J. Hazard. Mater.* 159 (2008) 235–244.

- [34] H. Khalaf, O. Bouras, V. Perrichon, *Microporous Mater.* 8 (1997) 141–150.
- [35] Öztürk, N., Tabak, A., Akgöl, S., Denizli, A. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 322, 148–154. **2008.**

Chapitre II.
**Partie C : Utilisation de la bentonite
pour l'élaboration d'un biocapteur à
glucose.**

II.1. Introduction

Les enzymes ont été utilisées dans un grand nombre d'applications, en particulier dans les biomatériaux, les biotechnologies ^[1] comme le développement de biocapteur à glucose ^[2] ou de biopiles glucose / O₂ pour l'implantable ^[3]. Les biocapteurs ampérométriques à glucose ont connu un essor important car la détection du glucose est importante dans plusieurs domaines tels que le diagnostic médical, l'analyse des aliments et la surveillance de l'environnement ^[4-8]. Un moyen permettant la détection du glucose est l'utilisation des capteurs enzymatiques en immobilisant la glucose oxydase (GOx) dans des matériaux de nature différente ^[9-11]. La détection peut être réalisée avec l'enzyme GOx grâce à l'oxydation anodique de H₂O₂ produite par la réaction catalysée par la GOx entre le glucose et l'oxygène dissous ^[4,12-17].

Dans un tel cas, la quantification peut s'effectuer par mesure ampérométrique en détectant le peroxyde d'hydrogène sur des électrodes modifiées ^[18-21]. Depuis le travail pionnier de Guilbault et Lubrano, il est bien connu que le peroxyde d'hydrogène peut s'oxyder sur l'électrode de platine au potentiel de 0.6 ou 0.7V vs Ag / AgCl ^[22]. L'immobilisation stable d'une enzyme sur une surface d'électrode modifiée, avec une conservation de son activité catalytique et de son accessibilité, est un problème crucial pour le développement des biocapteurs. De nombreuses études suggèrent que les minéraux argileux d'origine naturelle peuvent être utilisés comme une classe de supports solides biocompatibles pour immobiliser les enzymes ^[23].

L'intérêt accordé à ces matériaux se justifie par leur abondance naturelle, leur capacité d'échange, leur porosité, la non toxicité et leur biocompatibilité. L'immobilisation de l'enzyme dans les minéraux argileux peut être réalisée par l'adsorption non covalente et par liaison covalente. L'immobilisation non covalente de l'enzyme implique des forces de van der Waals, des interactions électrostatiques, des liaisons d'hydrogène et des interactions hydrophobes. L'immobilisation peut être également réalisée par liaison covalente directe entre les enzymes et les minéraux argileux ^[24]. Afin d'améliorer les propriétés d'adsorption et catalytiques spécifiques des bentonites naturelles, la modification peut être nécessaire. Plusieurs voies peuvent être utilisées pour modifier les minéraux argileux tels que l'adsorption, l'échange d'ions avec des cations organiques et inorganiques, liaison d'anions organiques et inorganiques (principalement sur les bords), réaction avec des acides ^[25] et greffage de composés organiques ou biomolécules, tels que les acides aminés, les peptides, etc ^[26]. Compte tenu des mécanismes de ces interactions, le composé

organique ou inorganique, peut se trouver à la surface et / ou pénétrer dans l'espace intercouche des minéraux argileux en tant que ligand ^[25,27-28] pour ainsi obtenir des organo-argiles.

II.2 Propriétés des adsorbants d'affinité micro-composite Bentonite et bentonite-Cystéine

Les caractéristiques de composition et de structure des minéraux argileux permettent une variété de modification par des molécules organiques, polymères ou biologiques ^[28-29]. La synthèse des organo-argiles est basée sur les mécanismes des réactions que les minéraux argileux peuvent avoir avec les composés organiques. Les réactions de déplacement se produisent lorsque les molécules d'eau dans l'espace intercouche des argiles, sont déplacées par des molécules polaires. Les composés organiques neutres peuvent former des complexes avec les cations intercouches ^[30]. Les cations inter-couches peuvent être échangés par différents types de cations organiques. La formation de liaisons covalentes entre les groupes réactifs de la surface des argiles et les espèces organiques, est liée à la présence des molécules hydrophobes. Aux bordures d'un feuillet, les valences du silicium et de l'oxygène en couche tétraédrique d'une part, de l'aluminium et de l'oxygène en couche octaédrique, d'autre part, ne sont pas saturées. Pour compenser ces valences, des molécules d'eau s'hydrolysent et il y a apparition de groupes silanols (Si-OH) ou aluminol (Al-OH) qui en fonction du pH peuvent capter ou libérer des protons. Le nombre et la nature des charges de bordure de feuillet seront donc directement liés au pH. Seules les minéraux argileux de type 2: 1, comme la bentonite, qui fournissent les groupes silanol et aluminol réagissent avec l'agent organique par des réactions de greffage ^[31]. Il est prévu que les groupes électrophiles générés sur le support réagissent avec des nucléophiles puissants sur l'enzyme. Des recherches ont montré que, les minéraux argileux modifiés avec des molécules fonctionnelles organiques comme supports, peuvent contenir une quantité accrue d'enzymes car la présence de molécules organiques fonctionnelles dans les minéraux argileux améliore les interactions entre les enzymes et les minéraux argileux modifiés ^[32-33]. Le chercheur Gieseking en 1939, a suggéré la possibilité d'utiliser des ions ammonium de types NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ et NR_4^+ pour modifier les argiles. Les organo-argiles obtenus, donnent lieu à des distances interfoliaires supérieures à celles des mêmes minéraux argileux saturés de cations plus petits tels que le calcium ou l'hydrogène ^[34]. Les recherches sont toujours en cours ^[35-37] car la modification organique des minéraux

argileux et l'addition de molécules de liaison contribuent à améliorer le chargement, l'activité et la stabilité des enzymes ^[38].

Cette étude a été effectuée au département de chimie moléculaire à l'université de Grenoble-alpes au sein de l'équipe biosystèmes électrochimiques et analytiques (BEA). Dans ce travail, pour l'élaboration du biocapteur à glucose, on a donc examiné l'intérêt d'utilisation de deux bentonites, la naturelle et la bentonite fonctionnalisée avec la cystéine comme matrices potentielles d'immobilisation d'enzymes. On a choisi pour ce travail, la glucose oxydase et déterminé les caractéristiques analytiques des électrodes modifiées résultantes (bentonite-GOx ou bentonite-cystéine-GOx). Dans la littérature, la bentonite modifiée par la cystéine s'est démontrée efficace pour l'immobilisation de la catalase de point isoélectrique 5,4. L'étude a porté sur le développement de sorbants à affinité microcomposite bentonite-cystéine (Bent-Cys) pour l'adsorption de la catalase. Le ligand d'affinité pseudo-biospécifique l-cystéine a été lié de manière covalente aux structures de la bentonite.

II.3. La glucose oxydase

Les enzymes rédox sont des molécules avec un ou plusieurs centres rédox localisés en profondeur et recouvert d'une enveloppe de glycoprotéines qui rend le site actif inaccessible électriquement. Cette conformation de l'enzyme pourrait empêcher les réactions non spécifiques entre les diverses macromolécules rédox dans les systèmes biologiques ^[39]. Une autre fonction de l'enveloppe glycoprotéique serait de stabiliser la structure de l'enzyme. La glucose oxydase fait parti de la famille des enzymes oxydoréductases. C'est une enzyme homodimérique (chaque subunité de cette protéine contient une molécule de coenzyme flavine adénine dinucléotide) ^[40] qui catalyse l'oxydation du D-glucose (C₆H₁₂O₆) en D-gluconolactone (C₆H₁₀O₆) en présence d'oxygène moléculaire dissous dans le milieu réactionnel :



Le glucose oxydase d'*Aspergillus Niger* est une protéine volumineuse avec un diamètre environ 80 Å et possède un poids moléculaire élevé, environ 160 kDa. L'enveloppe protéinique de cette biomolécule est constituée d'acides aminés lui confèrent

des propriétés de zwitterion (Possédant des charges électriques formelles d'une unité, de signes opposés et situées en général sur des atomes non adjacents). Le pH correspondant au point isoélectrique de la GOx est de 4.35, elle est anionique au pH de l'eau distillée (pH 6-7). Chaque monomère de la GOx a deux domaines différents : l'un est lié fortement à un motif de FAD et l'autre est utilisé pour les liaisons avec le substrat de D-glucose. Le cofacteur FAD [C₂₇H₃₃N₉O₁₅P₂] est le site actif de la GOx. Il est localisé dans une cavité de la protéine profonde de 15Å^[41] et ne peut pas être séparé de l'enzyme dans des conditions non dénaturantes. La partie électroactive du FAD est le cycle isoalloxazine qui, par oxydation du glucose, capte 2 électrons et 2 protons pour former FADH₂, forme réduite du cofacteur. Un relais pour le transfert d'électrons est donc nécessaire entre la GOx et l'électrode afin de permettre la détection ampérométrique. Dans ce contexte, l'accepteur d'électrons le plus couramment utilisé est l'oxygène moléculaire, médiateur physiologique de la GOx^[40]. L'enzyme est une glycoprotéine contenant environ 16% de sucre neutre et 2% de sucres aminés. L'enzyme contient également 3 résidus de cystéine et 8 sites potentiels pour la glycosylation liée à l'azote^[42].

II.4 La cystéine

La cystéine dont le nom est acide 2-amino- 3-mercapto-propanoïque, est un acide aminé avec deux groupements fonctionnels : un groupe carboxyle (COOH) et un groupe amine (NH₂). C'est un acide aminé soufré car le groupement CH₂-SH correspond à une chaîne latérale, déterminant la nature de l'acide aminé puisque le reste est invariant. On a donc une molécule possédant deux groupements : Le groupe -NH₂ et le groupe -COOH, ionisables en -NH₃⁺ et -COO⁻ respectivement. Notons que la forme totalement non-ionisée n'existe pratiquement pas car aux pH acides pour lesquels la fonction COOH n'est pas ionisée, la fonction NH₂ l'est toujours, et inversement aux pH basiques pour lesquels la fonction NH₂ n'est pas ionisée, la fonction COOH l'est toujours. Le groupement thiol (-SH) est ionisable mais non ionisé au pH physiologique et les groupements thiols sont susceptibles de s'oxyder pour former une liaison covalente Cys-S-S-Cys appelée pont disulfure.

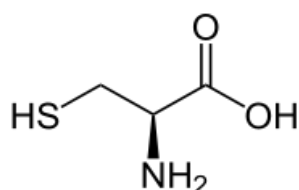


Figure II.1 Structure développée de la cystéine

II.5 Principe du biocapteur ampérométrique

Afin de tester de nouveaux matériaux d'électrode, deux biocapteurs ampérométriques basés sur l'immobilisation de l'enzyme glucose oxydase, choisie comme enzyme modèle ont été élaborés pour la détection du glucose. La présence du glucose, substrat de l'enzyme, dans la solution à analyser va permettre à l'enzyme de former un complexe enzyme-substrat. L'oxydation du glucose catalysée par la GOx génère la formation de peroxyde d'hydrogène qui peut être oxydé électrochimiquement à la surface d'une électrode de platine. L'oxydation électrochimique de H_2O_2 est un processus global nécessitant le transfert de 2 électrons. La détection optimale de H_2O_2 est obtenue à un potentiel de 0,7 V/ECS. L'intensité du courant induit par la réaction électrochimique est directement liée à la concentration du glucose dans la solution. Le système Bentonite-GOx est évalué en tant que matériau d'immobilisation de la GOx. Pour améliorer l'efficacité de l'utilisation de la bentonite comme support d'immobilisation d'enzyme, cette dernière a été modifiée par la cystéine. Il a été démontré dans une étude précédente que la bentonite - cystéine permettait d'immobiliser la catalase^[43].

Alors une attention particulière s'est accordée pour mettre en évidence l'intérêt de la présence de la cystéine attachée aux particules de la bentonite, sur la performance du biocapteur bentonite-cystéine-GOx. Les caractéristiques avantageuses de la cystéine, sont à discuter par comparaison avec les résultats obtenus sur des électrodes associées faites uniquement de bentonite.

II.5.1 Synthèse et caractérisation de la bentonite-modifiée (Bentonite-cystéine)

Les préoccupations de cette enquête sont divisées en deux parties: d'abord, la préparation puis la caractérisation de la bentonite modifiée par la cystéine.

II.5.1.1 Synthèse de la bentonite-cystéine

Les échantillons d'argile utilisés dans l'étude ont été recueillis des gisements de la région de Hammam Bougarra à Maghnia en Algérie. Elle a été modifiée par le ligand de base biologique, la cystéine en utilisant la technique de sorption simple. 5,0 g de la bentonite naturelle, a été mise en suspension dans une solution de cystéine (100 mM) dont le pH avait été préalablement ajusté à 4,0 avec du HNO_3 . La suspension obtenue a été agitée à température ambiante pendant 12 heures. La phase solide (Bentonite-cystéine) a été séparée par centrifugation, lavée avec de l'eau distillée, puis séchée et conservée à température ambiante pour la suite des études^[44]. La bentonite modifiée a été désignée sous le nom de Bent-Cys.

II.5.1.2 Propriétés des adsorbants d'affinité microcomposite Bent-Cys

La Bent-Cys a été synthétisée pour l'immobilisation de l'enzyme glucose-oxydase. A pH égale à 4, la cystéine est ionisée donnant un groupement basique NH_3^+ . La cystéine est couplée à la bentonite par l'intermédiaire de son groupe amine. Selon la littérature, l'adsorption d'un matériau organique sur une surface chargée négativement comme les argiles cationiques, est un processus complexe. Elle repose sur la liaison hydrophobe avec un échange de cations ^[45-46]. La molécule de la cystéine est parallèle à la couche tétraédrique-octaédrique-tétraédrique (couche de silicate TOT) et elle forme une monocouche dans l'espace de la couche interne de la structure ^[43].

II.5.2 Caractérisation de la Bent-Cys par spectroscopie infrarouge à transformée de fourrier (IRTF)

La modification de l'argile après traitement avec la solution de cystéine a été vérifiée par les spectres IR. La caractérisation a été effectuée à température ambiante sur un spectrophotomètre infrarouge (SHIMADZU) à transformée de Fourier, FTIR, de type : IRAFFINITY-1 piloté par le logiciel IRsolution. Les échantillons sont pastillés dans du KBr. Les résultats et le type de vibration de la bentonite sont représentés dans le tableau II.C.1. Les spectres FTIR de la bentonite et la Bent-Cys sont illustrés sur les figures II.C.2, II.C.3 et II.C.4.

Tableau II.1 Les vibrations IR de la bentonite

Vibrations en cm^{-1}	Type de vibration
≈ 3631	Elongation O–H du (Si,Al)–OH
≈ 3445	Elongation O–H d'eau.
≈ 1628	Déformation H–O–H
≈ 1100	Elongation Si–O
≈ 1030	Elongation Si–O–Si
≈ 913	Déformation OH dépend de 2Al^{+3}
≈ 797	Elongation Si–O du quartz et de la silice
≈ 618	Si–O
≈ 519	Déformation Al–O–Si
≈ 467	Déformation Si–O–Si

La figure II.C.2 et le tableau II.C.1 représentent les modes de vibration caractéristiques dus à la matrice argileuse. Le spectre infrarouge de la bentonite-cystéine est comparé à celui de la bentonite sur les figures II.C.3 et II.C.4. Il montre une série de bandes qui peuvent être assignées à la cystéine adsorbée. Les bandes des fragments $-\text{NH}_3$ et $-\text{COO}^-$ sont décalées, indiquant un état différent de liaison des molécules de cystéine dans la montmorillonite par rapport au cristal massif. Dans le spectre FTIR, par rapport à la liaison covalente entre la bentonite et la cystéine, les pics à 3489 cm^{-1} sont probablement des étirements N-H provoqués par NH_2 . La large bande O-H (environ 3445 cm^{-1}) appartenant au carboxyle dans la structure est invisible car elle s'adapte aux étirements O-H de la cystéine. Les pics à 1484 cm^{-1} sont des flexions N-H et la bande à 1406 cm^{-1} est une bande d'élongation C=N. La bande C=O carbonyle a été observée à 1620 cm^{-1} et la bande C–S à 674 cm^{-1} . Après ces résultats, il semble que la bentonite interagisse avec les groupes NH_2 de la cystéine. De plus, la bande à 1581 cm^{-1} représente NH_2 protoné, c'est-à-dire NH_3^+ en flexion.

Par conséquent, on peut conclure que la structure de la bentonite a interagi avec le groupe NH_2 de la cystéine. Ceci est également prouvé par les bandes d'élongation et de

déformation N-H et les bandes d'élongation C=N dans le spectre FTIR. Puisque le cation Al^{3+} au centre de la couche octaédrique de la bentonite a la caractéristique d'un acide de Lewis, il est coordonné par le groupe amine de la cystéine, ce qui est un résultat attendu. De plus, la bentonite est de nature acide; les sites acides peuvent servir de centres de liaison à travers le groupe $-NH_2$ des protéines ^[47]. Les bandes à 2583 cm^{-1} (étirement de S-H) ont diminué en intensité ^[50,47]. Tous ces résultats peuvent être causés par l'interaction entre le cation Al^{3+} au centre de la couche octaédrique de la bentonite et le groupe NH_2 de la cystéine.

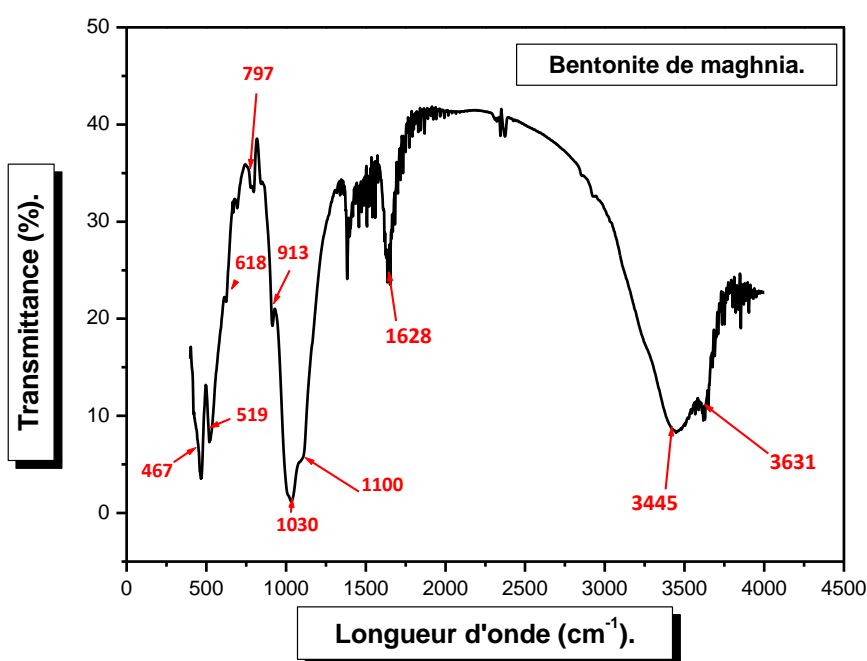


Figure II.2 : Spectre IR de la Bentonite de Magnhia.

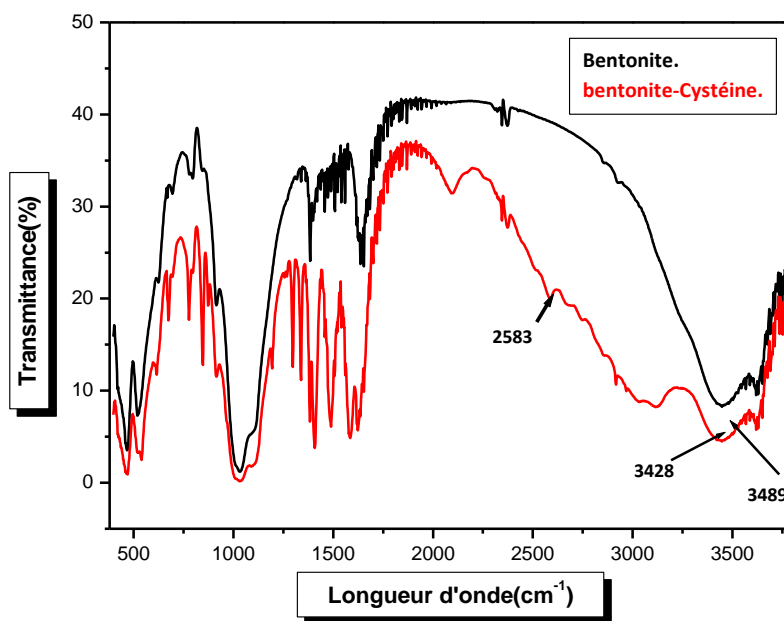


Figure II.3 Spectre IR: bentonite et bentonite-Cystéine

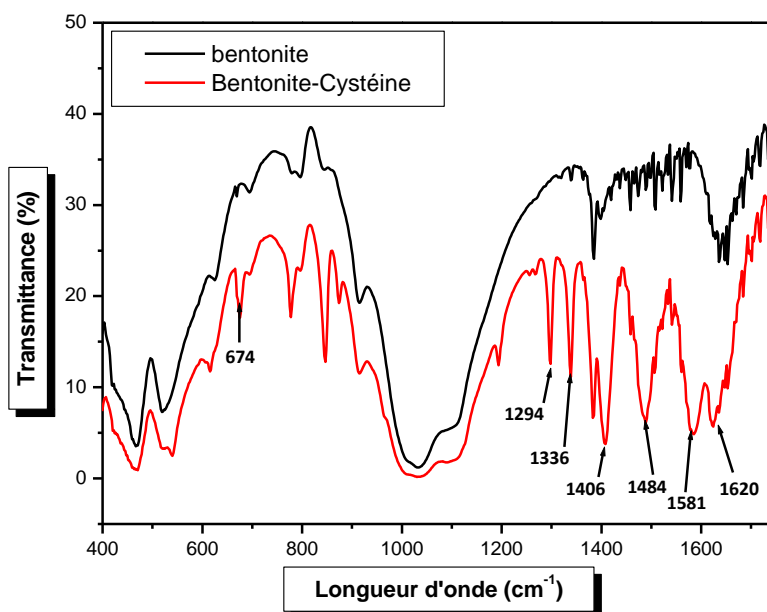


Figure II.4 Spectre IR(400-1800 cm^{-1}) : Bentonite et bentonite-cystéine

II.5.3 Immobilisation de la glucose oxydase

L'élaboration des biocapteurs ampérométriques par cette méthode a fait intervenir plusieurs étapes dont la préparation d'une suspension colloïdale contenant la bentonite et l'enzyme avec 2 dépôts successifs de 20 μl du mélange sur la surface de l'électrode. Les dépôts ont été ensuite séchés sous vide, conduisant à l'adsorption sur l'électrode la bentonite-GOx. Ce mélange est composé de :

- ✓ 45 μL de bentonite ou Bent-Cys [La suspension colloïdale de la bentonite (1 mg. mL^{-1}) a été préparée en dispersant de la bentonite dans de l'eau déminéralisée sous agitation pendant une nuit].
- ✓ 60 μL de glucose oxydase GOx (17.440 U. mg^{-1}), La glucose oxydase a été dissoute dans du PBS avec une concentration de 5 mg/ ml à pH =7.

Cette procédure a été modifiée car les dépôts ne restent pas accrochés à la surface de l'électrode durant la manipulation. Afin de remédier à cette difficulté, on a utilisé un monomère qui est un pyrrole amphiphile qui a déjà montré son efficacité pour le piégeage de nombreuses enzymes^[49]. 15 μL du monomère pyrrole ammonium (5mM) ont été ajoutés au mélange ce qui a permis d'avoir un dépôt de polymère adhérent et stable sur l'électrode de platine.

II.5.4 Electropolymérisation

Les deux électrodes ainsi séchées et recouvertes du mélange : bentonite-cystéine, pyrrole ammonium et la GOx (ou bentonite, pyrrole ammonium et GOx) ont été électropolymérisées par balayage successifs en potentiels entre 0.0 V et 0.7 V/ ECS. On a utilisé un système de cellule à trois électrodes avec une électrode de travail, une contre-électrode en platine et une électrode de référence au calomel saturé. Comme il a déjà été démontré pour d'autres composés dans la littérature, l'électropolymérisation anodique permet l'élaboration aisée de films de polymères électroactifs à la surface de l'électrode. La formation du polymère a d'abord été étudiée par voltampérométrie cyclique en réalisant 30 balayages successifs entre 0.0V et 0.7 V (Figure II.5).

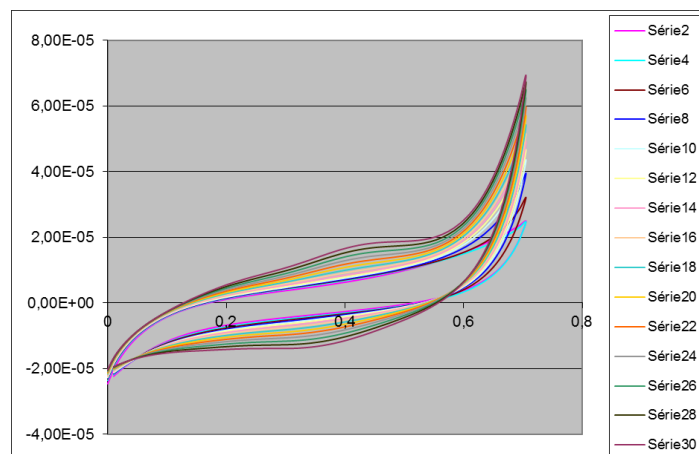


Figure II.5 : Courbe de voltampérométrie cyclique (30 cycles) du mélange (bentonite-Cystéine-pyrrole ammonium-GOx) dans $\text{LiClO}_4, 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ sur électrode de platine ($\text{Ø} = 5 \text{ mm}$) à $v = 0,1 \text{ V.s}^{-1}$. Pour plus de clarté, seuls les cycles pairs sont représentés ici.

L'apparition d'un signal centré vers $0,45 \text{ V/ECS}$ est nettement visible sur la figure II.5 et correspond bien au signal électroactif typique d'un poly (pyrrole-N-alkyl) qui se situe entre $0,4 \text{ V}$ et $0,6 \text{ V}$. L'intensité du signal augmente au fur et à mesure des cycles et cette évolution est caractéristique de la formation d'un film poly (pyrrolique) électroactif à la surface de l'électrode. Le mécanisme de polymérisation (figure II.6) est initié par la génération de 2 radicaux cationiques dont le couplage aboutit après perte de 2 protons à un dimère, lequel est à son tour oxydé. La réaction en chaîne ainsi déclenchée conduit finalement à la formation du polypyrrole.

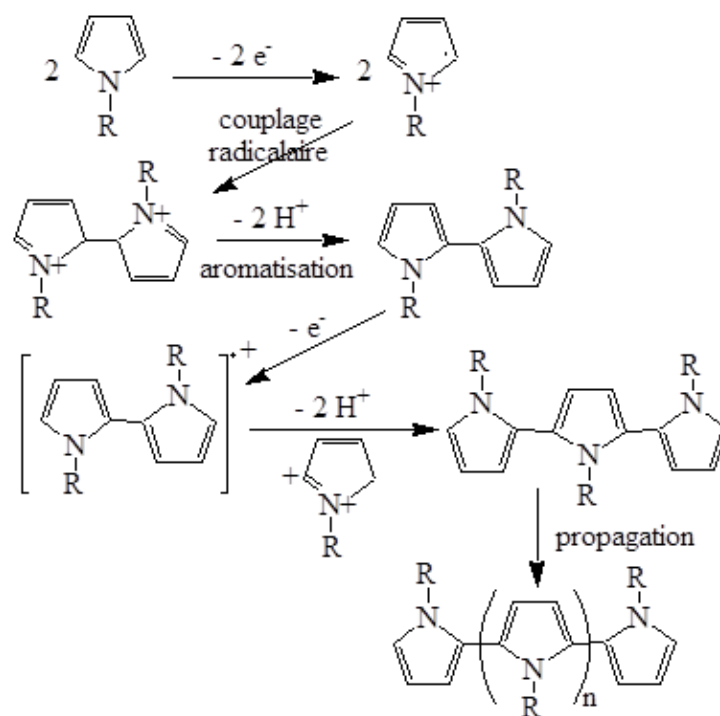


Figure II.6: Principe de polymérisation du pyrrole

Dans la suite des expériences, afin de mieux contrôler l'épaisseur du film polymère déposé l'électropolymérisation est faite à potentiel imposé ($Q=0,507 \text{ mC}$) (Figure II.5).

II.5.5 Caractérisation du film déposé de la bentonite ou bentonite-cystéine.

Afin de vérifier le dépôt du film de polymère sur l'électrode de platine, les courbes de voltampérométries cycliques d'une solution d'hydroquinone $2 \times 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ dans une solution de tampon phosphate 0.1 mol. L^{-1} obtenus avant et après le dépôt du film de la Bent-polypyrrole-ammonium (ou Bent-Cys-polypyrrole-ammonium) sur l'électrode de platine ont été réalisées (Figure II.7). Avant le dépôt, le signal d'oxydoréduction de l'hydroquinone se compose d'un couple de pics anodiques et cathodiques à $0,251$ et $-0,082 \text{ V}$ respectivement ($\Delta E_p = 0,333\text{V}$). Après le dépôt de $20 \mu\text{l}$ du mélange bentonite-pyrrole-ammonium, ces pics sont décalés respectivement à $0,345$ et $-0,151 \text{ V}$ ($\Delta E_p = 0,496 \text{ V}$) indiquant la formation d'une barrière pour la diffusion et / ou le transfert d'électrons de la sonde électrochimique. Ce qui indique le succès de l'immobilisation de la matrice sur l'électrode en platine.

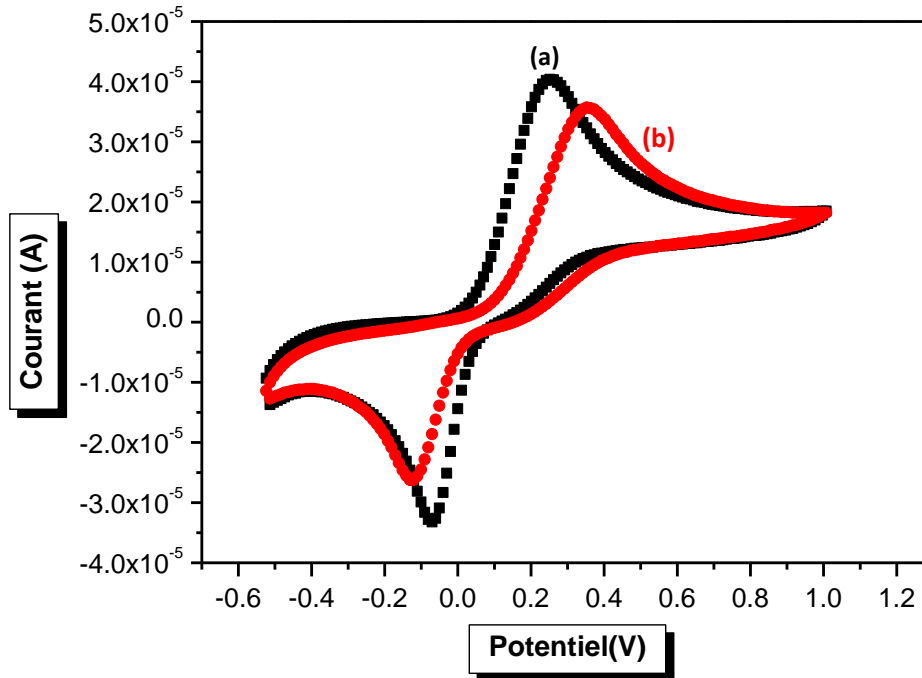


Figure II.7 : Voltampéromogrammes cycliques de l'hydroquinone (2mmol L^{-1}) dans du tampon phosphate ($0,1\text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 7$). Vitesse de balayage 100 mV s^{-1} . (a) Electrode de platine nue ; (b) Après dépôt de la bentonite-GOx-polypyrrole-ammonium. Référence: ECS.

II.5.6 Mesure de la perméabilité

L'étude de la perméabilité permet de définir une caractéristique essentielle d'un film polymère, à savoir sa capacité à échanger des espèces entre la solution et la partie entre l'électrode et ce film polymère. Ainsi pour déterminer le coefficient de perméabilité P_m des films de polymère électrogénéré, on a testé les deux électrodes modifiées auparavant polymérisés à potentiel imposé à 0.7V avec une charge de 0.507 mC . Le polymère est ensuite suroxydé en effectuant une voltampérométrie cyclique sur 10 cycles de 0.0V à 1.2V afin de détruire son électroactivité. On a utilisé l'hydroquinone comme sonde électroactive car celle-ci s'oxyde à un faible potentiel et n'est pas chargée à $\text{pH}=7$. Le courant limite I_{lim} correspond à la somme du courant dans la membrane polymère I_m et du courant dans la solution I_s . L'équation de Koutecky-Levich permet de relier l'intensité limite à la vitesse de rotation de l'électrode.

$$I_s = 0.62nFAD_s^{2/3}\nu^{-1/6}C^\circ\Omega^{1/2}I_m = \frac{nFAD_mKC^\circ}{\delta}$$

$$\text{Avec } P_m = \frac{KD_m}{\delta}$$

$$\text{D'où } \frac{1}{i_{lim}} = \frac{1}{0.62nFAD_s^{2/3} \nu^{-1/6} C^o} * \frac{1}{\Omega^{1/2}} + \frac{1}{nAFP_m C^o}$$

Pour déterminer le coefficient de perméabilité P_m , il faut mesurer le courant limite de l'oxydation de l'hydroquinone (2mM) pour différentes vitesses de rotation de l'électrode modifiée au carbone vitreux (figure II.8.A et II.9.A) effectuées avec une solution d'hydroquinone 2mM dans un tampon phosphate à 0,1M. Les différentes valeurs de courant limite obtenues permettent de tracer la courbe de Koutechy-Levich :

$$\frac{1}{i_{lim}} = f\left(\frac{1}{\Omega^{1/2}}\right)$$

L'ordonnée à l'origine, étant définie comme égale à $\frac{1}{nFP_mAC^o}$, permet de déterminer la valeur du coefficient de perméabilité P_m . La valeur de la perméabilité du capteur bent-cys-polymère déterminée à partir de l'ordonnée à l'origine (Figure II.8.B) est de $2.46 \times 10^{-2} \text{ cm.s}^{-1}$ ce qui est similaire aux valeurs de perméabilité présentes dans la littérature [50]. Par contre, la valeur obtenue pour l'électrode modifiée avec la bentonite et le polymère est de $1.71 \times 10^{-2} \text{ cm.s}^{-1}$ (figure II.9.B), ce qui montre que l'introduction de la cystéine dans la bentonite a amélioré la valeur de la perméabilité de cette argile.

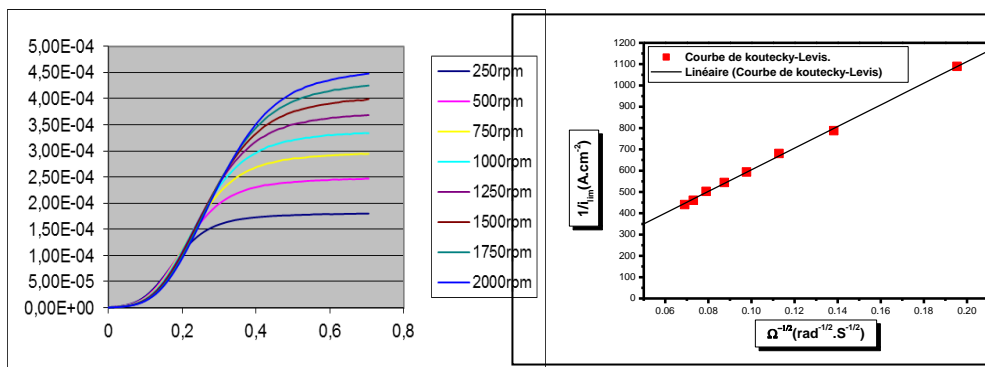


Figure II.8 : A- Voltampérogrammes de l'hydroquinone ($2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) dans une solution de tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{pH} = 7$) sur l'électrode tournante de carbone vitreux ($\text{Ø} = 5 \text{ mm}$) modifiée par un film de polymère -bent-cys avec $Q = 0,507 \text{ mC}$. Vitesses de rotation de l'électrode : $250 \leq \Omega \leq 2000 \text{ rpm}$. B- Courbe de Koutecky-Levich représentant $1/i_{lim}$ en fonction de $1/\Omega^{1/2}$.

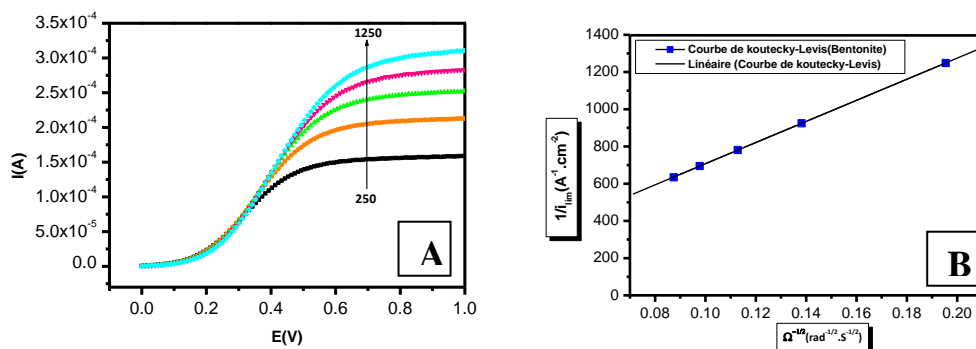


Figure II.9 : A-Voltampérommes de l'hydroquinone (2.10^{-3} mol.L $^{-1}$) dans une solution de tampon phosphate ($0,1$ mol.L $^{-1}$; pH = 7) sur électrode tournante de carbone vitreux ($\varnothing = 5$ mm) modifiée par un film de polymère-bentonite avec $Q = 0,507$ mC. Vitesses de rotation de l'électrode : $250 \leq \Omega \leq 1250$ rpm. B-Courbe de Koutecky-Levich représentant $1/i_{lim}$ en fonction de $1/\Omega^{1/2}$.

II.6 Application à la détection du glucose

II.6.1 Mesures électrochimiques

Les mesures ampérométriques ont été effectuées avec un potentiostate-DAQ - PRG-DEL en association avec un enregistreur. Le montage utilisé pour ce dosage est une cellule à trois électrodes. La réponse ampérométrique de l'électrode enzymatique au glucose a été déterminée en appliquant un potentiel constant de $0,7$ V / ECS dans 10 ml d'une solution de tampon phosphate $0,10$ M (pH $7,0$, sous agitation) thermostatée à 25 ° C. Avant de réaliser les ajouts de glucose dans la cellule de mesure, le courant résiduel doit être stable. Des volumes (20 à 100 μ L) de solution de glucose à une concentration allant de 10^{-4} M à 1 M, sont ensuite injectés dans la cellule. Les valeurs de courant ont été enregistrées à chaque ajout de glucose. On obtient une courbe présentant deux évolutions distinctes: la première où l'intensité augmente linéairement avec la concentration en glucose et une seconde partie définie par un palier associé à la vitesse maximum d'oxydation du glucose par l'enzyme.

II.6.2 Réponses et courbes d'étalonnage des biocapteurs

II.6.2.a Biocapteur Bentonite-GOx (Bent-GOx)

La figure II.10 représente la courbe d'étalonnage du biocapteur **Bent-GOx** en fonction de la concentration en glucose. On remarque l'augmentation du courant lors de l'addition successive du glucose. La courbe obtenue suit la cinétique de Michaelis-Menten, comme observé pour de nombreuses électrodes enzymatiques ampérométriques. La première partie de cette courbe est linéaire sur une gamme de concentrations en glucose

comprise entre 2×10^{-6} et $2.54 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ avec un coefficient de corrélation (R) de 0.998. La mesure de la pente de cette droite permet de déterminer la sensibilité du capteur ($1.5 \times 10^{-3} \text{ A.M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$). La seconde partie de ce graphe est un plateau qui permet de définir la densité de courant maximale J_{max} ($25 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$) ; qui est directement liée la quantité d'enzyme immobilisée, et reflète la qualité de la technique d'immobilisation utilisée. La constante apparente Michaelis-Menten K_M^{app} est un indicateur de la cinétique de réaction enzyme-substrat et est utilisée pour évaluer l'activité biologique de l'enzyme immobilisée. Déterminée grâce à la linéarisation de Lineweaver-Burk^[51], elle est égale à $K_M^{\text{app}} = 15 \text{ mM}$. Cette valeur est plus faible que pour la valeur obtenue pour l'enzyme en solution (33 mM)^[52], indiquant une grande affinité pour le glucose après immobilisation (Figure II.10).

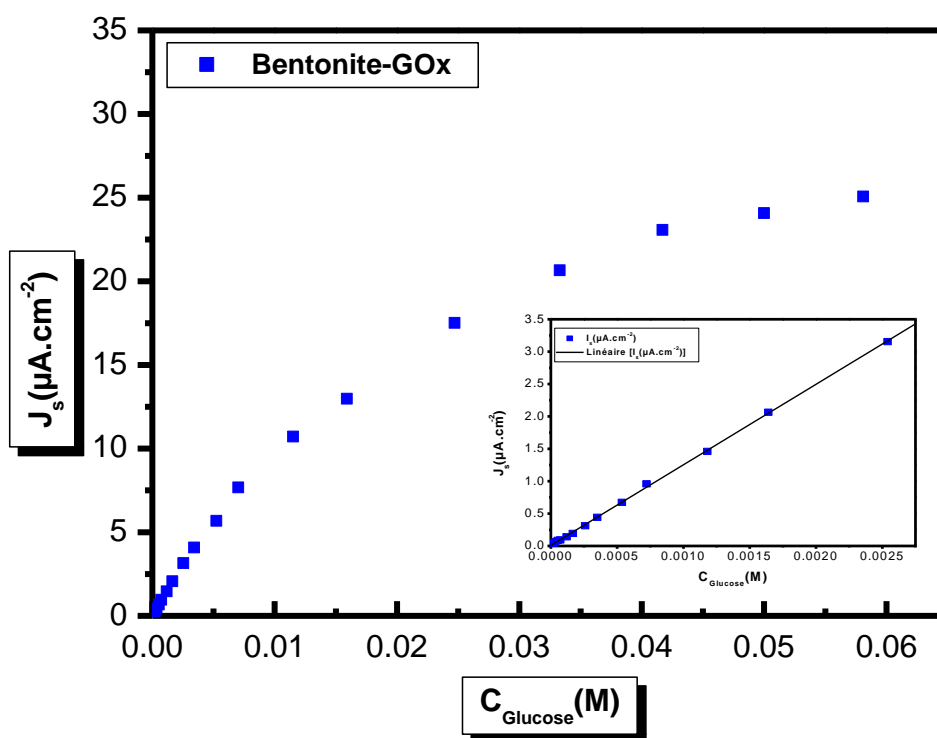


Figure II.10 : Courbes d'étalonnage du biocapteur à base de GOx, obtenues avec l'électrode de platine ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) modifiée Bent-GOx dans du tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) à $E = 0,7 \text{ V}$ vs ECS, suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.

II.6.2.b Biocapteur Bentonite-Cystéine-GOx (Bent-Cys-GOx)

La courbe d'étalonnage en utilisant la **Bent-Cys-GOx** a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que celles obtenues avec la **Bent-GOx**. La figure II.11 montre le courant de réponse de l'électrode **Bent-Cys** à l'addition successive du glucose. A partir de la figure II-11, on peut observer que la gamme linéaire est comprise entre $9,9 \times 10^{-7}$ et $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ avec un coefficient de corrélation (R) de 0,999 puis un palier est atteint progressivement à une concentration de glucose plus élevée avec un courant de saturation bien important $J_{\text{max}} 61 \mu\text{A.cm}^{-2}$. Le biocapteur présente une meilleure limite de détection estimée à $9,9 \times 10^{-7} \text{ M}$ et une sensibilité de $3 \times 10^{-3} \text{ A.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$. La constante apparente de Michaelis-Menten K_M^{app} dans la présente étude, est égale à 13 mM inférieure à la moitié de la valeur rapportée dans la littérature (33 mM) [52], ce qui indique que l'enzyme a conservé sa forte affinité pour le glucose après son immobilisation dans la matrice bentonite-cystéine (Figure II.11).

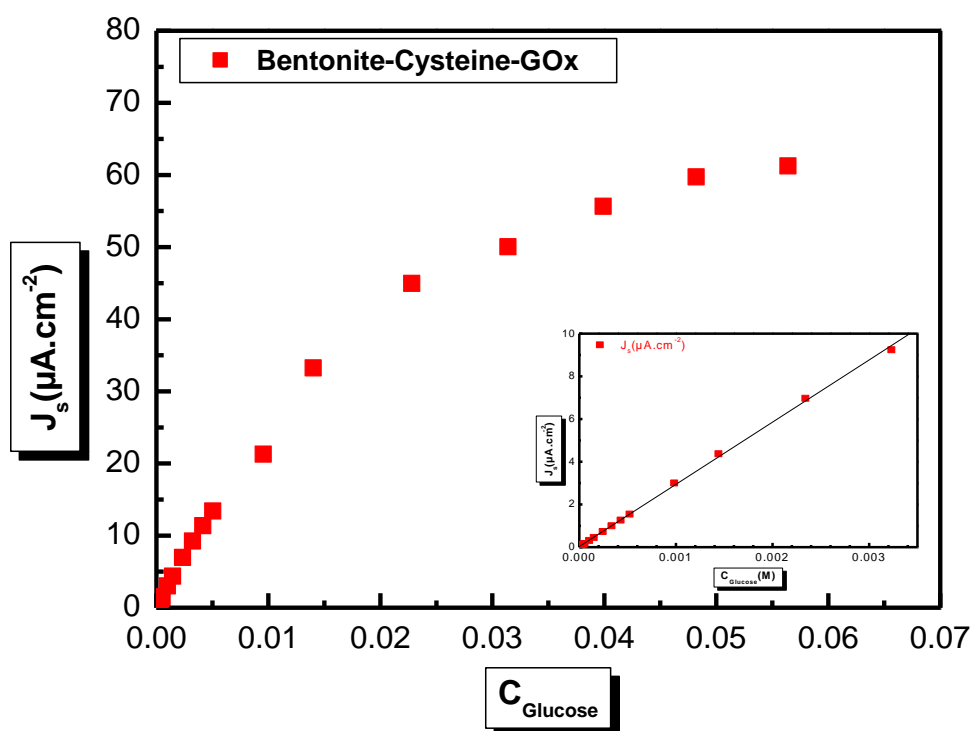


Figure II.11 : Courbes d'étalonnage du biocapteur à base de GOx, obtenues avec l'électrode de platine ($\varnothing = 5 \text{ mm}$) modifiée Bent-Cys-GOx dans du tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$) à $E = 0,7 \text{ V}$ vs ECS, suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique.

II.7 Evaluation de l'efficacité du mode d'immobilisation

Les conditions d'élaboration des deux biocapteurs sont identiques, la seule différence réside dans l'introduction de la cystéine dans la composition de la matrice du deuxième biocapteur. Bien que la quantité initiale d'enzymes pour réaliser les deux biocapteurs soit identique, les résultats regroupés dans le tableau II.2 et la figure II.12 montrent une grande différence entre les biocapteurs pour J_{\max} et S (la sensibilité). Le courant de saturation ($J_{\max} = 61 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), est 2.5 fois plus grand que celui obtenu avec le biocapteur **Bent-GOx** ($J_{\max} = 25 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). La valeur de J_{\max} dans le cas du capteur **Ben-Cys-GOx** est bien supérieure à celles rapportées pour les bioélectrodes modifiées par une monocouche d'enzymes comme pour le [poly(pyrrole-NTA/Cu²⁺/histidine/GOx ou avec les polymères biotinylés ou avec la β -cyclodextrine-GOx] ($3.4 - 23 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$) [53-54] alors que pour l'électrode **Bent-Gox**, J_{\max} est proche des valeurs de J_{\max} obtenues dans le cas d'une immobilisation d'une monocouche d'enzymes. Cette différence de valeur atteste d'une quantité plus importante de GOx immobilisée dans le cas **Bent-Cys-GOx**, si l'on considère que toutes les enzymes immobilisées ont conservé leurs propriétés catalytiques pendant le processus d'immobilisation. Ces résultats pourraient s'expliquer par une meilleure adsorption d'enzymes pour le capteur **Bent-Cys** qui peut être également associée à la liaison entre la cystéine de la bentonite et les cystéines de la glucose oxydase. A ce stade des expériences, des caractérisations complémentaires comme la diffraction rayons X et la spectroscopie infrarouge (DRX et FTIR) sont nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

Les valeurs obtenues de la sensibilité et de la limite de détection du deuxième biocapteur, **Bent-Cys-GOx** $3 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ et $9.9 \times 10^{-7} \text{ M}$ respectivement, présentent aussi des valeurs doubles par rapport au premier biocapteur **Bent-GOx** ($1.5 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ et $2 \times 10^{-6} \text{ M}$).

Ces données démontrent clairement que l'introduction de la cystéine permet une amélioration des caractéristiques du biocapteur avec aussi une amélioration de la perméabilité du matériau d'électrode, comme décrit dans le paragraphe précédent.

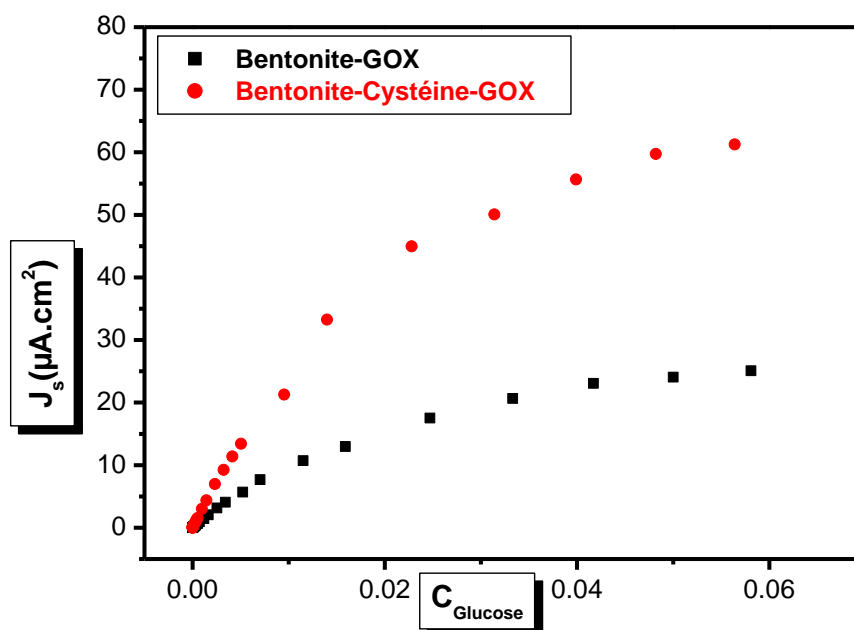


Figure II.12 Comparaison des deux courbes de calibration des biocapteurs bentonite et bentonite-Cystéine à base de GOx.

Tableau II.2 Récapitulatif des résultats obtenus.

Système basé sur la GOx	Gamme de linéarité (mol.L ⁻¹)	S(mA .M ⁻¹ .cm ⁻²)	LOD (M)	K _M (mM)	J _{max} (µA.cm ⁻²)
Bentonite	2x10 ⁻⁶ -2.54x10 ⁻³	1.5	2 x 10 ⁻⁶	15	25
Ben-Cystéine	9.9x10 ⁻⁷ -3.23x10 ⁻³	3	9.9 x 10 ⁻⁷	13	61

Les performances analytiques de ces deux biocapteurs sont comparées à celles des études antérieures (Tableau II.3). La comparaison montre une sensibilité plus élevée pour l'électrode modifiée par la bentonite-Cystéine (3µA.mM⁻¹.cm⁻²) avec aussi une limite de détection plus importante (10⁻³ mM de glucose).

Tableau II.3 : Comparaison des performances analytiques trouvées dans la littérature pour les biocapteurs à glucosebasés sur différentes matrices.

(Py:poly(pyrrole); PyCO₂H,: poly (3-(1H-pyrrol-1-yl)propanoicacid);Au: Nanoparticule d'or ;AuNP-Eggshell : Membrane de coquille revêtue de nanoparticules d'or).

Matrice d'immobilisation de la GOx	Gamme de linéarité [mM]	S[$\mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$]	LOD [mM]	Références
PyCO ₂ HcoPyFc	1.0–5.0	1.796	6.9×10^{-3}	[55]
AuNP-Eggshell	8.33×10^{-3} –0.966	–	3.5×10^{-3}	[56]
Py	0–5.0	8×10^{-2}	–	[57]
PyCO ₂ H/Au	1.0-18.0	0.42	5×10^{-2}	[58]
Py (ammonium)-bentonite	2×10^{-3} -2.54	1.5	2×10^{-3}	Ce travail
Py (ammonium)-bentonite-cystéine	$9,9 \times 10^{-4}$ –3.23	3	10^{-3}	Ce travail

II.8 Stabilité des deux biocapteurs

La durée de vie et la stabilité des biocapteurs apparaissent comme l'un des éléments clés de leur application à grande échelle. Pour le matériau d'électrode **Bent-GOx**, on a réalisé les courbes de calibration sur plusieurs jours, comme le montre la figure II.13 et le tableau II.4. On peut remarquer qu'au cours du temps la sensibilité du capteur **Bent-GOx** diminue de 1.5 à 0.14 mA.M⁻¹.cm⁻² et que la valeur de J_{max} diminue de 25 à 5.5 $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$, ce qui est dû à une dénaturation des enzymes ou un relargage des enzymes en solution.

Afin de comparer les caractéristiques des 2 biomatériaux d'électrode **Bent-GOx** et **Bent-Cys-GOx**, l'intensité a été mesurée sur plusieurs jours à 0,7 V/ECS pour une concentration en glucose égale à 6×10^{-2} mol.L⁻¹. On peut voir sur la figure II.14 que le biocapteur **Bent-Cys-GOx** conserve 95 % de ses propriétés catalytiques jusqu'au sixième jour alors que le capteur **Ben-GOx** ne conservait que 20 % de la valeur initiale après cette même période. J_{max} diminue ensuite progressivement et après 16 jours, le biocapteur conserve 25 % de son activité catalytique. Cette bonne stabilité peut être attribuée à l'enzyme fortement attachée au film bentonite-cystéine par comparaison au matériau **Bent-**

GOx, ce qui vient conforter l'hypothèse de formation d'un lien covalent entre la cystéine de l'argile et les cystéines du glucose oxydase.

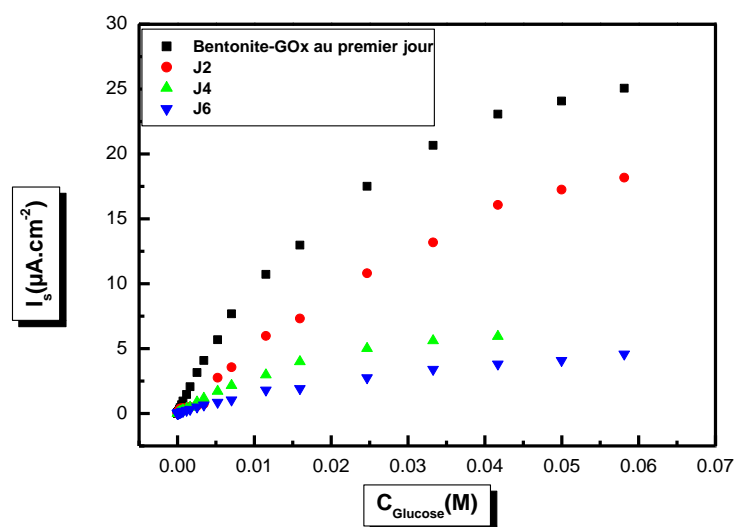


Figure II.13: Courbes d'étalonnage du biocapteur à base de GOx en fonction du temps, obtenues avec l'électrode de platine ($\varnothing = 5$ mm) modifiée Bent-GOx dans du tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{pH} = 7$, $T = 25$ °C) à $E = 0,7$ V vs ECS, suite aux injections successives de glucose dans la cellule électrochimique aux jours 1, 2, 4 et 6.

Tableau II.4 Récapitulatif des résultats obtenus : valeurs de la sensibilité et de J_{max} aux jours 1, 2, 4 et 6.

Système basé sur la GOx	S ($\text{mA} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)	J_{max} ($\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)
Bentonite-GOx-j1	1.5	25
Bentonite-GOx-j2	0.97	23
Bentonite-GOx-j4	0.33	6
Bentonite-GOx-j6	0.14	5.5

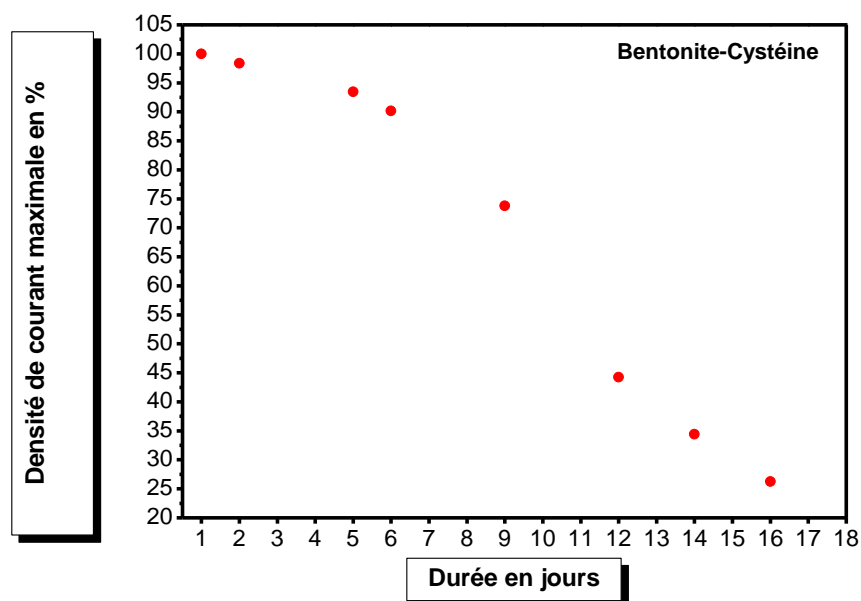


Figure II.14 : Stabilité à long terme (18 jours) du biocapteur et variation en pourcentage de la densité de courant maximale en fonction du temps(en jours) sur une électrode de platine modifiée par la bentonite-cystéine-GOx.

II.9 Conclusion de la partie C

Dans cette partie, on a élaboré deux biocapteurs enzymatiques ampérométriques à glucose basés sur une technique simple, rapide et reproductible d'immobilisation de la glucose oxydase (GOx).

Pour cela, on a utilisé deux matrices d'argile : une bentonite naturelle et une bentonite modifiée par la cystéine. Cette dernière a été synthétisée et caractérisée par spectroscopie infrarouge. L'association de la bentonite modifiée ou non par la cystéine avec un polymère électrogénéré par chronoampérométrie a permis l'immobilisation de la glucose oxydase, choisie comme enzyme modèle dans ce travail et a permis la conception de deux biocapteurs avec la bentonite-GOx et la bentonite-Cystéine-GOx. Le capteur le plus performant est celui obtenu avec la bentonite modifiée avec la Cystéine. Il possède une bonne réponse ampérométrique vis-à-vis du glucose avec une gamme de détection linéaire de $9,9 \times 10^{-7}$ à $3,3 \times 10^{-3} \text{ M}$ et une sensibilité de $3 \text{ mA.M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ avec une limite de détection de $9,9 \times 10^{-7} \text{ M}$.

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que l'argile bentonite modifiée par la cystéine est un support d'immobilisation attrayant pour l'enzyme glucose oxydase,

pourrait être utilisé comme matériau d'électrode pour la réalisation d'autres biocapteurs enzymatiques dans les futures recherches.

Références bibliographiques de la partie C

- [1] Bankar, S. B.; Bule, M. V.; Singhal, R. S.; Ananthanarayan, L. *Biotechnol. Adv.* **2009**, 27 (4), 489–501.
- [2] Wang, J. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (2), 814–825.
- [3] S. Cosnier, A.L. Goff, M. Holzinger, *Electrochem. Commun.* 38 (**2014**) 19–23.
- [4] A. Ramanavicius, J. Voronovic, T. Semashko, R. Mikhailova, A.K. Minkstimiene, A. Ramanaviciene, *Anal. Sci.* 30 (**2014**) 1143–1149.
- [5] U. Anik, M. Cubukcu, Y. Yavuz, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 41 (**2013**) 8–12.
- [6] W. Zhang, A.M. Asiri, D. Liu, D. Du, Y. Lin, *TrAC Trends Anal. Chem.* 54 (**2014**) 1–10.
- [7] N.S. Oliver, C. Toumazou, A.E. Cass, D.G. Johnston, *Diabet. Med.* 26 (**2009**) 197–210.
- [8] C.I.L. Justino, T.A. Rocha-Santos, A.C. Duarte, *TrAC Trends Anal. Chem.* 29 (**2010**) 1172–1183.
- [9] S.B. Bankar, M.V. Bule, R.S. Singhal, L. Ananthanarayan, , *Biotechnol. Adv.* 27 (**2009**) 489–501.
- [10] J. Du, X. Yu, J. Di, *Biosens. Bioelectron.* 37 (**2012**) 88–93.
- [11] X. Kang, J. Wang, H. Wu, I.A. Aksay, J. Liu, Y. Lin, *Biosens. Bioelectron.* 25 (**2009**) 901–905.
- [12] B. Adhikari, S. Majumdar, *Prog. Polym. Sci.* 29 (**2004**) 699–766.
- [13] V. Krikstolaityte, J. Kuliesius, A. Ramanaviciene, L. Mikoliunaite, A. Kausaite-Minkstimiene, Y. Oztekin, A. Ramanavicius, *Polymer* 55 (**2014**) 1613–1620.
- [14] Y. Fang, Y. Ni, G. Zhang, C. Mao, X. Huang, J. Shen, *Bioelectrochemistry* 88 (**2012**) 1–7.
- [15] A. Ramanavicius, A. Kausaite, A. Ramanaviciene, *Sens. Actuators B Chem.* 111–112 (**2005**) 532–539.
- [16] V. Flaris, G. Singh, Recent developments in biopolymers, *J. Vinyl Addit. Technol.* 15 (**2009**) 1–11.
- [17] Takashi Kuwahara, Kohei Ogawa, Daiki Sumita, Mizuki Kondo, Masato Shimomura, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 811 (**2018**) 62–67.

- [18] P. Westbroek, B. Van Haute, E. Temmerman, *Fresenius' J. Anal.Chem.* 354 (1996) 405.
- [19] M. Florescu, C.M.A. Brett, *Talanta* 65 (2005) 306.
- [20] S.A.G. Evans, J.M. Elliot, L.M. Andrews, P.N. Bartlett, P.J. Doyle, G. Denuault, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1322.
- [21] N. Matsumoto, X. Chen, G.S. Wilson, *Anal.Chem.*74 (2002) 362.
- [22] G.G. Guilbault, G.J. Lubrano, *Anal. Chim.Acta* 64 (1973) 439.
- [23] C.Bijang, Abdwahid.Wahab, Maming ,AhyarAhmad.*Int. J. Pharm Bio Sci*2014 Jan; 5(1): (P) 101 – 107.
- [24] Ning An a, Chun Hui Zhou, Xiao Yu Zhuang , Dong Shen Tong ,Wei Hua Yu. *Applied Clay Science* 114 (2015) 283–296.
- [25]Bergaya, F., Lagaly, G. *Clay Sci.* 9,1–3.2001
- [26] LucileneBetega de Paiva, Ana Rita Morales , Francisco R. Valenzuela Díaz,.*Applied Clay Science* 42 (2008) 8–24.
- [27] V. Balek, Z. Malek, U. Ehrlicher, K. Gy`oryov´a, G. Matuschek, S. Yariv,S. Yariv, *Appl. Clay Sci.* 21 (2002) 295.
- [28] Liu, F.G., Zhao, L.Z., An, N., Tong, D.S., Yu,W.H., Zhou, C.H.,. *J. Porous Mater.*2015
- [29] Chang, M.Y., Juang, R.S, *Biochem. Eng. J.* 35, (2007) 93–98.
- [30] LucileneBetega de Paiva, Ana Rita Morales, Francisco R. Valenzuela Díaz.*Organoclays: Properties, preparation and applications.*Applied Clay Science 42 (2008) 8–24.
- [31] Bergaya, F., Theng, B.K.G., Lagaly, G., 2006. *Handbook of Clay Science*, First Edition Elsevier.
- [32]Mbougouen, J.K., Ngameni, E., Walcarius, A.,*Anal.ChimicaActa* 578, (2006) 145–155.
- [33] Justin KemmegneMbougouena, Emmanuel Ngamenib, Alain Walcarius, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2007) 269–275.
- [34] Gieseking, J.E., 1939, *Soil Sci.* 47, 1–14.
- [35] LukášPetra , Peter Billik , Peter Komadel, *Applied Clay Science* 115 (2015) 174–178.
- [36]Vu Khac Hoang Bui, Duckshin Park, Young-ChulLee.*Chemical Engineering journal.*(12) 2017.

- [37] Didem Songurtekin, Esra Evrim Yalcinkaya, Didem Aga, Muharrem Seleci, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur, *Applied Clay Science* 86 (2013) 64–69.
- [38] Nevra Ozturk, Ahmet Tabak, Sinan Akgol, Adil Denizli, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 301 (2007) 490–497.
- [39] Heller, A. (1990). *Acc. Chem. Res.* 23: 128- 134.
- [40] Silvia Fabiano. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard – Lyon I. France. 2002
- [41] Olivier Courjean, Feng Gao, and Nicolas Mano., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, 48, 5897 –5899.
- [42] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g2133?lang=fr®ion=FR>.
- [43] N. Ozturk; A. Tabak; S. Akgöl; A. Denizli - *Colloids and surfaces*, 2008, 322, 148-154 .
- [44] H. Faghihian, M. Nejati-Yazdinejad, *Clay Miner.* 44 (2009) 125.
- [45] Z. Li, R. S. Bowman, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 2407.
- [46] A. Pawlukoje, J. Leciejewicz, A. J. Ramirez, *Spectrochim. Acta A* 61 (2005) 2474.
- [47] L. O. B. Benetoli, C. M. D. Souza, D. A. M. Zaia, *Origins Life Evol. B.* 37 (2007) 479.
- [48] Öztürk, N., Tabak, A., Akgöl, S., Denizli, A, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 322, 148–154. 2008.
- [49] L. Cache-Guerente, S. Cosnier, C. Innocent, P. Mailley *Labormoire. Analytica Chimica Acta* 311 (1995) 23-30.
- [50] K. Cherradi. Thèse de doctorat 2010. Université de Grenoble. France.
- [51] Lineweaver, H. ; Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* 1934, 56, 658-666.
- [52] Barman, T. E. "Enzyme Handbook." Berlin Heidelberg New York, Springer- Verlag. (1969).
- [53] N. Haddour, S. Cosnier, C. Gondran, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 5752 – 5753.
- [54] M. Holzinger, M. Singh, S. Cosnier, *Langmuir* 2012, 28, 12569 –12574.
- [55] M. S, enel, *Synthetic Met.* 161 (2011) 1861-1868.
- [56] B. Zheng, S. Xie, L. Qian, H. Yuan, D. Xiao, M.M.F. Choi, *Sensor. Actuator. B Chem.* 152 (2011) 49-55.
- [57] L. Liu, N. Jia, Q. Zhou, M. Yan, Z. Jiang, *Mater. Sci. Eng. C* 27 (2007) 57e60.
- [58] Mehmet S, enel, Cevdet Nergiz, *Current Applied Physics* 12 (2012) 1118-1124.
- [59] A. Zebda, S. Cosnier, J.-P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, P. Cinquin, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1516.

[60]XueWang, Sung Bae Kim, DongwooKhang, Hyug-Han Kim, Chang-JoonKim.
Biochemical Engineering Journal./j.bej.2016.03.016.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail de recherche comportait deux objectifs principaux. L'un était de développer un aptacapteur pour la détection du bisphénol A, l'autre était d'intégrer l'argile bentonite dans la conception et la réalisation de capteurs sensibles et reproductibles pour la détection de différentes cibles d'intérêt. Suite à une étude bibliographique portée sur les (bios) capteurs chimiques, le chapitre II composé de trois parties, s'est porté sur l'élaboration de trois capteurs chimiques et biologiques.

La partie A du chapitre II a été consacrée au développement d'un biocapteur pour la détection du bisphénol A dans l'eau en utilisant l'aptamère comme sonde de reconnaissance. On a commencé par l'immobilisation de l'aptamère histidinylé via la coordination par des cations Cu^{2+} par l'intermédiaire de l'azote du cycle imidazole des histidines avec formation des liaisons de coordination avec des ions métalliques. La spectroscopie d'impédance électrochimique a été réalisée en présence d'une sonde rédox pour confirmer la détection du BPA par l'aptamère après incubation de ce dernier et l'addition du bisphénol A en solution aqueuse. L'aptacapteur a fourni une bonne précision et une bonne sélectivité avec une limite de détection de $10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ associée à une grande gamme de linéarité de 5 ordres de grandeur, ce qui est un paramètre clé pour la conception d'un aptacapteur. Compte tenu de la facilité de sa conception, ce dispositif analytique constitue une méthode prometteuse pour surveiller la présence du BPA dans les aliments, l'eau potable ou l'environnement et pour en comprendre les effets sur les organismes vivants.

La partie B du chapitre II s'est orientée pour sa part vers l'utilisation de l'argile bentonite dans la réalisation d'un capteur chimique pour la détection des ions ammonium dans l'eau. La bentonite a été dispersée dans une membrane polymérique (PVC-DNP) pour consolider son immobilisation sur l'électrode de travail. Cette étape a été vérifiée par les variations des pics d'oxydation et de réduction de la sonde rédox par voltamétrie cyclique. Les diagrammes d'impédance révèlent l'excellent échange cationique entre la bentonite et l'ammonium. Le capteur présente une bonne sensibilité à l'égard de l'ion ammonium avec une limite de détection de l'ordre de 10^{-6} M . Il a été démontré que les réponses impédimétriques dépendent linéairement de la concentration en ammonium de 10^{-4} M à 1 M , démontrant également le potentiel de détection d'ammonium. Ceci prouve que ce sont les processus physico-chimiques à l'interface PVC-bentonite / électrolyte qui conditionnent

la sensibilité des ions ammonium. Les résultats obtenus par spectroscopie infrarouge et spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie, ont confirmé l'échange d'ions entre Na^+ et NH_4^+ et donc l'inclusion de l'ammonium dans la bentonite. Ces résultats pourraient annoncer une nouvelle approche de l'élaboration des électrodes spécifiques pour la détection des ions ammonium dans les milieux aquatiques.

Enfin, la dernière partie présentait un biocapteur ampérométrique à glucose élaboré à partir de l'argile bentonite utilisée comme élément d'immobilisation de l'enzyme glucose oxydase. La fragilité et la complexité de l'outil biologique le rendent difficile à maîtriser complètement et en même temps constituent le frein le plus important au développement des biocapteurs. Les techniques d'immobilisation, les caractéristiques du transducteur, sont les autres facteurs d'ordre scientifique influençant le développement des biocapteurs. Dans ce contexte, la bentonite a été modifiée par l'intégration de la cystéine ce qui a mené à l'augmentation de la perméabilité du film bentonite-cystéine-GOx. Le biocapteur réalisé dans ces conditions a présenté une sensibilité et une limite de détection meilleures par rapport à celles obtenues pour le biocapteur bentonite-GOx. Il est très vraisemblable que la présence de la cystéine a contribué au fonctionnement de l'enzyme et de ce biocapteur aussi. Par contre, le biocapteur bentonite-GOx a présenté une sensibilité et une limite de détection tout à fait comparables à celles rapportées dans la littérature pour des biocapteurs basés sur des matrices organiques ou inorganiques. Il ressort donc de ce travail, que la réalisation en une seule étape de biocapteurs à détection électrochimique, basés sur l'immobilisation d'une enzyme dans une matrice inorganique de type bentonite est possible. La spécificité du capteur n'a également pas encore été testée et reste à déterminer.

Résumé

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'élaboration des capteurs chimique. On a procédé à la réalisation d'un aptacapteur pour la détection du BPA, qui est classé parmi les perturbateurs endocriniens. Les argiles présentent plusieurs propriétés qui peuvent justifier leurs utilisations dans de nombreuses applications industrielles. Une étude sur le développement d'un capteur chimique à base d'une argile naturelle a été réalisée pour la détection de l'ammonium dans les milieux hydriques. Un autre biocapteur ampérométrique a été développé pour la détection du glucose en immobilisant l'enzyme glucose oxydase dans la bentonite. Cette dernière a été modifiée par la cystéine pour avoir des résultats plus performants.

Mots clés: Aptacapteur, bisphénol A, bentonite, ammonium, enzymes, glucose.

Abstract

This thesis work is part of the development of chemical sensors. An aptasensor has been developed for the detection of BPA, which is classified as an endocrine disruptor. Clays have several properties that can justify their use in many industrial applications. A study on the development of a chemical sensor based on natural clay was carried out for the detection of ammonium in water environments. Another amperometric biosensor has been developed for the detection of glucose by immobilizing the enzyme glucose oxidase in bentonite. This latter has been modified by cysteine for better results.

Keywords: Aptasensor, bisphenol A, bentonite, ammonium, enzymes, glucose.

ملخص

هذا البحث هو جزء من تطوير أجهزة الاستشعار الكيميائية. وقد تم تطوير جهاز استشعار كيميائي بيولوجي يتكون من شرائح قصيرة من الأحماض النووية للكشف عن ملوث عضوي (BPA) مسؤول عن تعطيل الغدد الصماء. يحتوي الطين على العديد من الخصائص التي يمكن أن تبرر استخدامها في العديد من التطبيقات الصناعية. أجريت دراسة على تطوير جهاز استشعار كيميائي على أساس الطين الطبيعي للكشف عن أيون الأمونيوم في بيئات المياه. تم تطوير جهاز استشعار بيولوجي آخر للكشف عن الجلوكوز عن طريق تثبيت الإنزيم (GOx) في الطين، وقد تم تعديل هذا الأخير بواسطة حمض أميني (Cystéine) للحصول على نتائج أفضل.

الكلمات المفتاحية: الأحماض النووية، ملوث عضوي (BPA)، الطين، أيون الأمونيوم، الإنزيم (GOx)، حمض أميني (Cystéine).

Liste des publications

A Zazoua, C Dernane, I Kazane, M Belghobsi, Abdelhamid Errachid, Nicole Jaffrezic-Renault. **Gold electrode functionalized with catalase for impedimetric detection of nitrite.** *Sensor Letters*, 2011.

A. Zazoua , I. Kazane , N. Khedimallah , C. Dernane , A. Errachid , N. Jaffrezic-Renault. **Evidence of ammonium ion-exchange properties of natural bentonite and application to ammonium detection.** *Materials Science and Engineering C 33* (2013) 5084–5089.

C. Dernane, A. Zazoua, I. Kazane, N. Jaffrezic-Renault. **Cadmium-sensitive electrode based on tetracetone derivatives of p-tert-butylcalix [8]arene.** *Materials Science and Engineering: C*, 2013.

A Zazoua, C Dernane, I Kazane, M Belghobsi, N Jaffrezic-Renault. **Characterisation by Impedance Spectroscopy and Capacitance-Voltage of an EMIS Sensor Functionalized by Catalase for Nitrite Detection.** *Sensors & Transducers*, 2014.

Imen Kazane, Karine Gorgy, Chantal Gondran, Nicolas Spinelli, Ali Zazoua, E Defrancq, Serge Cosnier. **Highly sensitive bisphenol-A electrochemical aptasensor based on poly (pyrrole-nitrilotriacetic acid)-aptamer film.** *Analytical chemistry*, 2016, 88, 7268–7273.

Communications scientifiques

Cosnier, S., Marks, R., Holzinger, M., Gorgy, K., Gondran, C., Le Goff, A., Palomar, Q., Kazane, I., and Haddache, F. (Keynote). **Labelless Photoelectrochemical and Impedimetric Aptasensors and Immunosensors Based on Biofunctionalized Electropolymerized Polymers.** Meet. Abstr. MA2016-02, 3268–3268 (2016).

Résumé

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'élaboration des capteurs chimique. On a procédé à la réalisation d'un aptacapteur pour la détection du BPA, qui est classé parmi les perturbateurs endocriniens. Les argiles présentent plusieurs propriétés qui peuvent justifier leurs utilisations dans de nombreuses applications industrielles. Une étude sur le développement d'un capteur chimique à base d'une argile naturelle a été réalisée pour la détection de l'ammonium dans les milieux hydriques. Un autre biocapteur ampérométrique a été développé pour la détection du glucose en immobilisant l'enzyme glucose oxydase dans la bentonite. Cette dernière a été modifiée par la cystéine pour avoir des résultats plus performants.

Mots clés : Aptacapteur, bisphénol A, bentonite, ammonium, enzymes, glucose.

Abstract

This thesis work is part of the development of chemical sensors. An aptasensor has been developed for the detection of BPA, which is classified as an endocrine disruptor. Clays have several properties that can justify their use in many industrial applications. A study on the development of a chemical sensor based on natural clay was carried out for the detection of ammonium in water environments. Another amperometric biosensor has been developed for the detection of glucose by immobilizing the enzyme glucose oxidase in bentonite. This latter has been modified by cysteine for better results.

Keywords: Aptasensor, bisphenol A, bentonite, ammonium, enzymes, glucose.

ملخص

هذا البحث هو جزء من تطوير أجهزة الاستشعار الكيميائية. وقد تم تطوير جهاز استشعار كيميائي بيولوجي يتكون من شرائح قصيرة من الأحماض النووية للكشف عن ملوث عضوي (BPA) مسؤول عن تعطيل الغدد الصماء. يحتوي الطين على العديد من الخصائص التي يمكن أن تبرر استخدامها في العديد من التطبيقات الصناعية. أجريت دراسة على تطوير جهاز استشعار كيميائي على أساس الطين الطبيعي للكشف عن أيون الأمونيوم في بيئات المياه. تم تطوير جهاز استشعار بيولوجي آخر للكشف عن الجلوكوز عن طريق تثبيت الإنزيم (GOx) في الطين، وقد تم تعديل هذا الأخير بواسطة حمض أميني (Cystéine) للحصول على نتائج أفضل.

الكلمات المفتاحية: الأحماض النووية، ملوث عضوي (BPA)، الطين، أيون الأمونيوم، الإنزيم (GOx)، حمض أميني (Cystéine).