



Capteurs gravimétriques et électrochimiques et leurs applications dans le domaine de la santé et de l'environnement : défis et solutions

Najla Fourati

► To cite this version:

Najla Fourati. Capteurs gravimétriques et électrochimiques et leurs applications dans le domaine de la santé et de l'environnement : défis et solutions. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université Paris-Saclay, 2021. <tel-04144683>

HAL Id: tel-04144683

<https://hal.science/tel-04144683v1>

Submitted on 28 Jun 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Capteurs gravimétriques et
électrochimiques et leurs
applications dans le domaine de la
santé et de l'environnement : défis
et solutions

Habilitation à diriger des recherches
de l'Université Paris-Saclay

présentée et soutenue au Cnam, le 30 juin 2021, par

Najla FOURATI

Composition du jury

Aziz AMINE

Professeur, Université Hassan II, Casablanca,
Maroc

Rapporteur

Abdelhamid ERRACHID EI SALHI

Professeur, Université Claude Bernard, Lyon 1

Rapporteur

Georges NASSAR

MCF HDR, INSA Hauts de France

Rapporteur

Bruno LE PIOUFLE

Professeur, Université Paris-Saclay

Examineur

Rachida ZERROUKI

Professeure, Université de Limoges

Examinatrice

Ali OTHMANE

Professeur, Faculté de Médecine, Université
de Monastir, Tunisie

Examineur

Mohamed Mehdi CHEHIMI

Directeur de Recherche CNRS, ITODYS

Examineur

Chouki ZERROUKI

MCF HDR, Cnam

Examineur

Liste des abréviations

AAT	3-Acetic acid thiophene
AChE	Acétylcholinestérase
ACN	Acetonitrile
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
AnCl	9-chlorométhyl anthracène
ApoE	Apolipoprotéine E
AFM	Microscopie À Force Atomique
APTES	3-Aminopropyltriéthoxysilane
ATZ	Atrazine
BAW	Bulk acoustic waves
BL	Couche de blocage
BP-AN	2,2-bis(4 anthracényméthoxy-1,1'-biphényle
BPS-AN	4-(9-anthrylméthoxy) benzyl[4-(9-anthrylméthoxy) phényl] sulfone
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Chronoamérométrie
CV	Voltammétrie cyclique
CCl₄	Tétrachlorométhane
C₁₄H₂₉ClO₂Si	Methyl 11-(chlorodimethylsilyl)undecanoate
C₇H₁₆	Heptane
CP	Cancer de la prostate
DFT	Théorie de la fonction de la densité
EDC	1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) Carbodiimide
EDOT	3,4-Ethylenedioxythiophene
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EQCM	Microbalance électrochimique à quartz
E-SAW	Electrochemical Surface Acoustic Wave

FBAR	Thin Film Bulk Acoustic Resonators
FMO	Orbitales moléculaires frontières
GaPO₄	Orthophosphate de gallium
GGA	Approximation du Gradient Généralisé
Gly	Glyphosate
GPTMS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane
HEPES	Acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine]éthanesulfonique
HIV	Human immunodeficiency virus
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HOMO	highest occupied molecular orbital
H₂SO₄	Acide sulfurique
IIP	Polymères à empreintes ioniques
IONP	Iron Oxyde Nano Particules
ITO	Indium Tin Oxide
K_d	Constante De Dissociation
KOH	Hydroxyde de potassium
La₃Ga₅SiO₁₄	Langasite
LBW	Leaky bulk waves
LiClO₄	Perchlorate de lithium
LiNbO₃	Niobiate de lithium
LiTaO₃	Tantalate de lithium
LOC	Lab-on-Chip
LOD	Limite de détection
LSAW	Leaky Surface Acoustic Wave
LUMO	lowest unoccupied molecular orbital
MIP	Polymères à empreintes moléculaires
NHS	Nhydroysuccinimide
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
NIP	Non Imprinted Polymer
NiPC	Phthalocyanines métallées avec du nickel
OMS	Organisation mondiale de la santé

OP	Organophosphorés
PAW	Projector Augmented Wave
PBE	Perdew-Burke-Ernzerhof
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Phthalocyanines
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCVD	Pressure Chemical Vapor Deposition
PDMS	Polydimethylsiloxane
pH	Potentiel D'hydrogène
PFP	Pentafluorophénol
PMMA	polyméthacrylate de méthyle
PoC	Point-of-Care
PPy	Polypyrrole
PSA	Prostate Spécifique Antigen
R-SAW	Rayleigh- Surface Acoustic Wave
SRAS	Syndrome respiratoire aigu sévère
SARS-CoV-2	coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère
SAW	Surface Acoustic Wave
SBAW	Shear bulk acoustic waves
SBM	Single Base Mismatch
SCE	Electrode au calomel saturé
SH-SAW	Shear Horizontal Surface Acoustic Wave
SiO₂	Quartz
SPE	Screen Printed Electrode
SSBW	Surface skimming bulk wave
SWV	Voltammetrie à ondes carrées
TDP-AN	9-{{[4-([4-(9 anthrylméthoxy) phényl]sulfanyl)méthyl]}méthyl} anthracène
TSM	Thickness shear mode
UAHF	United Atom Hartree Fock
VASP	Vienna Ab Initio Simulation Package
ZnPC	Phtalocyanine métallée au zinc

Liste des figures

- Figure.1.1. Principales applications des capteurs a) biologiques et b) chimiques
- Figure.1.2. Principales techniques de transduction et représentations types de leurs signaux de sortie
- Figure.1.3. Principales méthodes électrochimiques, leurs principes et des représentations schématiques de leurs réponses
- Figure.1.4. Sensibilités versus fréquences des dispositifs courants à ondes acoustiques QCM : microbalance à quartz ; SAW : surface acoustic wave, Bulk waves (BAW), FBAR : film bulk acoustic resonators
- Figure 1.5. Représentation schématique d'une ligne à retard. λ est la longueur d'onde, W est l'ouverture, et L_{cc} est la distance centre à centre
- Figure 1.6. (a) Représentation schématique de la ligne à retard. (b) photographie d'une puce avec deux capteurs ; (c) base du support mécanique avec emplacement du capteur ; (d) système d'intégration complet du capteur avec un circuit imprimé doté de pointes de contact pour déporter les entrées et les sorties de chaque voie
- Figure. 1.7. Schéma représentatif des différentes étapes technologiques utilisées lors de la fabrication des capteurs SAW (AZ5214E est la résine utilisée lors de l'étape de photolithographie)
- Figure 1.8. Caractérisation électrique d'un dispositif SAW : mesure de la perte d'insertion en fonction de la fréquence
- Figure.1.9. Spectre S21 du capteur SAW. Variations du module (entre 80 et 200 MHz) et de la phase autour de la fréquence caractéristique du SAW (104 MHz)
- Figure.1.10. Représentation schématique de la chaîne de mesure en mode oscillateur
- Figure.1.11. Représentation schématique de la chaîne de détection en mode impulsionnel (le même circuit alimente également la seconde voie du capteur)
- Figure 1.12. Vue d'ensemble des différentes parties du système d'intégration du capteur avec le support mécanique et le circuit fluidique
- Figure.1.13. Représentation schématique du E-SAW
- Figure.1.14. Suivi gravimétrique de l'électrosynthèse d'un film conducteur sur la zone sensible du capteur SAW et comparaison entre les voltamogrammes réalisés (a) avant et (b) après la formation du film. Les voltamogrammes ont été réalisés à un taux de balayage de 100 mV/s, dans une solution de $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ à 0.1 M
- Figure.1.15. Variations de la tension et de la phase en fonction du temps, à différentes vitesses de balayage (25 mV/s ; 100 mV/s et 400 mV/s)
- Figure.1.16. Variations de phase et de charge en fonction du potentiel appliqué lors d'acquisitions par voltammétrie cyclique à une vitesse de balayage de 100 mV s⁻¹ dans du $\text{LiClO}_4/\text{ACN}$ 0.1 M
- Figure.2.1. Représentation schématique d'un polymère à empreintes moléculaires (MIP)
- Figure.2.2. Suivi gravimétrique de l'extraction de l'atrazine du MIP (a→b), puis de sa reconnaissance par les cavités formées dans la matrice polymérique (b→c). L'encart correspond aux voltammogrammes du MIP (réalisés dans LiClO_4 0.1 M - ACN à une

vitesse de balayage de 100 mV/s) de (a) juste après l'électro-synthétise, (b) après extraction de l'atrazine, et (c) après injection de 1 mM d'atrazine.

- Figure.2.3. Structure d'une molécule de PC métallée
- Figure.2.4. Variations de phase du signal de sortie des capteurs en fonction du temps, à la suite de l'injection d'une solution 10^{-9} M de (a) Ométhoate et (b) Méthidathion.
- Figure.2.5. Structures optimisées des complexes NiPc -ométhoate (site oxygène (a) et site soufre (b)) et NiPc-Terbutylazine-2-hydroxy (site azote (c) et site oxygène (d)). La distance entre les atomes en interaction possible a été insérée.
- Figure.2.6. Deux modes possibles d'interaction entre le méthidathion et le NiPc
- Figure.2.7. Suivi de la variation du pic d'oxydation du glyphosate en fonction de la durée d'incubation dans une solution de pyrrole/glyphosate/LiClO₄.
- Figure.2.8. Suivi de la variation de l'amplitude du pic de courant de pointe en fonction de la durée d'extraction dans le méthanol.
- Figure.2.9. Voltammogrammes à ondes carrés de (a) un MIP PPy, avant et après extraction du Gly, un NIP et un MIP extrait incubé de nouveau dans une solution 10^{-4} M de Gly (b) réponse du capteur à base de MIP, pour différentes concentrations de Gly.
- Figure.2.10. Suivi temporel de la variation de phase du capteur SAW fonctionnalisés avec un MIP_Gly après l'injection d'une solution de 2×10^{-8} M de Gly : ajustement de la courbe avec une exponentielle décroissante, (ajustement 1, ligne continue rouge) en considérant tout le temps de reconnaissance, (ajustement 2, ligne continue bleue) dans le domaine temporel restreint.
- Figure.2.11. (a) Variation de la valeur du pic de courant en fonction de la concentration en Gly ; (b) Valeurs absolues cumulées des déphasages en fonction de la concentration en Gly. Ligne bleue : ajustement avec le modèle à deux sites de reconnaissance ; ligne rouge : ajustement avec le modèle combiné One site et Hill
- Figure.2.12. Modèle de matrice polymère considéré pour les calculs. La projection dans le plan montre le réseau primitif et le super réseau utilisé ($3 \times 3 \times 1$) (en haut) et la vue latérale montre la distance inter-plans (en bas). C, bleu clair ; H, jaune et N, bleu foncé
- Figure.2.13. (a) Géométries optimisées de Gly. (b) Configurations les plus stables de Gly à l'intérieur de la matrice PPy. C, bleu clair ; H, blanc ; O, rouge, P, phosphore et N, bleu foncé
- Figure.2.14. Réponses électrochimiques relatives du capteur MIP au glyphosate d'ammonium, au simetryn, à la terbuthylazine -2- hydroxy, à l'ométhoate et au méthidathion à la concentration de 10^{-4} M, comparées à la réponse du glyphosate à 10^{-11} M.
- Figure.2.15. Structures optimisées du point de vue géométrique (B3LYP/6-31G (d, p)) de : BPS-AN, TDP-AN et BP-AN. S, vert ; O, rouge ; C, bleu ; H, jaune
- Figure.2.16. Les structures moléculaires optimisées des complexes Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+} / (BPS-AN, TDP-AN et BP-AN). S, vert ; O, rouge ; C, bleu ; H, jaune ; Pb, orange ; Hg, gris foncé ; Cu, violet
- Figure.2.17. Les couleurs des charges atomiques des complexes Pb^{2+} les plus stables : (a) BPS-AN, (b) TDP-AN et (c) BP-AN

- Figure.2.18. Diagramme énergétique des interactions de l'orbitale moléculaire frontière de la molécule BPS-AN et des cations Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+}
- Figure.2.19. Variations du déphasage cumulatives ($\Delta\Phi$) pour les molécules BPS-AN, TDP-AN et BP-AN en fonction de la concentration cumulative en ions plomb
- Figure.2.20. Variations du déphasage cumulatives ($\Delta\Phi$) en fonction des concentrations cumulatives de Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+} pour le capteur SAW fonctionnalisé avec BPS-AN
- Figure.2.21. Confrontation entre les valeurs expérimentales de sensibilité des capteurs BPS-AN /SAWs et les valeurs des énergies de solvation des complexes BPS-AN /(Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+})
- Figure.2.22. Confrontation entre les valeurs expérimentales de sensibilité des capteurs PBS-AN/SAW et les valeurs calculées des énergies d'interaction des complexes PBS-AN/(Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+}) en phase gazeuse
- Figure.3.1. a) Représentation schématisée des étapes de réalisation du capteur d'ADN. b) Suivi temporel de la variation de la fréquence suite à l'injection des ADN sondes.
- Figure.3.2. Variations normalisées de la fréquence en fonction du temps suite aux étapes d'immobilisation et d'hybridation
- Figure.3.3. Variations des taux d'hybridation et de la fréquence en fonction du nombre de paires de bases des ADNs cibles
- Figure.3.4. Variations temporelles de la fréquence suite à plusieurs régénérations
- Figure.3.5. Oligonucléosides possédant une unité triazolique en tant que lien internucléosidique se substituant aux liaisons phosphodiester.
- Figure.3.6. Variations temporelles de la fréquence suite à l'injection des di, tri et tétra nucléosides.
- Figure.3.7. Variations temporelles des fréquences normalisées suite à l'injection d'ADNs cibles et de tétra thymidine
- Figure.3.8. Schéma de fonctionnalisation des électrodes électrochimiques
- Figure.3.9. Variations des taux d'hybridation (colonnes rayées) et de la capacité relative (colonnes grises pleines) par rapport à la nature et la position du mismatch.
- Figure.3.10. Suivi de la variation de la capacité relative en fonction de la concentration d'ADN cible pour trois échantillons réels. Le biocapteur électrochimique a été fonctionnalisé avec la sonde 2
- Figure.3.11. Suivi de la variation du potentiel de bande plate en fonction de la concentration d'ADN cible pour trois échantillons réels. Le biocapteur électrochimique a été fonctionnalisé avec la sonde 2.
- Figure.3.12. Schéma représentatif des différentes étapes de modification des surfaces d'ITO et des deux stratégies de fonctionnalisation
- Figure.3.13. Réponses impédimétriques et ampérométriques en présence (à gauche) et en absence des IONPs (à droite) suite à la détection de PSA dans du PBS. Mesures faites dans du PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$
- Figure.3.14. Variations de ΔI en fonction de la concentration de PSA dans du PBS. Mesures faites dans le PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$

- Figure.3.15. Variations de ΔI en fonction des concentrations de PSA dans le sérum artificiel. Mesures faites dans du PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$
- Figure.3.16. Courbes de variations de ΔI en fonction de la concentration de PSA dans un sérum humain non dilué. Mesures faites dans le PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$
- Figure.3.17. Courbe de calibration obtenue à partir de la moyenne de mesures faites sur 3 sérums différents. Mesures faites dans le PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$
- Figure.3.18. Représentation schématique des différentes problématiques qui peuvent être rencontrées lors de l'étape d'extraction
- Figure.3.19. Méthodologies d'électrosynthèse d'une protéine sur la surface d'une électrode : A) électropolymérisation d'un mélange de protéine et de monomère à partir d'une solution; B) Physisorption de la protéine sur la surface puis électropolymérisation : C) utilisation d'une couche auto-assemblée pour une immobilisation orientée de la protéine
- Figure.3.20. Vue globale de la protéine PSA insérée dans la matrice polymérique en PPy
- Figure.3.21. Représentation schématique de la construction du polymère en polypyrrole à empreintes moléculaires de PSA
- Figure.3.22. Voltammogrammes à ondes carrées après incubation du MIP extrait dans des solutions contenant des concentrations croissantes de PSA
- Figure.3.23. Variations des pics de courant du PSA enregistrés à partir de capteurs fonctionnalisés avec un MIP et un NIP, en fonction des concentrations de PSA, en échelles linéaire et logarithmique (inset)
- Figure.3.24. Comparaison des concentrations de PSA dans 35 échantillons de sérums de patients. Les mesures ont été faites avec le capteur à base de MIP et le « golden standard » ELISA
- Figure. 4.1. Voltammogrammes de 4 électrodes « en or » : variations des densités de courant en fonction du potentiel. Mesures réalisées dans une solution d'eau contenant du LiClO_4 0,1 M (pH = 6,11).
- Figure.4.2. Suivi par CV des différentes étapes de nettoyage et d'activation de surface d'ITO. Les mesures ont été réalisées dans une solution de PBS 0,01 M, à pH 7,4, contenant 0,1 M KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$

Liste des schémas

- Schéma.2.1. Formules chimiques des molécules de BPS-AN, TDP-AN et BP-AN

Liste des tableaux

- Tableau 1.1. Exemples de capteurs à ondes acoustiques : paramètres clés, avantages et inconvénients. Revu et adapté à partir de la revue de (Fu et al., 2017)
- Tableau 1.3. Quelques paramètres expérimentaux calculés à partir de la réponse ESAW pour le polymère conducteur pendant des mesures CV à différentes vitesses de balayage
- Tableau 2.1. Energies d'adsorption (d'interaction) des ions métalliques sur les molécules d'anthracène en phases gazeuse et liquide
- Tableau 2.2. Différences d'énergie HOMO-LUMO, des trois dérivés de l'anthracène et des trois cations en (eV), calculées au niveau B3LYP en utilisant la base 6-31G (d,p) pour BPS-AN et la base LANL2DZ ECP pour les cations. Les énergies d'interaction sont données pour les complexes Pb^{2+}
- Tableau 2.3. Estimation de la sensibilité (S) aux ions Pb^{2+} et de la limite de détection (LOD) des capteurs SAW à base de dérivés de l'anthracène
- Tableau 2.4. Estimation des sensibilités (S) et de la limite de détection (LOD) des capteurs BPS-AN/SAW, vis-à-vis des ions Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+}
- Tableau 3.1. Séquences des ADNs sondes et cibles
- Tableau 3. 2. Valeurs des taux d'hybridation τ pour les différentes sondes et cibles
- Tableau 3.3. Valeurs de $\frac{\Delta C/C_0}{[\text{ADN}]}$ pour les différentes sondes et cibles
- Tableau 3.4. Comparatif des performances métrologiques des trois biocapteurs, développés dans le cadre de cette étude, lors de la détection du PSA dans le tampon PBS
- Tableau.4.1. Principales techniques de fonctionnalisation avec leurs avantages, inconvénients et challenges

Introduction générale

Les technologies associées aux développements des capteurs chimiques et des biocapteurs sont considérées, depuis quelques années, comme étant des approches dynamiques visant à identifier et quantifier de façon rapide et ultrasensible, des analytes donnés dans des milieux complexes. Ce sont principalement les demandes liées aux domaines de l'environnement et de la santé, nombreuses et de plus en plus exigeantes, qui sont à l'origine de la croissance des marchés des capteurs chimiques et biologiques.

Ce constat émane de la forte demande en termes d'outils de détection fiable et à faible coût, capables de « simplifier » le contrôle et la surveillance de l'environnement, et qui ne nécessitent ni de grands volumes d'échantillons, ni une préparation préalable. Divers types de capteurs chimiques ont donc été développés pour la surveillance de la contamination des sols, de l'eau ou encore de l'air par des pesticides, des ions lourds, des produits émergents (antibiotiques, perturbateurs endocriniens, ...) ou encore pour la détection de la présence de gaz toxiques ou d'explosifs....

D'autre part, il est indéniable que les grandes avancées médicales enregistrées ces dernières décennies ont été à l'origine de la progression importante de l'espérance de vie, même si de grandes inégalités sanitaires persistent encore entre les pays. La situation de la pandémie du Covid-19 en est un parfait révélateur. Les progrès en question ont été possibles grâce aux contributions de divers domaines scientifiques, dont la physique, la chimie, la biochimie, la pharmacologie et l'ingénierie, dont la synergie a permis l'essor des avancées scientifiques et techniques nécessaires au développement des biocapteurs comme de nouveaux outils de diagnostic. Avec comme visée, celle de détecter les maladies à des stades suffisamment précoces, permettant de mieux soigner, de limiter les séquelles liées à certains traitements, et surtout épargner des vies.

C'est dans ces contextes environnementaux et de santé publique que se sont inscrits mes travaux de recherche, dont une partie est présentée dans ce mémoire.

Ce manuscrit est articulé en quatre parties :

Le premier chapitre est dédié à la présentation des transducteurs électrochimiques et gravimétriques à ondes acoustiques de surface. Une attention particulière a été portée à ces derniers puisque aussi bien les dispositifs, que les chaînes d'acquisition et le montage microfluidique ont été développés au sein de notre Laboratoire. Conscientes et conscients par ailleurs de la nécessité d'une double transductions, pour s'affranchir des biais expérimentaux et pour avoir des résultats complémentaires, nous avons développé un E-SAW (pour Electrochemical Surface Acoustic Wave sensor) présenté dans la dernière partie de ce premier chapitre.

Le second chapitre est dédié aux capteurs chimiques pour des applications environnementales. Nous avons travaillé, au cours de ces dernières années, sur la détection de différents types de polluants, principalement des pesticides et des ions lourds. Nous avons adapté nos techniques de fonctionnalisation à l'analyte à détecter et nous nous sommes basés, dans certains cas, sur la modélisation moléculaire, pour comprendre la nature de l'interaction entre l'analyte à détecter et la couche de reconnaissance, et/ou pour avoir une estimation de l'énergie d'interaction entre ces différentes entités.

Le chapitre trois est dédié à la présentation de biocapteurs pour des applications médicales innovantes : détection du polymorphisme de l'apolipoprotéine E, détection d'analogues d'oligonucléotides à visées thérapeutiques ou encore la détection d'un biomarqueur du cancer de la prostate, le PSA (pour Prostate Specific Antigen). Dans l'ensemble de ces études, nous avons réalisé des mesures comparées, soit entre différentes techniques de transduction (électrochimie / gravimétrie ou électrochimie / ELISA), soit entre différentes techniques de fonctionnalisation (impression moléculaire versus couches autoassemblées).

Pour l'ensemble des capteurs chimiques et biologiques, développés dans le cadre de travail, nous avons estimé les valeurs de limite de détection, de sensibilité, et de constantes de dissociation qui renseignent sur l'affinité entre les analytes à détecter et les couches sensibles.

Dans la dernière partie de ce rapport, j'ai porté une vision critique, basée sur l'expérience que j'ai acquise ces dernières années, sur les défis à relever pour que les capteurs deviennent LES dispositifs analytiques de choix pour une détection ultra-sensible et spécifique d'espèces chimiques et biologiques dans un milieu donné.

Chapitre 1 :

Les transducteurs gravimétriques et électrochimiques

1.1. Avant-propos

26 septembre 2019 : un violent incendie s'est déclaré dans un entrepôt de l'usine Lubrizol à Rouen. Un panache de fumée de 22 km de long et 6 km de large a recouvert l'agglomération, avec une très forte odeur et de la suie qui se déposait sur le sol. Pour éteindre le feu, près de 900 pompiers sont intervenus sur le site sinistré, sans connaissance préalable de la nature exacte des produits qui étaient en train de brûler (plus de 9500 tonnes en tout). Trois semaines plus tard, les bilans sanguins de plusieurs pompiers ont montré des résultats anormaux pour le foie, avec des niveaux de transaminases trois fois supérieurs à la normale, ainsi que des perturbations au niveau de la fonction rénale¹. En disposant de dispositifs capables de déterminer en temps réel la nature des produits chimiques présents dans l'air le jour de leur intervention, les pompiers auraient pu mettre en place les moyens de prévention adéquats, limitant voire supprimant le risque chimique.

Décembre 2019, la Chine a assisté à l'émergence d'un nouveau coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). Ce virus, baptisé SARS-CoV-2, s'est répandu ensuite rapidement dans le monde entier à partir de Wuhan, épicentre de la pandémie. Depuis, des milliers de décès ont été signalés quotidiennement dans les cinq continents et des millions de personnes ont été mises en quarantaine. Les gouvernements ont tenté de répondre par diverses stratégies, principalement basées sur des modèles épidémiologiques, en commençant par un confinement strict, et en adoptant différentes autres mesures par la suite : télé travail, fermeture des commerces "non essentiels" et des lieux de culture, couvre-feu, fermeture des frontières...La plupart de ces mesures sont encore en vigueur au printemps 2021. Ce qui aurait probablement manqué entre décembre 2019 et février 2020 ce sont des dispositifs fiables et très sensibles capables de détecter rapidement et sans traitement préalable des échantillons, le virus chez les individus symptomatiques et asymptomatiques afin de les isoler du reste de la population.

Ce ne sont là que deux exemples, parmi tant d'autres, qui montrent la nécessité de disposer d'outils analytiques miniaturisés capables de détecter, voire doser, des espèces chimiques ou biologiques en temps réel et, idéalement sans prétraitement des échantillons. Ces systèmes constitués d'une couche sensible, qui reconnaît sélectivement l'analyte (ou la famille d'analytes d'intérêt) et d'un transducteur capable de transformer l'interaction chimique ou biologique en un signal électrique mesurable, sont les capteurs chimiques et biologiques. Ces dispositifs présentent, outre la fiabilité et la versatilité, de nombreux avantages, dont une grande sensibilité, une faible limite de détection, un faible coût, des temps de réponse relativement courts et une faible consommation énergétique. Ce qui explique leurs utilisations croissantes dans de nombreuses applications à fort impact (Figure.1.1). Le défi actuel consiste donc à les faire « adopter » par le monde socioéconomique.

1 https://www.lemonde.fr/planete/article/2019/10/16/des-analyses-biologiques-anormales-pour-des-pompiers-intervenues-sur-l-incendie-de-lubrizol_6015723_3244.html

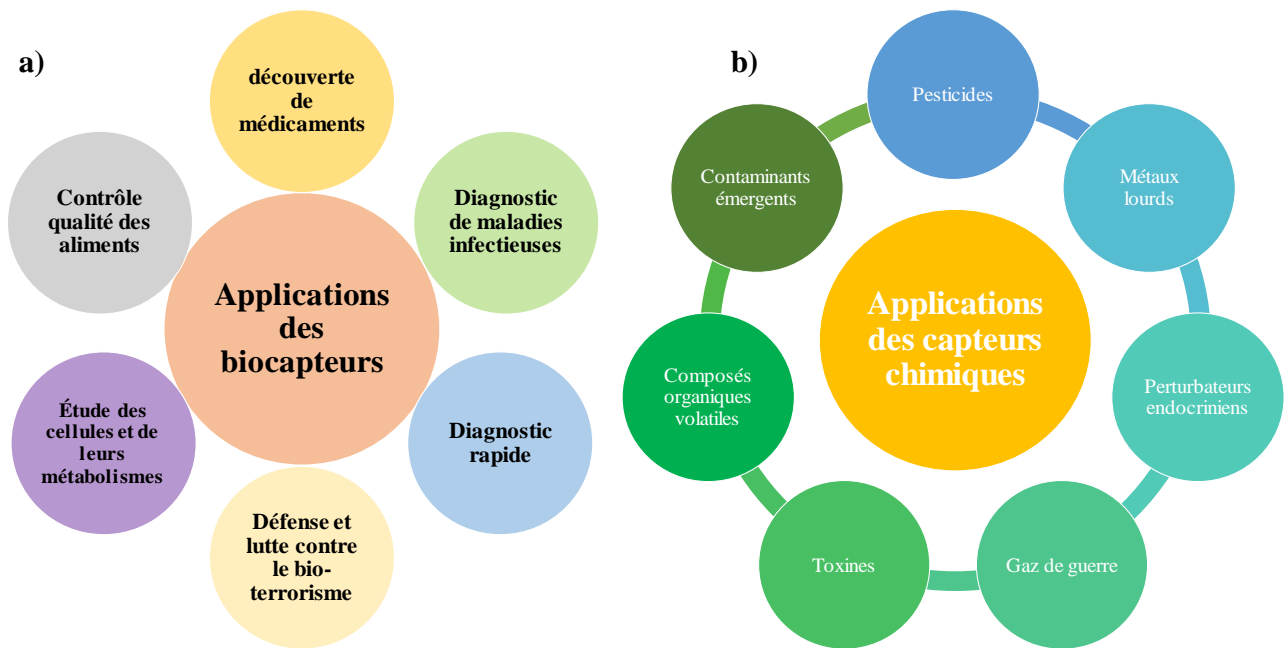


Figure.1.1. Principales applications des capteurs a) biologiques et b) chimiques

Comme précisé précédemment, les transducteurs font partie intégrante des capteurs chimiques et biologiques. Les principales techniques de transduction, ainsi que des représentations types de leurs signaux de sortie, sont présentées dans la Figure.1.2.

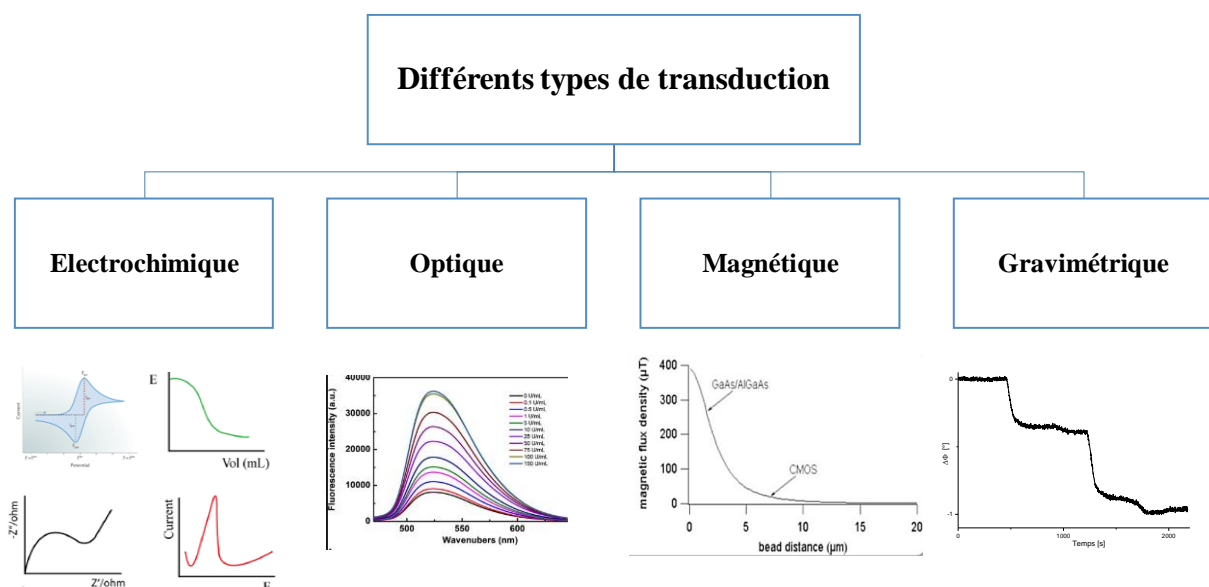


Figure.1.2. Principales techniques de transduction et représentations types de leurs signaux de sortie.

Parmi ces quatre grandes familles, nous nous sommes intéressés, dans le cadre de nos travaux, à deux types que nous avons utilisés séparément ou en complémentarité : les transducteurs électrochimiques et gravimétriques à ondes acoustiques de surface (SAW, pour Surface acoustic waves, dans la suite de ce rapport).

L'électrochimie est une « technique de routine » dans la majorité des laboratoires de recherche. Son principe ainsi que les différentes méthodes de mesures s'y attachant sont présentés succinctement dans le paragraphe 1.2. Moins utilisés que les capteurs chimiques, mais tout aussi robustes et fiables, les capteurs à ondes acoustiques feront l'objet du paragraphe 1.3, avec davantage de détails.

1.2. La transduction électrochimique

Le but des mesures électrochimiques est de permettre d'analyser un mécanisme interfacial par une identification chimique et une caractérisation cinétique des intermédiaires réactionnels (GABRIELLI 1994). Les principales méthodes électrochimiques, leurs principes et des représentations schématiques de leurs réponses sont présentés dans la Figure.1.3.

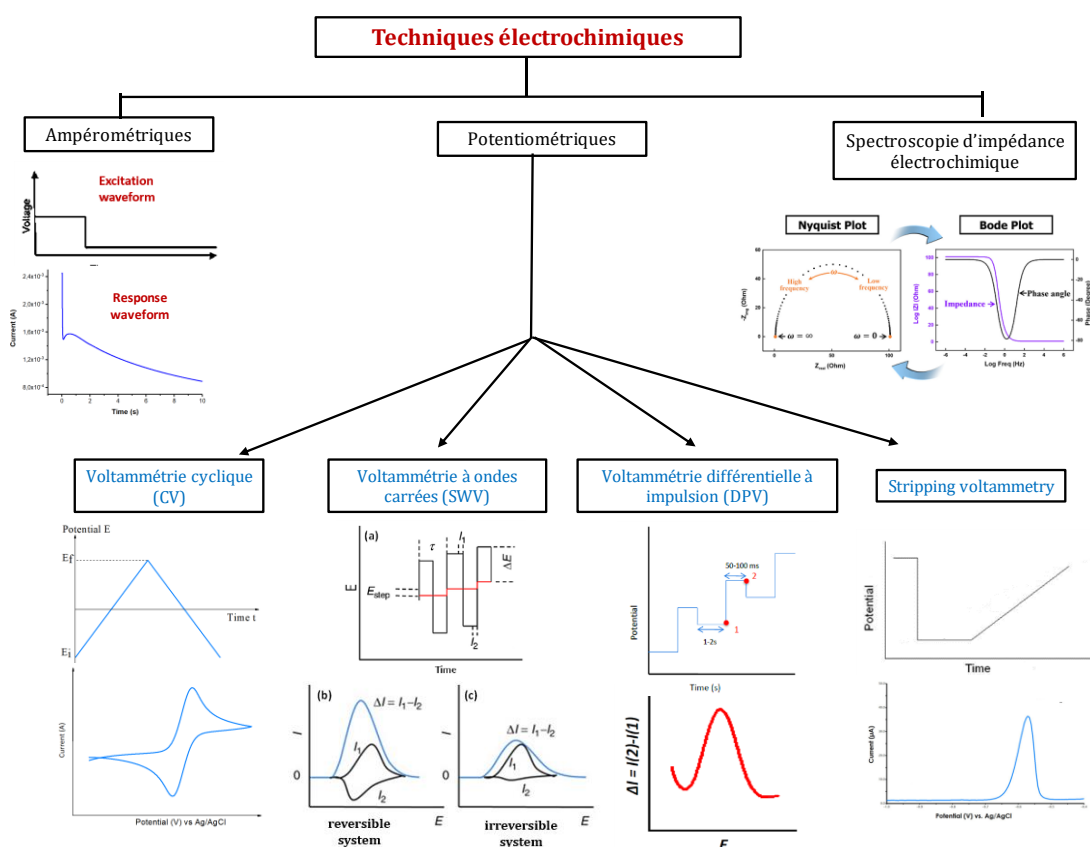


Figure.1.3. Principales méthodes électrochimiques, leurs principes et des représentations schématiques de leurs réponses.

Nous avons fait le choix de ne présenter dans ce rapport que les principes des techniques utilisées dans le cadre de nos travaux de recherche, à savoir, la spectroscopie d'impédance, la voltammétrie cyclique, la voltammétrie à ondes carrées et la chronoampérométrie.

1.2.1. La spectroscopie d'impédance électrochimique

La spectroscopie d'impédance électrochimique (ou EIS pour Electrochemical Impedance Spectroscopy) est une technique de caractérisation qui permet d'étudier la fonction de transfert des systèmes électrochimiques non linéaires et non stationnaires. Son principe repose sur la mesure et l'analyse de la réponse de l'électrode de travail à une excitation temporelle sinusoïdale de faible amplitude et dont la fréquence peut varier dans un large domaine (de quelques mHz à quelques dizaines de kHz). Pour conserver une réponse linéaire de l'électrode, l'amplitude de la modulation est limitée à de faibles valeurs, typiquement inférieures à 10 mV.

Les mesures par EIS permettent d'obtenir les variations des composantes imaginaires, Z_i , et réelles Z_r de l'impédance du système "électrode de travail / solution d'étude", en fonction de la fréquence (voir diagramme de Bode dans les encadrés de la Figure.1.3). Il est cependant plus courant de faire des représentations en diagrammes de Nyquist, et de le rapprocher par un circuit électrique équivalent, qui renseigne sur la nature du « régime électrochimique » du système considéré. La grande sensibilité de la spectroscopie d'impédance électrochimique en fait l'une des techniques les plus largement utilisées actuellement pour la détection d'espèces chimiques et biologiques (Bertok *et al.*, 2019, Gray *et al.*, 2003, Nemeir *et al.*, 2020).

1.2.2. La voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (CV, pour cyclic voltammetry) est une technique utilisée pour la mesure des variations du courant en fonction de la tension appliquée aux bornes d'une électrode. Le principe repose sur un premier balayage linéaire du potentiel entre E_i et E_f (E_i et E_f étant les bornes inférieures et supérieures du potentiel), suivi par un second balayage en sens inverse (de E_f à E_i) tout en maintenant la vitesse de balayage constante (voir encadré, Figure.1.3). Cette technique est la plus couramment utilisée en électrochimie parce qu'elle permet d'élaborer un matériau puis de le caractériser. Elle permet également d'obtenir la réponse d'espèces redox en solution ou immobilisées sur la surface de l'électrode de travail (Heinze 1984, Massah *et al.*, 2019, Nicholson 1965, Semenova *et al.*, 2018).

1.2.3. La voltammétrie à ondes carrées

La voltammétrie à ondes carrées (SWV pour square wave voltammetry) est basée sur la juxtaposition d'une onde carrée de période ($1/f$) et d'une rampe (voir encadré, Figure.1.3). Deux courants sont ainsi mesurés, I_1 en fin du pulse haut et I_2 en fin du pulse bas, puis soustraits automatiquement pour donner le courant différentiel résultant. La SWV étant une méthode très sensible et rapide, elle est donc fréquemment appliquée à la détermination quantitative d'une large variété de biomolécules, polluants environnementaux, antioxydants, ... (Ghanam *et al.*, 2021, Mann *et al.*, 2014, Mirceski *et al.*, 2014, Rassas *et al.*, 2019).

1.2.4. La chronoampérométrie

La chronoampérométrie (CA) est une technique électrochimique qui consiste à suivre l'évolution du courant en fonction du temps lorsque le système est soumis à un échelon de potentiel au niveau de l'électrode de travail (voir encadré, Figure.1.3). Cette technique est généralement utilisée pour le suivi des cinétiques des réactions électrochimiques. Comme la CV, elle est souvent utilisée pour réaliser des dépôts de matériaux sur les surfaces des électrodes de travail. Par rapport à la CV, la CA présente

l'avantage d'un meilleur contrôle des épaisseurs des films déposés ainsi que leurs cinétiques de dépôt (Aoki *et al.*, 1989, García-Jareño *et al.*, 1999, Hughes *et al.*, 2021, Maouche *et al.*, 2012).

1.3. Les capteurs à ondes acoustiques

1.3.1. Généralités

Les dispositifs à ondes acoustiques ont été largement utilisés, depuis plus de 60 ans, dans les communications et le secteur automobile, et sont actuellement de plus en plus utilisés pour la détection d'espèces chimiques et biologiques. Leur principe de base repose sur l'application d'une excitation électrique sinusoïdale à des électrodes émettrices disposées sur un matériau piézoélectrique, générant ainsi une onde acoustique (mécanique) qui peut se propager soit perpendiculaire soit le long de la surface du matériau (effet piézoélectrique inverse). Arrivée au niveau des électrodes réceptrices, cette onde mécanique est convertie en un signal électrique mesurable (effet piézoélectrique direct).

Parmi les différents types d'ondes acoustiques générées, on distingue les ondes de volume (BAW, pour bulk acoustic waves), les thickness shear mode (TSM), les leaky bulk waves (LBW), les shear bulk acoustic waves (SBAW) généralement appelées surface skimming bulk wave (SSBW), ou encore les ondes de surface, qui peuvent être de type Rayleigh (R-SAW), leaky SAW (LSAW), de cisaillement horizontal (SH-SAW) ou de Love.

Sur le Tableau 1.1, revu et adapté à partir de la revue de Fu *et al* (Fu *et al.*, 2017), sont présentés les capteurs à ondes acoustiques les plus rapportés dans la littérature. Le choix d'un capteur à ondes acoustiques repose donc sur un compromis entre différents paramètres, dont la simplicité de réalisation en salle blanche, la possibilité (ou pas) de faire des mesures en milieu liquide, la fréquence de fonctionnement et la sensibilité escomptée. La Figure.1.4 regroupe les dispositifs usuels à ondes acoustiques selon leurs sensibilités et leurs fréquences de fonctionnement.

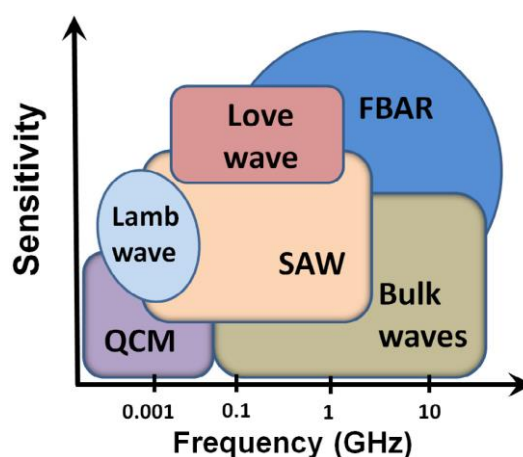


Figure.1.4. Sensibilités versus fréquences de fonctionnement des dispositifs courants à ondes acoustiques
QCM : microbalance à quartz ; SAW : surface acoustic wave, Bulk acoustic waves (BAW), FBAR : film bulk acoustic resonators (Fu *et al.*, 2017).

Il en ressort que :

- Les microbalances à quartz (QCM) ont une sensibilité limitée en raison de leur faible fréquence de fonctionnement inversement proportionnelle à l'épaisseur du substrat ;
- Les dispositifs à ondes de volume (BAW) peuvent être plus sensibles que les QCM, mais ils ne peuvent cependant pas être utilisés pour la détection d'espèces chimiques et biologiques en milieux liquides à cause de l'atténuation des ondes dans le milieu de détection ;
- Les dispositifs SAW ont une grande sensibilité en raison de leur fréquence de fonctionnement élevée ; cette sensibilité est améliorée davantage grâce à l'effet de guidage des ondes de surface dans le cas des dispositifs à ondes de Love;
- Les dispositifs les plus sensibles sont les thin film bulk acoustic resonators (FBAR).

Parmi ces différents dispositifs, notre choix s'est porté sur les capteurs à ondes acoustiques de surface à cisaillement horizontal (SH-SAW).

1.3.2. Choix du matériau piézoélectrique et de la configuration du transducteur

Différents types de matériaux piézoélectriques peuvent être utilisés comme substrats pour la réalisation de capteurs à ondes de surface : le quartz (SiO_2), le tantalate de lithium (LiTaO_3), le niobate de lithium (LiNbO_3), et plus récemment la langasite ($\text{La}_3\text{Ga}_5\text{SiO}_{14}$) ou encore l'orthophosphate de gallium (GaPO_4). Les propriétés des matériaux piézoélectriques les plus communs sont présentées dans le Tableau 1.2.

En passant en revue les avantages et inconvénients des différents matériaux piézoélectriques disponibles, nous avons opté pour le LiTaO_3 pour son fort coefficient de couplage électromécanique et sa constante diélectrique élevée, $\epsilon_r = 47$, en comparaison au quartz ($\epsilon_r = 4,6$).

Ce choix fait, nous nous sommes penchés sur la configuration à adopter pour les capteurs SAW. De nombreuses configurations ont été rapportées dans la littérature : lignes à retard, résonateurs, lignes à retard réfléchives, ... (Hashimoto 2000). Nous avons opté pour les lignes à retard, une structure qui permet de générer des ondes acoustiques par couplage piézoélectrique (White *et al.*, 1965). Elle est caractérisée par sa longueur d'onde λ , l'ouverture W et la distance centre à centre L_{cc} (Figure.1.5). Le retard, qui donne son nom à la ligne, est le temps τ mis par l'onde pour parcourir la distance L_{cc} .

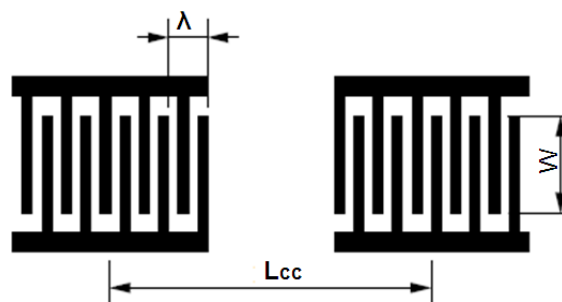
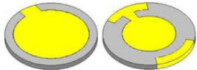
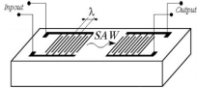
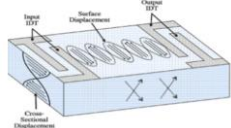
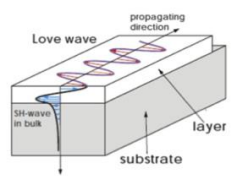


Figure.1.5. Représentation schématique d'une ligne à retard. λ est la longueur d'onde, W est l'ouverture, et L_{cc} est la distance centre à centre

Tableau 1.1. Exemples de capteurs à ondes acoustiques : paramètres clés, avantages et inconvénients.
Revu et adapté à partir de la revue de (Fu et al., 2017)

Type d'onde, transducteur	Représentation schématique	Fréquence de résonance f_0	Grandeurs métrologiques	Avantages	Inconvénients	Substrats/coupe cristalline
Onde de cisaillement dans le volume	<p>Les microbalances à quartz (QCM)</p> 	<p>De quelques KHz à quelques MHz</p> <p>Fréquence de résonance :</p> $f_0 = \frac{\vartheta}{2h_o}$ <p>ϑ: Vitesse de l'onde acoustique h_o : Epaisseur du disque de quartz</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité relative S_r dépendante de la charge massique • Formule de calcul de la sensibilité : $S_r = \frac{-2f_0}{\rho_p \vartheta}$ ρ_p : la densité piézoélectrique du matériau • Variation de la fréquence en fonction de la viscosité du milieu liquide (Kanazawa <i>et al.</i>, 1985) $\Delta f = -f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\eta_l \rho_l}{\pi \mu_c \rho_c}}$ μ_c et ρ_c : rigidité et densité du cristal η_l et ρ_l : densité et viscosité du liquide 	<ul style="list-style-type: none"> • Détection en milieux gaz et liquide • Utilisation simple • Facteur de qualité élevé • Technologie de « Laboratoire » • Coût modéré 	<ul style="list-style-type: none"> • Faible fréquence de fonctionnement \Rightarrow Faible sensibilité • Grande surface sensible difficile à réduire ($\approx 1\text{cm}^2$) \Rightarrow Quantités de produits importantes, notamment pour les étapes de fonctionnalisation 	ST-cut Quartz
Dispositifs SAW à base d'ondes de Rayleigh		<p>Fréquence de fonctionnement allant de quelques kHz à quelques MHz.</p> <p>Fréquence de fonctionnement :</p>	<p>Variation de la fréquence en fonction de la variation de masse accrochée à la surface :</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Faible consommation d'énergie • Coût relativement faible 	<p>Amortissement important des ondes dans un milieu liquide.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 41 YX cut LiNbO₃ • ST-cut Quartz • 128 Y-cut LiNbO₃

		$f_0 = \frac{v}{\lambda} = \frac{v}{4d}$ <p> v : vitesse de l'onde acoustique λ : périodicité des peignes d : largeur d'un doigt des peignes interdigités </p>	$\Delta f = k \frac{\Delta m f_0^2}{A}$ <p> k : constante caractéristique du dispositif Δm : variation de masse A : aire de la surface sensible </p>	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilité d'un contrôle sans fil 		<ul style="list-style-type: none"> • ZnO, AlN et PZT
SH-SAW		<p>Fréquence de fonctionnement allant de quelques centaines de MHz à quelques GHz</p> <p>Fréquence de fonctionnement :</p> $f_0 = \frac{v}{\lambda} = \frac{v}{4d}$ <p> v : vitesse de l'onde acoustique λ : périodicité des peignes d : largeur d'un doigt des peignes interdigités </p>	<p>Variation de la fréquence en fonction de la variation de masse accrochée à la surface :</p> $\Delta f = k \frac{\Delta m f_0^2}{A}$ <p> k : constante caractéristique du dispositif Δm : variation de masse A : aire de la surface sensible </p>	<ul style="list-style-type: none"> • Faible consommation d'énergie • Possibilité de mesures sans fil • Possibilité d'effectuer des mesures en milieux gaz et liquide 	<ul style="list-style-type: none"> • Deux types d'ondes peuvent se propager à la surface : les Leaky SAW et les Surface Skimming Bulk Waves • Une partie de l'énergie peut être perdue en volume 	<ul style="list-style-type: none"> • AT-cut-Quartz • 36 YX-cut LiNbO₃ • 64 YX-cut LiNbO₃
Ondes de Love		<p>Fréquence de fonctionnement :</p> $f_0 = \frac{v}{\lambda} = \frac{v}{4d}$ <p> v : vitesse de l'onde acoustique λ : périodicité des peignes d : largeur d'un doigt des peignes interdigités </p>	<p>Variation de la fréquence en fonction de la variation de masse accrochée à la surface :</p> $\Delta f = k \frac{\Delta m f_0^2}{A}$ <p> k : constante caractéristique du dispositif Δm : variation de masse A : aire de la surface sensible </p>	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilité la plus élevée parmi les capteurs SAW grâce à l'effet de guidage de l'onde acoustique • Possibilité d'effectuer des mesures en milieux gaz et liquide 	<ul style="list-style-type: none"> • Diminution rapide de la perte d'insertion avec l'augmentation de l'épaisseur du film de guidage • Nombre limité de matériaux pouvant être utilisés pour le guidage 	<ul style="list-style-type: none"> • 36 YX-cut LiTaO₃ • AT-cut- Quartz • 64 YX cut LiNbO₃

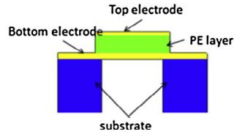
<p>Les FBAR</p>		<p>Fréquence de fonctionnement de l'ordre de quelques GHz :</p> $f_n = \frac{n(n+1)V}{2d}$ <p>n correspond aux différents modes de résonance</p>	<p>Variation de la fréquence (Dickherber <i>et al.</i>, 2008) :</p> $\Delta f = \frac{-2h_f f_u^2}{\sqrt{\rho_c \mu_c}} \left(\Delta \rho_f - \frac{\Delta \mu_f}{\vartheta_s^2} \right)$ <p>ϑ_s : la vitesse de l'onde acoustique de cisaillement, h_f : la hauteur du film immobilisé, μ_c et ρ_c : rigidité et densité du film. L'indice « u » désigne la condition de champ non perturbé et l'indice "f" désigne les propriétés relatives au film adjacent</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Dimensions (et volume) considérablement réduits • Très haute sensibilité • Possibilité d'utiliser la technologie CMOS standard pour la réalisation des dispositifs 	<ul style="list-style-type: none"> • Grand rapport bruit/signal • Difficulté de contrôle et de mesure du signal • Sensible à de nombreux paramètres d'influence • Membrane fragile 	<ul style="list-style-type: none"> • Si, Si₃N₄, et SiO₂ • ZnO et AlN
------------------------	---	--	--	--	--	---

Tableau 1.2. Principales propriétés des matériaux piézoélectriques les plus communs

Substrat		Vitesse de l'onde (m/s)	Coefficient de couplage K^2 (%)	Coefficient de dérive en température CTF (ppm/°C)	Avantages	Inconvénients
ST-X Quartz		3159	0,1 – 0,2	0	Pas de dérive en température	Faible valeur de K^2
LiNbO ₃	Y-Z LiNbO ₃	3487	4,80	94	- Fort couplage électromécanique - Faible niveau d'atténuation	- TCF élevée - Fragile
	128Y-X LiNbO ₃	3680 à 3990	5 – 11,3	75		
	64Y-X LiNbO ₃	4742	11,3	80		
	41Y-X LiNbO ₃	4792	17,2	50		
LiTaO ₃	Y-Z LiTaO ₃	3230	0,74	35	- Fort couplage électromécanique, - Bon compromis TCF/ K^2	Fragile
	36°Y-X LiTaO ₃	4160 à 4220	5	32		
	42°YX-LiTaO ₃	4022	7,6	40		
PZT		3900	20-35		- Fort coefficient de couplage - Forte constante piézoélectrique (d_{33})	- Gravure difficile - Nécessite une polarisation afin d'observer l'effet piézoélectrique
AlN		5800	3,1-8	-19 à -25	- Isolant électrique. - Possibilité d'utilisation à hautes températures. - Compatible avec la technologie CMOS - Peut être déposé sur des substrats non piézoélectriques	Faiblement piézoélectrique
ZnO		2720	1,5 à 1,7	-40 à -60	Bon couplage électromécanique	Conducteur à haute température
PVDF ²		2600	15	-	Flexible	Forte atténuation des ondes

² PVDF : Polyfluorure de vinylidène :

1.3.3. Réalisation technologique des dispositifs à ondes acoustiques de surface

Le capteur SH-SAW, objet de nos travaux, est présenté dans la Figures.1.6. a et b. Il s'agit d'une ligne à retard réalisée sur un substrat piézoélectrique en tantalate de lithium (LiTaO_3 36° rot), avec des peignes interdigités en Cr/Au (20 nm/80 nm) de périodicité $\lambda = 40 \mu\text{m}$, le chrome servant de couche d'accroche pour garantir l'homogénéité de la couche d'or. Les peignes interdigités sont formés de 30 paires de double doigts (largeur de chaque doigt = $5 \mu\text{m}$) avec un taux de métallisation de l'ordre de 50%.

Les deux systèmes d'électrodes (émetteur et récepteur) sont séparés par une zone sensible de 8 mm de long, métallisée avec 20 nm Cr/80 nm Au. Cette métallisation permet d'une part de favoriser la propagation d'un seul type d'onde de surface, les Leaky SAW (LSAW) au dépens des Surface Skimming Bulk Waves (SSBW) d'une part, et de favoriser les accrochages moléculaires d'autre part. La fréquence de fonctionnement, calculée à partir de la relation $f = v / \lambda$ (v étant la vitesse de l'onde acoustique et λ la périodicité des peignes) est de l'ordre de 104 MHz.

Les capteurs sont ensuite disposés dans un support métallique conçu spécialement pour assurer leur blindage ainsi que la robustesse mécanique du système (Figures.1.6. c et d).

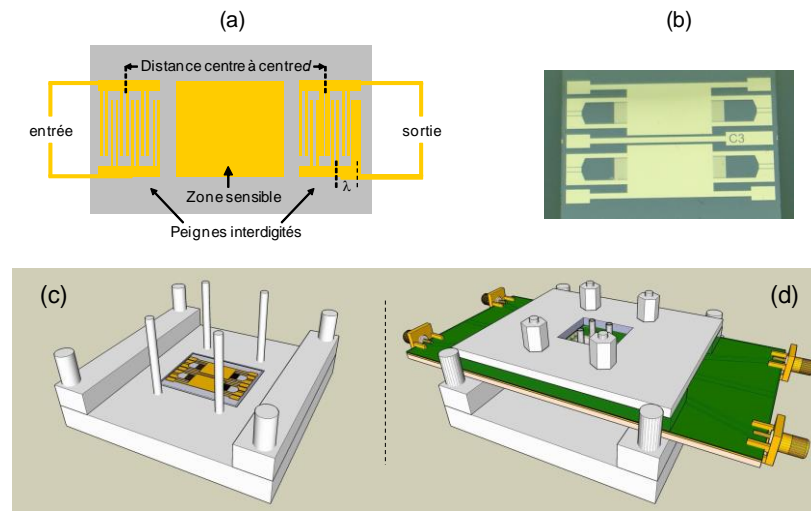


Figure.1.6. (a) Représentation schématique de la ligne à retard). (b) photographie d'une puce avec deux capteurs ; (c) base du support mécanique avec emplacement du capteur ; (d) système d'intégration complet du capteur avec un circuit imprimé doté de pointes de contact pour déporter les entrées et les sorties de chaque voie

Différents paramètres physiques peuvent influencer la réponse d'un capteur gravimétrique. Le paramètre d'intérêt est bien évidemment la variation de masse m , mais le capteur peut être sensible à différents autres paramètres d'influence dont : la variation de la viscosité η ; de la conductivité σ , de la force ionique I , de la température T ou de la pression P . L'équation 1.1 traduit la dépendance du signal de sortie S du capteur (amplitude A et phase électrique ϕ) à ces différents paramètres :

$$\Delta\Phi, A = \left(\frac{\partial\Phi, A}{\partial m} \right) \cdot \Delta m + \left(\frac{\partial\Phi, A}{\partial \sigma} \right) \cdot \Delta \sigma + \left(\frac{\partial\Phi, A}{\partial I} \right) \cdot \Delta I + \left(\frac{\partial\Phi, A}{\partial \eta} \right) \cdot \Delta \eta + \left(\frac{\partial\Phi, A}{\partial T} \right) \cdot \Delta T + \left(\frac{\partial\Phi, A}{\partial P} \right) \cdot \Delta P \quad (\text{eq. 1.1})$$

Plusieurs solutions ont été adoptées pour s'affranchir de ces paramètres d'influence. La première a consisté à métalliser la zone centrale du capteur afin d'éliminer les effets de la force ionique et de la conductivité (Kondoh *et al.*, 1996). La seconde a consisté à réaliser des puces à double lignes à retard (Figure 1.6b) permettant d'effectuer des mesures en mode différentiel, et ainsi d'éliminer les effets de la température, de la pression et de la viscosité. Signalons finalement que la zone centrale du capteur a été reliée à la masse par une électrode de contact, ce qui permet de minimiser le couplage direct entre les différents systèmes de peignes interdigités.

Nous avons réalisé nos capteurs SAW par les techniques classiques de photolithographie, dont les étapes technologiques sont détaillées ci-après :

- Nettoyage des substrats en tantalate avec l'acétone et l'alcool isopropylique puis rinçage à l'eau désionisée. Les wafers sont ensuite séchés sous azote, puis mis dans une étuve à 120°C pendant 30 minutes pour déshydrater leurs surfaces.
- Dépôt de résine photosensible par spin-coating.
- La plaquette de tantalate est ensuite posée, pendant 1 min à 90°C, sur une plaque chauffante pour évaporer les solvants contenus dans la résine et permettre sa pré-polymérisation.
- Insolation de la résine par rayonnements UV via en un masque photolithographique, pour déclencher la réticulation, puis recuit à 110°C pendant 45 s afin de permettre la réticulation de la résine insolée.
- Inversion de la résine par insolation sans masque pendant 20 s.
- La dernière étape dans le process de photolithographie est le développement de la résine, qui permet de révéler les zones à métalliser.

Les dépôts métalliques de la couche d'accrochage en chrome (20 nm) et de la couche d'or (80 nm) ont été réalisés par pulvérisation cathodique. Le lift-off permet à la fin de dégager les zones encore enrésinées qui n'interviennent pas dans le design du SAW (Achour *et al.*, 2020, Bergaoui *et al.*, 2011). Les différentes étapes technologiques décrite précédemment, sont représentées schématiquement sur la Figure. 1.7.

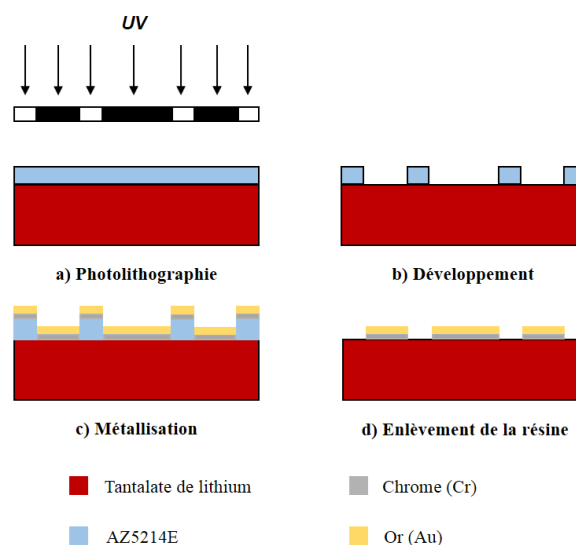


Figure.1.7. Schéma représentatif des différentes étapes technologiques utilisées lors de la fabrication des capteurs SAW (AZ5214E est la résine utilisée lors de l'étape de photolithographie).

1.3.4. Les chaînes de mesure

1.3.4.1. L'analyseur de réseaux

L'analyseur de réseaux est l'outil principal de mesure en hautes fréquences. Il permet de mesurer les ondes transmises et réfléchies et d'accéder directement aux paramètres S qui décrivent le comportement électrique de réseaux linéaires en fonction des signaux d'entrée. Dans notre cas, nous avons utilisé l'analyseur de réseaux (Figure.1.8) pour le contrôle préalable de la qualité des capteurs SAW avant et après les étapes de fonctionnalisation.

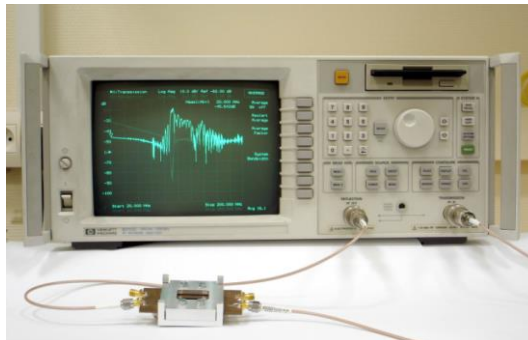


Figure.1.8. Caractérisation électrique d'un dispositif SAW : mesure de la perte d'insertion en fonction de la fréquence

Un exemple de réponse fréquentielle (paramètre S21 en module et en phase) d'un capteur SAW est illustré par la Figure.1.9. En plus des ondes de surface (vers 104 MHz), on remarque la présence des ondes de volume (vers 115 MHz et 140 MHz), mais avec une moindre amplitude.

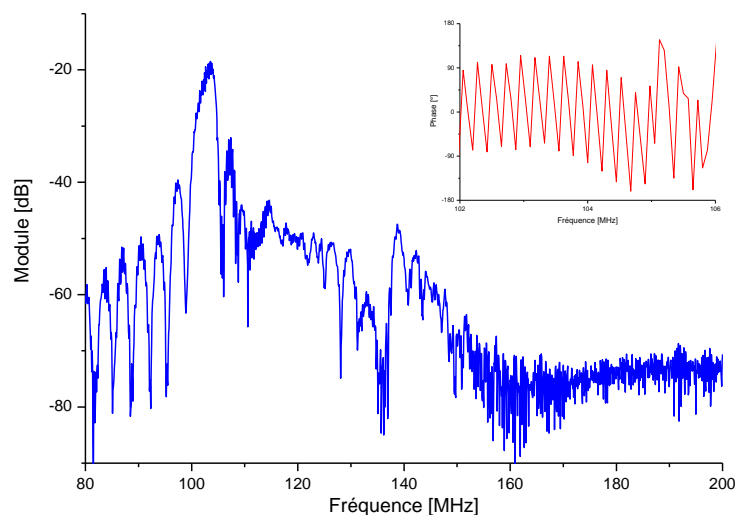


Figure.1.9. Spectre S21 du capteur SAW. Variations du module (entre 80 et 200 MHz) et de la phase autour de la fréquence caractéristique du SAW (104 MHz).

La qualité de la réponse obtenue a été améliorée, au fur et à mesure de nos travaux, en ayant recours à une coupe en biseau du substrat (pour atténuer les réflexions des ondes de surface sur les bords) et en ajoutant des absorbants acoustiques sur la face arrière pour diminuer les réflexions des ondes de volume.

1.3.4.2. Montage double oscillateurs

Ce montage est constitué de deux oscillateurs indépendants suivis d'un mélangeur et d'un filtre passe bas (Figure.1.10). Chaque ligne à retard est placée dans la boucle de contre réaction d'un amplificateur HF (à contrôle automatique de gain), qui assure la compensation des pertes d'insertion et entretient ainsi les oscillations du dispositif. Ce sont donc les variations temporelles de la fréquence, pour un point équiphase, qui sont suivies lors des réactions de reconnaissance moléculaire.

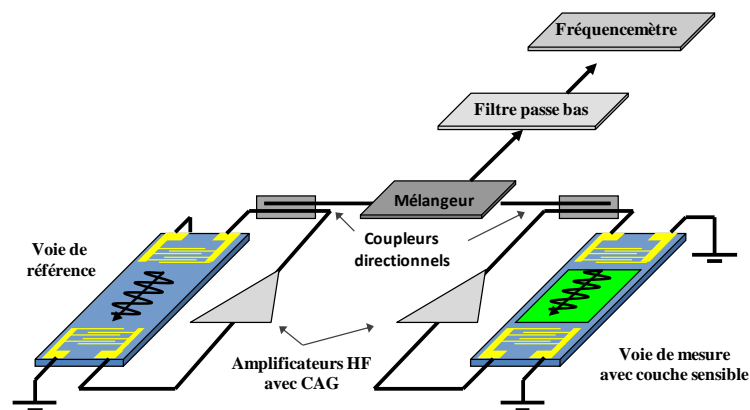


Figure.1.10. Représentation schématique de la chaîne de mesure en mode oscillateur

1.3.4.3. Montage impulsionnel

Dans le cas du montage impulsionnel (Figure.1.11), c'est la fréquence qui est maintenue constante, et le suivi des réactions se fait via les variations de la phase et/ou l'amplitude du signal de sortie du capteur.

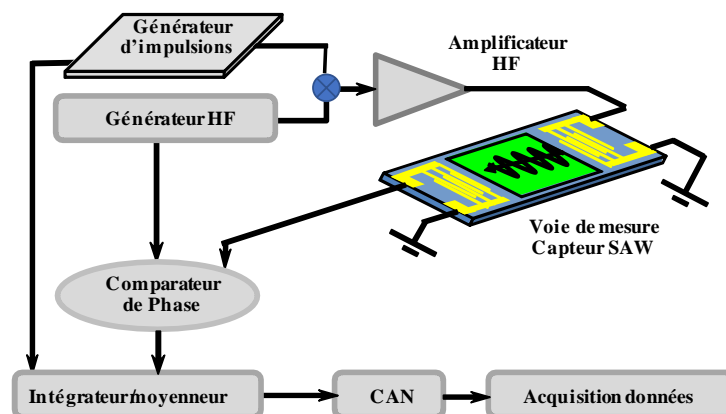


Figure.1.11. Représentation schématique de la chaîne de détection en mode impulsionnel (le même circuit alimente également la seconde voie du capteur).

Pour cette électronique de mesure, le signal HF, délivré par un générateur, est modulé, via un amplificateur HF, par les signaux rectangulaires issus d'un générateur d'impulsions, avant d'être appliqué au capteur SAW (la fréquence des impulsions est de 10 kHz et leur durée est ajustée entre 1,5 et 2 μ s). A la sortie du capteur, le signal est injecté au niveau d'un comparateur, qui en estimera les variations de phase et d'amplitude par comparaison au signal HF. Un intégrateur moyennneur, synchronisé sur le générateur d'impulsions, permettra de sélectionner le signal utile (selon son retard) et d'en envoyer la moyenne intégrée (sur une durée fixe) à un convertisseur analogique numérique. Notons que l'une des difficultés, que l'on peut rencontrer dans le cas des capteurs SAW, concerne l'existence de signaux parasites difficiles à supprimer. Un des plus importants est l'écho de triple transit, résultant des réflexions successives des ondes acoustiques par les électrodes de sortie puis d'entrée. Ce signal est à l'origine des oscillations dans la bande passante (autour de la fréquence centrale de 104 MHz), dont la réduction se fait généralement au détriment de la perte d'insertion. Pour notre part, nous avons opté pour un circuit d'adaptation composé d'une inductance et d'une capacité variables, à l'entrée et à la sortie du SAW pour en annuler l'effet capacitif, et réaliser de la sorte le meilleur compromis entre la perte d'insertion et l'amplitude du triple transit. Comme ce signal parcourt trois fois la zone sensible, il présente un retard de 3τ (τ étant le retard associé au trajet direct de l'onde principale). Il est donc possible de s'en affranchir au moyen d'un filtrage temporel, comme c'est le cas pour le montage impulsionnel.

1.3.5. Système fluide associé au biocapteur

Nous avons donc utilisé un montage fluide constitué d'une cuve en Kalrez (un polymère perfluoré biocompatible) de 1 mm d'épaisseur et d'une plaque en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) supportant les tubulures en téflon et permettant de fixer l'ensemble sur le capteur SAW. Les tuyaux en téflon sont reliés à une pompe péristaltique permettant d'amener les différentes solutions au contact de la zone sensible du capteur (Figure.1.12).

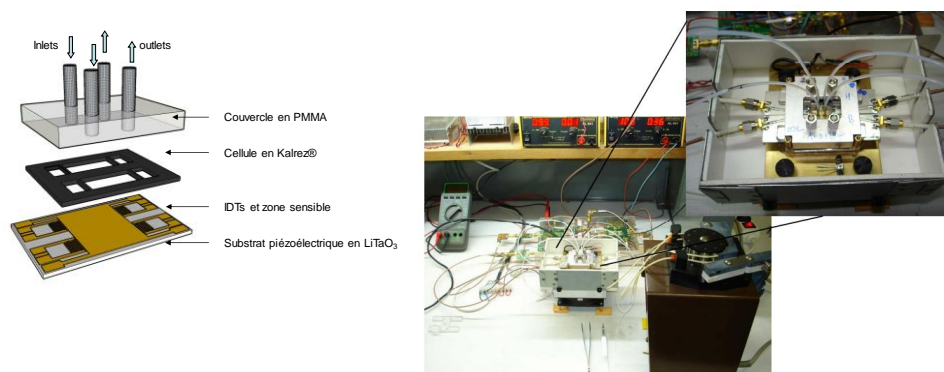


Figure.1.12. Vue d'ensemble des différentes parties du système d'intégration du capteur avec le support mécanique et le circuit fluide.

Un couvercle métallique permet d'assurer l'assemblage des différentes parties de la cellule de mesure (le support métallique, le circuit imprimé et le montage fluide). Cette dernière est ensuite placée sur un élément Pelletier, permettant de fixer la température, et l'ensemble est disposé dans un boîtier métallique assurant un blindage électromagnétique.

1.4. Le capteur électrochimique-gravimétrique E-SAW

La possible corrélation des deux modes de transductions, électrochimique et gravimétriques à ondes acoustiques de surface, nous a semblé une évidence voire une nécessité dès 2010, quand le besoin de redondance et/ou de complémentarité devient primordial. La mise au point d'un capteur SAW électrochimique (E-SAW) et sa caractérisation ont alors été entreprises, avant d'utiliser effectivement le dispositif obtenu dans des applications environnementales (Lattach *et al.*, 2012, Lattach *et al.*, 2011). Si cela a été une première pour un E-SAW, des études antérieures avaient déjà rapporté l'utilisation d'une microbalance électrochimique à quartz (EQCM) pour étudier les performances de films polymères à empreintes moléculaires (MIP pour "molecularly imprinted polymer") (Deore *et al.*, 2000, Kong *et al.*, 2010, Öpik *et al.*, 2009). Les phénomènes d'intérêt étant majoritairement de surface, nous avons considéré qu'une meilleure sensibilité serait attendue avec des dispositifs E-SAW, dont une représentation schématique est présentée dans la Figure.1.13.

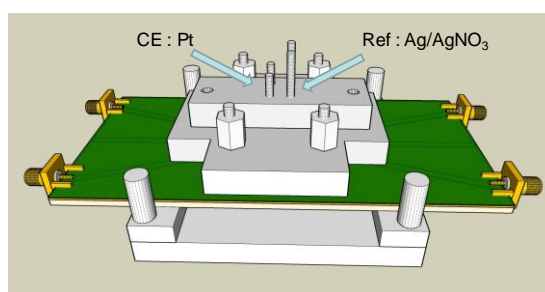


Figure.1.13. Représentation schématique du E-SAW
où la surface sensible du capteur SAW constitue l'électrode de travail

En considérant la surface sensible d'un capteur SAW comme substrat, un polymère conducteur a été électro-synthétisé par chronoampérométrie, sous un potentiel constant de 1.45 V vs. Ag/AgNO₃ pendant 30 s. Le suivi de la polymérisation du film a été réalisé par voie gravimétrique, puis vérifié par voie électrochimique (Figure.1.14). Les voltammogrammes cycliques ont été enregistrés avant et après électropolymérisation du polymère conducteur, avec une vitesse de 100 mV/s.

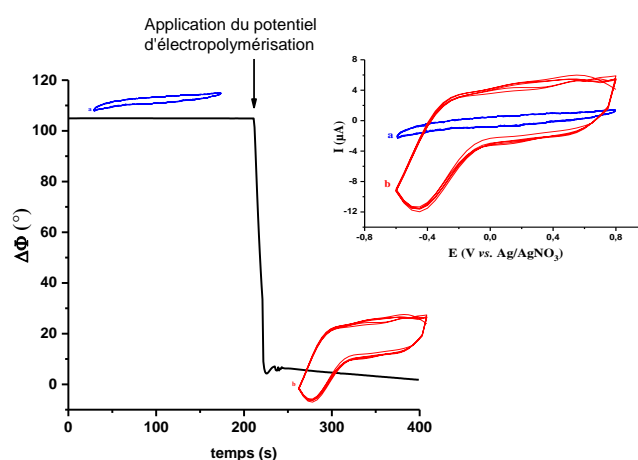


Figure.1.14. Suivi gravimétrique de l'électrosynthèse d'un film conducteur sur la zone sensible du capteur SAW
et comparaison entre les voltammogrammes réalisés (a) avant et (b) après la formation du film.

Les voltammogrammes ont été réalisés dans une solution 0.1 M de LiClO₄/ACN à un taux de balayage de 100 mV/s

La variation de phase en fonction du temps montre que la polymérisation commence immédiatement après l'application du potentiel et que la formation du polymère conducteur provoque un déphasage d'environ 105 degrés.

1.5. Corrélation des processus gravimétrique et électrochimique

En voltampérométrie cyclique (CV) typique, les variations de potentiel en fonction du temps induisent une réduction/oxydation de la couche électro-active, qui peut être liée au processus de dopage et de dédopage du polymère conducteur. Ces phénomènes ayant lieu à la surface du capteur, ils sont donc nécessairement vus également d'un point de vue gravimétrique, comme le montrent les résultats rassemblés sur la Figure.1.15.

Outre la corrélation évidente entre les variations de phase et de tension à différentes vitesses de balayage, on remarque que l'amplitude des oscillations de la phase diminue avec l'augmentation des taux de balayage. Ceci trouve son explication en considérant l'épaisseur de la couche de diffusion qui se forme près de la surface du polymère conducteur et qui dépend de la vitesse de balayage de tension utilisée. En effet, pour de faibles vitesses de balayages, la couche de diffusion a tendance à s'éloigner davantage que lors d'un balayage rapide, avec pour conséquence une plus grande épaisseur et donc une "masse apparente" plus élevée. La polarisation du système ESAW-électrolyte entraîne la formation d'un "gradient de concentration électrogénéré" dans l'électrolyte (à proximité de la zone de détection du ESAW).

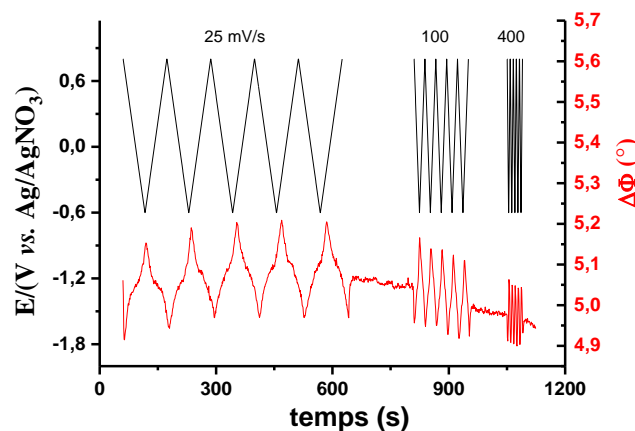


Figure.1.15. Variations de la tension et de la phase en fonction du temps, à différentes vitesses de balayage (25 mV/s ; 100 mV/s et 400 mV/s)

Ce concept est similaire à la couche de diffusion introduite pour la première fois par Nernst en 1904 comme modèle pour expliquer les effets dépendants du temps du flux de courant à travers une électrode (dans notre cas, le ESAW). Le dopage P ou l'injection de charges positives dans les chaînes de polymères conducteurs lors de l'oxydation est compensé par la diffusion d'anions, tandis que le processus de dédopage implique le flux du solvant à côté de la migration des contre-anions (El Sana *et al.*, 2004, Hillman *et al.*, 2007). Le processus de dopage/dédopage implique donc des flux de

contre-anions et de solvant, entre les chaînes macromoléculaires conductrices du polymère et l'électrolyte (région proche du film).

Dans notre cas, lorsque le potentiel appliqué diminue, les contre-anions perchlorate sont libérés des chaînes macromoléculaires, produisant un dédopage des films polymères conducteurs. Au contraire, si le potentiel augmente, les contre-anions sont insérés à proximité des chaînes polymères, induisant par conséquent un dopage des polymères conducteurs. D'un point de vue gravimétrique, le dopage d'un film est donc équivalent à une "augmentation de masse", tandis que le dédopage serait comparable à une "diminution de masse". Cet aspect est simplifié en considérant la variation de "l'épaisseur apparente" comme un paramètre représentatif de la variation de masse. La réponse ESAW en configuration (CV) est présentée sur la Figure.1.16 montrant la variation de la phase ainsi que le transfert de charge en fonction du potentiel appliqué.

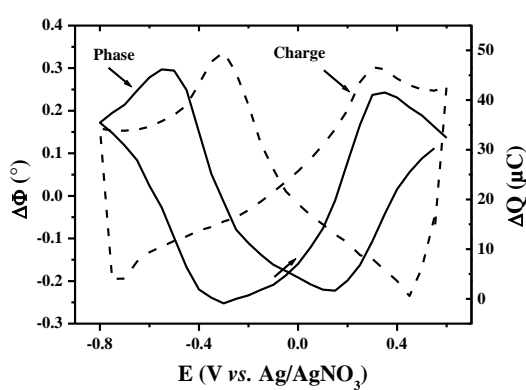


Figure.1.16. Variations de phase et de charge en fonction du potentiel appliqué lors d'acquisitions par voltammétrie cyclique à une vitesse de balayage de 100 mV s⁻¹ dans du LiClO₄/ACN 0.1 M

Ceci montre la relation entre les deux paramètres impliqués dans les transductions gravimétrique et électrochimique. Le même comportement a été enregistré pour différents taux de balayage de tension, montrant là aussi une augmentation de l'amplitude des variations de phase avec la diminution du taux de balayage, en accord avec le concept "d'épaisseur apparente". Les résultats issus de ces mesures corrélées sont rassemblés dans le Tableau 1.3.

Tableau 1.3. Quelques paramètres expérimentaux calculés à partir de la réponse ESAW pour le polymère conducteur pendant des mesures CV à différentes vitesses de balayage.

Vitesse de balayage (mV s ⁻¹)	25	100	400
Durée de la rampe time (s)	56	14	3.5
$\Delta\Phi$ (°)	0.92 ± 0.10	0.52 ± 0.03	0.34 ± 0.02
ΔQ (mC cm ⁻²)	1.96	1.11	0.72
Variation de l'épaisseur apparente (nm)	18.8	10.6	6.9
Variation relative de la masse apparente (%)	1.02	0.58	0.38

Notons la remarquable corrélation entre les variations de la phase et celles de la charge avec un coefficient moyen de proportionnalité de $2,128 \text{ mC.cm}^{-2}/^\circ$. Ceci montre qu'une combinaison des transductions électrochimique et gravimétrique est possible, conduisant à une méthode d'investigation puissante qui devrait 1) améliorer la détection des cibles et par conséquent la fiabilité de la réponse du capteur, et 2) fournir une meilleure connaissance des paramètres cinétiques et/ou thermodynamiques qui contrôlent les processus de reconnaissance.

1.6. Synthèse

Ce premier chapitre a permis de situer le contexte lié aux capteurs chimiques et biologiques et de présenter les différents transducteurs qui seront utilisés dans le cadre de nos travaux de recherche.

Nous avons fait le choix d'utiliser les transductions gravimétrique et électrochimique pour développer et réaliser des capteurs chimiques (chapitre 2) et des biocapteurs (chapitre 3).

Les techniques de fonctionnalisation des surfaces des capteurs n'ont pas été présentées de façon générale dans ce chapitre. Nous avons en effet préféré les introduire dans le contexte de chacune des applications présentées dans ce rapport.

Références

- Achour B, Attia G, Zerrouki C, Fourati N, Raoof K, Yaakoubi N. Simulation/Experiment Confrontation, an Efficient Approach for Sensitive SAW Sensors Design. *Sensors*. 2020;20(17):4994.
- Aoki K, Tezuka Y. Chronoamperometric response to potentiostatic doping at polypyrrole-coated microdisk electrodes. *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*. 1989;267(1-2):55-66.
- Bergaoui Y, Abdelghani A, Fourati N, Zerrouki C, Fournion JM. Conception and realization of lithium based surface acoustic wave sensor for selective antigens-antibodies recognition. *Instrumentation measure metrologie*. 2011;11(3-4):45-65.
- Bertok T, Lorencova L, Chocholova E, Jane E, Vikartovska A, Kasak P, et al. Electrochemical impedance spectroscopy based biosensors: Mechanistic principles, analytical examples and challenges towards commercialization for assays of protein cancer biomarkers. 2019.
- Deore B, Chen Z, Nagaoka T. Potential-induced enantioselective uptake of amino acid into molecularly imprinted overoxidized polypyrrole. *Analytical chemistry*. 2000;72(17):3989-94.
- Dickherber A, Corso CD, Hunt WD. Optimization and characterization of a ZnO biosensor array. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2008;144(1):7-12.
- El Sana S, Gabrielli C, Perrot H. Rate limiting steps of charge transfer at conducting polymers. *Russian Journal of Electrochemistry*. 2004;40(3):267-72.
- Fu YQ, Luo J, Nguyen N-T, Walton A, Flewitt AJ, Zu X-T, et al. Advances in piezoelectric thin films for acoustic biosensors, acoustofluidics and lab-on-chip applications. *Progress in Materials Science*. 2017;89:31-91.
- Gabrielli C. Mesures d'impédances. *Techniques de l'ingénieur Analyse et caractérisation*. 1994;3(P2210):P2210. 1-P. 18.
- García-Jareño J, Sanmatías A, Navarro-Laboulais J, Vicente F. Chronoamperometry of prussian blue films on ITO electrodes: ohmic drop and film thickness effect. *Electrochimica acta*. 1999;44(26):4753-62.
- Ghanam A, Mohammadi H, Amine A, Haddour N, Buret F. *Chemical Sensors: Electrochemical Sensors; Voltammetry/Amperometry. Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands. 2021.
- Gray LG, Appleman BR. EIS: electrochemical impedance spectroscopy. *Journal of protective coatings & linings*. 2003;20(2).
- Hashimoto K-y. *Surface Acoustic Wave Devices in Telecommunications* 2000.
- Heinze J. Cyclic voltammetry—"electrochemical spectroscopy". *New analytical methods* (25). *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1984;23(11):831-47.
- Hillman AR, Daisley SJ, Bruckenstein S. Kinetics and mechanism of the electrochemical p-doping of PEDOT. *Electrochemistry communications*. 2007;9(6):1316-22.

Hughes C, McCann RM, Freeland B, Brabazon D. Electrochemical and chronoamperometry assessment of nano-gold sensor surfaces produced via novel laser fabrication methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2021;880:114813.

Kanazawa KK, Gordon JG. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Analytical Chemistry*. 1985;57(8):1770-1.

Kondoh J, Saito K, Shiokawa S, Suzuki H. Simultaneous measurements of liquid properties using multichannel shear horizontal surface acoustic wave microsensor. *Japanese journal of applied physics*. 1996;35(5S):3093.

Kong Y, Zhao W, Yao S, Xu J, Wang W, Chen Z. Molecularly imprinted polypyrrole prepared by electrodeposition for the selective recognition of tryptophan enantiomers. *Journal of applied polymer science*. 2010;115(4):1952-7.

Lattach Y, Fourati N, Zerrouki C, Fournion J-M, Garnier F, Pernelle C, et al. Molecularly imprinted surface acoustic wave sensors: The synergy of electrochemical and gravimetric transductions in chemical recognition processes. *Electrochimica Acta*. 2012;73:36-44.

Lattach Y, Fourati N, Zerrouki C, Fournion J, Garnier F, Remita S. Surface acoustic wave sensor combining gravimetric and electrochemical transductions: application for atrazine detection. *Sensor Letters*. 2011;9(6):2249-52.

Mann MA, Helfrick Jr JC, Bottomley LA. Diagnostic Criteria for the Characterization of Quasireversible Electron Transfer Reactions by Cyclic Square Wave Voltammetry. *Analytical chemistry*. 2014;86(16):8183-91.

Maouche N, Guergouri M, Gam-Derouich S, Jouini M, Nessark B, Chehimi MM. Molecularly imprinted polypyrrole films: Some key parameters for electrochemical picomolar detection of dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2012;685:21-7.

Massah J, Vakilian KA. An intelligent portable biosensor for fast and accurate nitrate determination using cyclic voltammetry. *Biosystems Engineering*. 2019;177:49-58.

Mirceski V, Gulaboski R. Recent achievements in square-wave voltammetry (a review). *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2014;33(1):1-12.

Nemeir IA, Mouawad L, Saab J, Hleihel W, Errachid A, Zine N, editors. *Electrochemical Impedance Spectroscopy Characterization of Label-Free Biosensors for the Detection of HER2 in Saliva*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings; 2020.

Nicholson RS. Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics. *Analytical chemistry*. 1965;37(11):1351-5.

Öpik A, Menaker A, Reut J, Syritski V. Molecularly imprinted polymers: a new approach to the preparation of functional materials. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*. 2009;58(1).

Rassas I, Braiek M, Bonhomme A, Bessueille F, Rafin G, Majdoub H, et al. Voltammetric glucose biosensor based on glucose oxidase encapsulation in a chitosan-kappa-carrageenan polyelectrolyte complex. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;95:152-9.

Semenova D, Zubov A, Silina YE, Micheli L, Koch M, Fernandes AC, et al. Mechanistic modeling of cyclic voltammetry: A helpful tool for understanding biosensor principles and supporting design optimization. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;259:945-55.

White RM, Voltmer FW. Direct piezoelectric coupling to surface elastic waves. *Applied physics letters*. 1965;7(12):314-6.

Chapitre 2 :

**Capteurs chimiques pour
des applications environnementales**

2.1. Avant-propos

Dans le premier chapitre, nous avons fait le choix de ne pas présenter les différentes techniques de fonctionnalisation des capteurs et de mettre l'accent sur les techniques de transduction. Nous en présenterons quelques-unes dans ce chapitre dédié à la détection d'espèces chimiques.

Les performances des capteurs électrochimiques et/ou gravimétriques ont été systématiquement évaluées en termes de sensibilité, sélectivité, limite de détection, temps de réponse, et gamme de réponse dynamique et les résultats expérimentaux ont été quasi systématiquement confrontés à ceux obtenus par calcul théorique via la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT, pour Density Functional Theory)

2.2. Détection de pesticides

Les pesticides ont été créés à l'origine pour protéger les cultures végétales de toutes sortes de parasites pouvant nuire aux rendements agricoles. S'ils remplissent bien leurs rôles, ce n'est toutefois pas sans conséquence pour l'environnement. Leur faible dégradation amène à leur persistance dans les sols des années après leur utilisation. De plus, ils se répandent largement et bien au-delà des seules zones traitées, notamment par les eaux de pluie. Ce qui a pour conséquence leur accumulation le long de la chaîne alimentaire avec des effets à long terme sur l'ensemble de l'écosystème³. Il convient donc de continuer à surveiller la qualité des sols et des eaux, et ce même des années après l'interdiction d'utilisation des pesticides, en développant des outils analytiques fiables comme les capteurs chimiques.

2.2.1. L'atrazine

L'atrazine (ATZ) est un herbicide qui a été largement utilisé en agriculture intensive depuis les années 1960. Sa faible adsorption aux particules du sol se traduit par un fort potentiel de contamination des eaux souterraines et de surface (Santé Canada, 1993). De plus, ce risque est accentué du fait de la longue demi-vie de cet herbicide dans le sol (40 jours environ) et dans les eaux souterraines (jusqu'à 200 jours)⁴. Ce qui explique qu'en dépit de son interdiction en France en 2003, il fait encore partie des pesticides retrouvés dans les cours d'eau français. Une cartographie réalisée en 2015 plaçait l'atrazine comme la molécule la plus détectée parmi les pesticides retrouvés dans les eaux de surface en France (rivières, ruisseaux, plans d'eau)⁵.

Au-delà de l'intérêt écologique de détecter cette molécule, nous l'avons considérée comme analyte modèle pour montrer la synergie des transductions gravimétrique et électrochimique.

2.2.1.1. Procédure de fonctionnalisation adoptée

Parmi les différentes techniques de fonctionnalisation des surfaces que nous avons expérimentées et pour lesquelles nous avons acquis une certaine expertise, la plus importante est celle basée sur l'impression moléculaire et/ou ionique. Le principe de base repose sur la réalisation d'une matrice polymère possédant des empreintes complémentaires aux entités (template) que l'on désire détecter, en forme, en taille et en groupements chimiques fonctionnels (Figure.2.1). L'impression moléculaire

³ <https://www.equiterre.org/solution/les-pesticides-quest-ce-que-cest> (consulté le 13/05/2021)

⁴ <https://www.inspq.qc.ca/eau-potable/atrazine> (consulté le 14/05/2021)

⁵ <https://www.lanouvellerepublique.fr/deux-sevres/l-atrazine-en-tete-des-molecules-retrouvees-dans-nos-rivieres> (article mis à jour le 30/01/2020, consulté le 15/05/2021)

implique généralement les étapes suivantes : i) un arrangement préalable des monomères fonctionnels, et éventuellement des agents de réticulation et du photo-initiateur, autour du template, ii) la polymérisation du précomplexe résultant, et iii) l'élimination du template de la matrice polymérique par le biais d'un agent extracteur. Les cavités ainsi créées agissent alors comme des récepteurs hautement spécifiques qui sont complémentaires des modèles en termes de taille, de forme et de disposition des groupes fonctionnels (Alvarez-Lorenzo 2013, Chen *et al.*, 2016, Haupt 2012, Ye 2013). D'autres éléments sur les différentes étapes et conditions de réalisation d'un MIP seront présentés dans le chapitre 3.

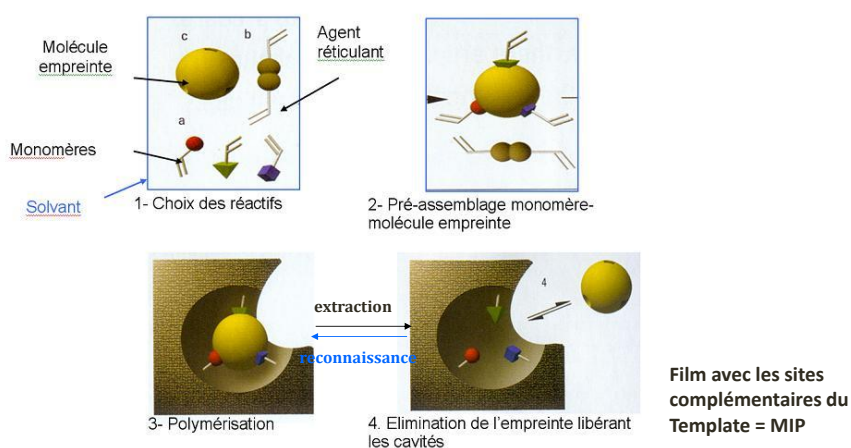


Figure.2.1. Représentation schématique d'un polymère à empreintes moléculaires (MIP)

L'impression moléculaire repose donc principalement sur l'interaction entre un monomère fonctionnel et la molécule d'intérêt. Cette interaction nécessite le plus souvent un certain temps d'incubation dans des conditions contrôlées qu'il convient d'optimiser à chaque fois que l'on change de monomère ou d'analyte. Cette période d'incubation est suivie par l'étape de polymérisation qui peut être amorcée de différentes manières, photochimique, électrochimique, catalytique... Dans notre cas, nous avons opté pour l'électro-polymérisation, aidés en cela par le fait que les surfaces sensibles de nos capteurs, gravimétriques comme électrochimiques, étaient parfaitement conductrices, généralement en or. Les optimisations ne concernent pas uniquement les phases de réalisation des MIP, mais aussi celles de l'extraction de l'analyte, dont l'efficacité doit être associée à la non-altération de la matrice polymère, laissant intactes les empreintes précédemment formées. Nous avons réalisé plusieurs types de capteurs fonctionnalisés avec des polymères à empreintes moléculaires, et nos différentes investigations nous ont permis d'acquérir une certaine expertise dans ce domaine.

Pour cette application, détection de l'atrazine, nous avons opté pour une fonctionnalisation des zones sensibles de nos capteurs avec des polymères à empreintes moléculaires. Les études d'optimisation (nature du monomère fonctionnel et du réticulant, technique d'électro-polymérisation, temps d'incubation, ...) ont été conduites par voie électrochimique, les tests de détection et de sélectivité ont été réalisés par voies électrochimique et gravimétrique. Pour ces deux modes de transduction, la surface sensible était la même, celle du capteur E-SAW. Celle-ci a été systématiquement nettoyée

avec une solution piranha (98% H_2SO_4 / 30% H_2O_2 1:1 v/v) pendant 30 minutes puis copieusement rincée à l'eau ultrapure. Le MIP a été préparé selon la procédure optimisée suivante : dans 1,5 mL d'acétonitrile ont été dissouts 30 mM de thiophène 3-acide acétique (AAT) et 15 mM d'atrazine (ATZ) en présence de perchlorate de lithium (LiClO_4) comme sel de fond. Après 10 minutes, le temps optimisé de pré-complexation, nous avons ajouté 7.5 mM de 3,4-éthylènedioxythiophène (EDOT) puis réalisé l'électro-polymérisation directement sur la zone de détection du E-SAW (Lattach *et al.*, 2012). L'extraction du template (ATZ) a été ensuite réalisée à l'aide d'un solvant polaire protique méthanol/acide acétique, qui permet de rompre les liaisons hydrogènes reliant l'ATZ à l'AAT, tout en laissant des cavités fonctionnalisées complémentaires des molécules cibles.

2.2.1.2. Détection gravimétrique et électrochimique de l'atrazine

Les propriétés de transduction et de détection du MIP dépendent des cavités fonctionnalisées formées dans la masse du film après extraction des molécules d'atrazine. Un suivi des changements se produisant à la surface des capteurs peut être réalisé par gravimétrie et par électrochimie (Figure.2.2.). Nous sommes ainsi capables de quantifier la variation de phase, image de la variation de la quantité de matière, pendant les phases d'extraction ou de détection. Parallèlement, d'un point de vue électrochimique ces phénomènes peuvent être reliés à la quantité de charge qui traduit une modification de la conductivité du film tel que l'indiquent les différents voltammogrammes réalisés.

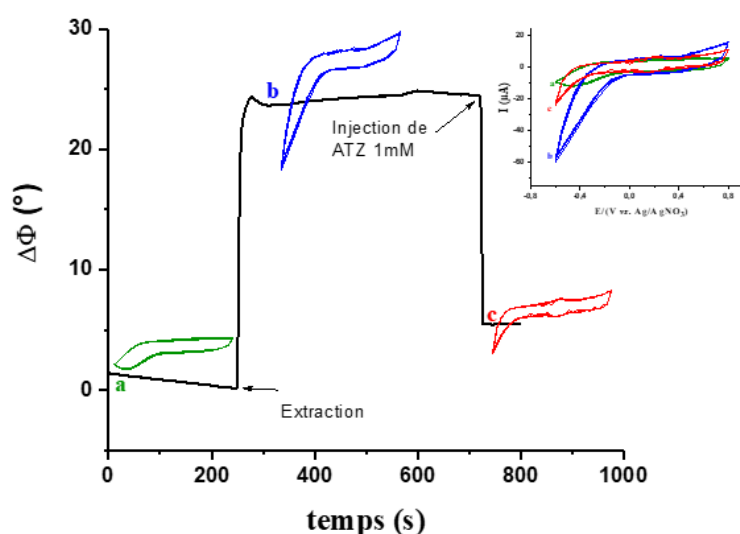


Figure.2.2. Suivi gravimétrique de l'extraction de l'atrazine du MIP (a→b), puis de sa reconnaissance par les cavités formées dans la matrice polymérique (b→c). L'encart correspond aux voltammogrammes du MIP (réalisés dans LiClO_4 0.1 M - ACN à une vitesse de balayage de 100 mV/s) de (a) juste après l'électro-synthétise, (b) après extraction de l'atrazine, et (c) après injection de 1 mM d'atrazine.

Si cette étude illustre parfaitement l'aptitude des deux modes de transduction à décrire la détection comme l'extraction de l'atrazine et leur corrélation via les processus de dopage/dédopage, elle montre surtout l'intérêt de la gravimétrie dans le suivi temporel des changements à la surface des capteurs. Nous avons ainsi montré que dans nos conditions opératoires, une durée de 2 minutes était suffisante aussi bien pour l'extraction que la détection de l'atrazine, là où d'autres études faisaient état de près

de 2 heures pour son extraction et de plus de 10 minutes pour sa détection (Alexander *et al.*, 2006, Shoji *et al.*, 2003).

2.2.2. Les organophosphorés

Les pesticides organophosphorés (OP) sont parmi les insecticides les plus largement utilisés à l'heure actuelle. Bien qu'ils soient considérés comme plus sûrs que les organohalogénés, ils restent cependant très neurotoxiques pour l'homme (Lotti *et al.*, 1978). En effet, les dérivés des OP présentent des similitudes structurelles avec les gaz neurotoxiques et inhibent l'action de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), qui intervient dans la transmission de l'influx nerveux à travers les synapses. Cette suppression de l'activité de l'AChE par les composés OPs peut entraîner des dysfonctionnements respiratoires, voire la mort (Istamboulie *et al.*, 2007, Istamboulie *et al.*, 2009, Rhouati *et al.*, 2010).

Pour la détection des OPs, nous avons opté pour une voie différente de celle de l'empreinte moléculaire : dépôt de phthalocyanines (PC) métallées avec du nickel, NiPC (Figure.2.3).

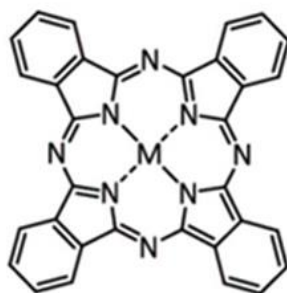


Figure.2.3. Structure d'une molécule de PC métallée

Ce choix des PC métallées était basé sur différentes études qui avaient montré l'aptitude de ces molécules, selon leurs ions métalliques et leurs substituants fonctionnels qui peuvent être modifiés à souhait, à cibler plusieurs analytes. Basova *et al* ont utilisé des films de phthalocyanine métallés au zinc (ZnPC) comme couches actives de capteurs optiques pour la détection du pentachlorophénol (Basova *et al.*, 2009). Quant à Erbahar *et al*, ils ont utilisé également des ZnPC avec des substituants fluorés pour détecter des pesticides (carbamates et organophosphorés) directement dans l'eau (Erbahar *et al.*, 2013). Cette aptitude continue encore à être exploitée avec par exemple plus récemment la détection de pesticides dans les jus (Köksoy *et al.*, 2021).

La surface sensible des capteurs SAW a été fonctionnalisée avec différents films minces d'une cinquantaine de nanomètres de PC et de PC métallée (Ni, Co et Fe), déposés par épitaxie à jet moléculaire. La couche ainsi formée a été contrôlée par microscopie à force atomique (AFM), comme c'est systématiquement le cas pour toutes les couches de fonctionnalisation. Un échantillonnage représentatif de la totalité de la surface permet de s'assurer de l'homogénéité des dépôts tout en relevant la morphologie typique de chaque couche déposée. Les images AFM ont montré un résultat typique avec un aspect colonnaire et une répartition uniforme pour les PC métallées, en comparaison au PC libres. Cette forme induit une surface spécifique élevée permettant d'espérer une grande sensibilité, rendant les capteurs développés hautement souhaitables pour ces applications.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés au dosage de deux organophosphorés, le méthidathion et l'ométhoate, via une transduction gravimétrique par nos capteurs SAW (Bakas *et al.*, 2014).

2.2.2.1. Détection du méthidathion et de l'ométhoate

Les résultats typiques, obtenus pour ces deux organophosphorés, sont présentés sur la Figure.2.4. Nous y avons porté les variations de phase en fonction du temps, en réponse à l'injection d'une solution nano-molaire (nM) de chacun de ces deux pesticides.

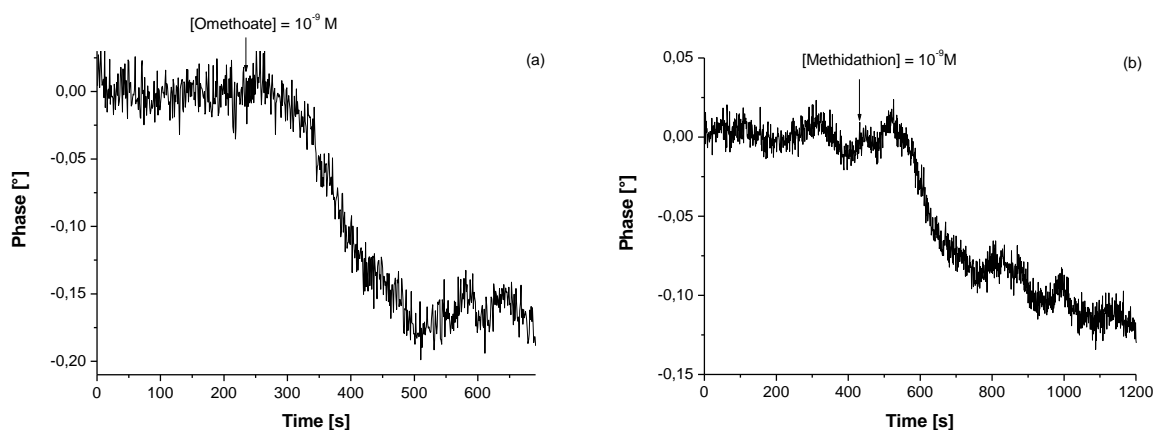


Figure.2.4. Variations de phase du signal de sortie des capteurs en fonction du temps, à la suite de l'injection d'une solution 10^{-9} M de (a) Ométhoate et (b) Méthidathion.

La limite de détection obtenue dans ces deux cas était de 1 nM, soit approximativement, 100 fois plus faible que celle rapportée par Erbahar *et al* (Erbahar *et al.*, 2012), qui ont développé onze dérivés de phtalocyanine pour la détection de pesticides dans l'eau avec des microbalances à quartz. Quant à la sensibilité des capteurs développés, elle a été trouvée égale à $0,17^{\circ}/\text{nM}$ pour l'ométhoate et à $0,10^{\circ}/\text{nM}$ pour le méthidathion. Pour pouvoir comparer ces deux valeurs à d'autres travaux, nous pouvons convertir les décalages de phase en "décalages de fréquence équivalent", soit approximativement 160 Hz/nM et 94 Hz/nM (Lattach *et al.*, 2011). Ces valeurs sont supérieures à celles rapportées par Mensah-Brown *et al.* qui avaient utilisé un capteur LiTaO_3 36°rot, fonctionnalisé avec une couche hybride organique/inorganique, pour la détection du parathion en solution aqueuse (Mensah-Brown *et al.*, 2014).

Ces deux comparaisons n'ont pas vocation à montrer la primauté d'un capteur sur un autre, mais plutôt à mettre l'accent sur l'importance capitale du couple mode de transduction / couche de reconnaissance. Dans le premier cas, les couches de reconnaissance étaient similaires, alors que les transducteurs différaient : QCM à 5 MHz contre SAW à 104 MHz. A l'inverse, la seconde comparaison impliquait exactement le même dispositif (SAW à 104 MHz) mais avec des couches de fonctionnalisation différentes. C'est donc bien l'ensemble du système capteur/couche de reconnaissance qu'il faut adapter et optimiser selon les applications visées, pour espérer atteindre les meilleures performances.

Des tests de sélectivité, réalisés sur deux pesticides de masse moléculaire égale à celle de l'ométhoate, la simétryne (213 uma) et la terbutylazine-2-hydroxy (212 uma), ont montré une absence de réponse des capteurs, signe de leur sélectivité vis-à-vis des organophosphorés. Néanmoins, en reprenant nos résultats avec un regard critique, au-delà des aspects purement métrologiques, on peut noter que les décalages de phase, $0,12^\circ$ pour le méthidathion et $0,18^\circ$ pour l'ométhoate, ne sont pas en accord avec leur masses moléculaires de 302 et 213 (uma) respectivement.

Des éléments de réponses, quant à cette sélectivité ainsi qu'à la non-proportionnalité entre la masse moléculaire des analytes et la réponse gravimétrique correspondante, pourraient être apportés par calculs et modélisation.

2.2.2.2. Apport des calculs de chimie quantique

Des calculs de chimie quantique ont été effectués dans un premier temps pour comprendre la nature des interactions impliquées entre le NiPc et une molécule de chaque classe chimique : ométhoate et terbutylazine-2-hydroxy. Les structures minimales et les énergies électroniques et libres correspondant aux conformères stables isolés et complexes ont été calculées au niveau de théorie B3LYP/6-311+G* (Lee *et al.*, 1988). La procédure d'optimisation à critères de terminaison serrés (algorithme de Berny) telle qu'elle est mise en œuvre dans GAUSSIAN 09 est utilisée (Barone *et al.*, 1998). Les géométries ont été entièrement optimisées au niveau B3LYP/GEN en utilisant le jeu de base 6-311+G(d) pour les atomes H, C, N, O et le jeu de base LANL2DZ pour l'atome de Ni en phase gazeuse (Frisch *et al.*, 2016). Les analyses des fréquences vibratoires ont indiqué que les structures optimisées des complexes se trouvaient à des points stationnaires correspondant à des minima locaux sans fréquences imaginaires. Les énergies de formation E_f ont été calculées comme la différence entre l'énergie du complexe relaxé et la somme des énergies des systèmes isolés relaxés séparément. Comme nous comparons les différences d'énergie entre les complexes, l'erreur de superposition des ensembles de base n'est pas corrigée.

Le paysage conformationnel de l'ométhoate et de la terbutylazine-2-hydroxy a été étudié par une variation systématique des angles dièdres qui déterminent la conformation des positions de la chaîne latérale et des groupes alkyles. Les résultats montrent la présence de quelques conformères dans les deux cas.

La conformation la plus stable de l'ométhoate est stabilisée par la liaison hydrogène entre l'atome d'oxygène de la fonction cétone et l'hydrogène du groupe amide (NH) ($\text{NH}\dots\text{O}-\text{C}=2,03\text{\AA}$). Deux complexes ont été formés, avec cette conformation en liant les atomes de soufre ou d'oxygène à l'atome de nickel (Figure.2.5a et Figure.2.5b). Cependant, le complexe le plus stable correspond à l'atome d'oxygène placé sur le nickel. En phase gazeuse, les énergies de formation sont égales à -25 et -20 kJ/mol, pour les sites ONi et SNi respectivement. La distance entre les atomes de nickel et d'oxygène, 3,10 Å, est supérieure à la somme de leurs rayons covalents et inférieure à la somme de leurs rayons de Van der Waals. L'interaction semble être dominée par des forces électrostatiques. Les longueurs des liaisons Ni-N dans la structure NiPc varient entre 1,925 et 1,930 Å.

Dans le cas de la terbutylazine-2-hydroxy, la réaction de complexation est endothermique pour les deux sites d'adsorption explorés. La distance entre l'atome de nickel et les sites d'oxygène ou d'azote est d'environ 3,24 ou 4,02 Å respectivement (Figure.2.5c et Figure.2.5d). Ces valeurs sont plus

grandes que la somme des rayons de van der Waals des atomes d'azote et de nickel (155 pm pour l'azote, 163 pm pour le nickel et 313 pm pour Ni+N)⁶. Les énergies de formation sont positives et égales à 50 et 55 kJ/mol pour les sites d'oxygène et d'azote respectivement. Dans ce cas, la formation du complexe n'est pas favorable. Le cycle NiPc n'est pas affecté et la longueur de la liaison Ni-N reste à 1,922Å. Nous utilisons un modèle de continuum polarisable pour prendre en compte l'effet du solvant et nous avons trouvé que la correction de l'énergie de solvation ne modifie pas les conclusions en phase gazeuse.

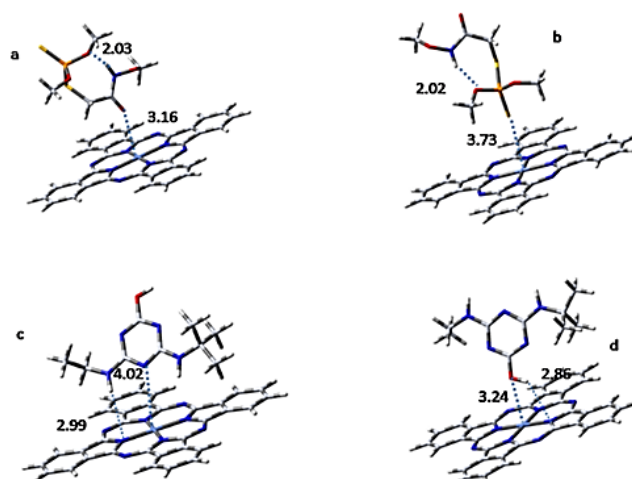


Figure.2.5. Structures optimisées des complexes NiPc -ométhoate (site oxygène (a) et site soufre (b)) et NiPc-Terbutylazine-2-hydroxy (site azote (c) et site oxygène (d)). La distance entre les atomes en interaction possible a été insérée.

Sur la base de ces calculs, il apparaît clairement que l'ométhoate peut se complexer avec le NiPc, par l'intermédiaire de l'atome d'oxygène du groupe carbonyle ou du soufre, contrairement à la terbutylazine-2-hydroxy, en raison de l'encombrement stérique autour de son atome d'azote. Ce qui est parfaitement en phase avec les tests expérimentaux de sélectivité.

Par la suite, nous nous sommes intéressés au mécanisme de détection du méthidathion par la couche active de NiPc. Comme illustré sur la Figure.2.6, les molécules de méthidathion possèdent au moins trois modes de coordination probables différents à travers les sites S, N et O. Comme l'atome S ne serait pas un bon donneur (car sa paire d'électrons solitaires serait délocalisée dans le cycle), il n'est pas favorable à la formation d'une liaison de coordination avec le Ni du NiPc.

⁶ <https://www.elementschimiques.fr/?fr/proprietes/chimiques/rayon-de-van-der-waals>

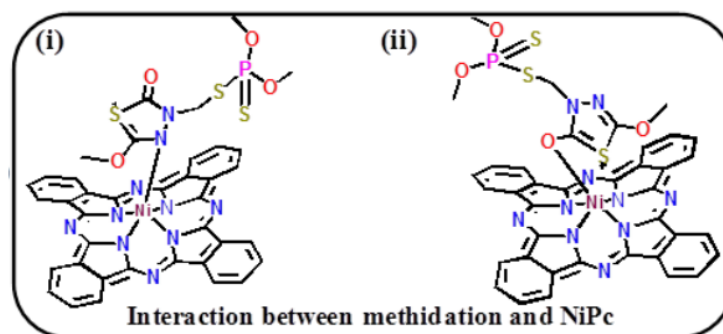


Figure.2.6. Deux modes possibles d'interaction entre le méthidathion et le NiPc.

D'un point de vue stéréochimique, le mode de coordination par N ou O, comme illustré sur la Figure.2.6., est certes difficile mais ne peut être exclu simplement en raison de la nature nucléophile des atomes N ou O. Dans les deux cas, un encombrement stérique se produit car la grande taille des groupements au sein d'une molécule empêche les réactions chimiques d'autres molécules de méthidathion avec Ni de NiPc. A l'opposé, les molécules d'ométhoate "attachées" ne provoquent pas d'encombrement stérique, permettant ainsi à d'autres molécules de se lier aux films de NiPc. Là aussi, les résultats des calculs viennent expliquer les constats fait lors des mesures expérimentales avec une réponse gravimétrique plus importante pour l'ométhoate, bien que sa masse moléculaire soit plus faible que celle du méthidathion.

L'apport du calcul est indéniable pour compléter et/ou apporter des éléments de réponses à des constats et résultats expérimentaux partiellement expliqués. Mais cet apport pourrait être mis à profit d'une meilleure façon, s'il est considéré en amont, dès les phases d'élaboration des capteurs avec leurs couches de fonctionnalisation. Une modélisation permettrait de considérer davantage de voies de fonctionnalisation que ne l'autoriserait l'expérience, et amènerait à faire un choix rationnel restreint de cas à tester parmi les meilleures configurations.

2.2.3. Le glyphosate

Le glyphosate (Gly) a été introduit sur le marché grand public en 1974 comme herbicide à large spectre. Il est rapidement devenu l'un des herbicides les plus utilisés au monde, comme le rapporte l'association canadienne des médecins pour l'environnement⁷. L'introduction de cultures génétiquement modifiées tolérant le glyphosate au cours des vingt dernières années a considérablement augmenté son utilisation dans des applications agricoles et non agricoles (de Souza *et al.*, 2017). Chimiquement stable, il peut se disperser dans les eaux de surface et subsurface (sans subir de dégradation photochimique) par une utilisation directe à proximité des milieux aquatiques ou par ruissellement ou lixiviation à partir d'applications terrestres⁸. Une fois dans l'environnement, le glyphosate peut être décomposé par les microbes du sol en son principal métabolite, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA)⁹. Son potentiel de danger n'est toujours pas clair, car il possède

⁷ <https://www.equiterre.org/>

⁸ <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Organophosphate-Insecticides-And-Herbicides-2017>

⁹ WHO/SDE/WSH/03.04/97. Glyphosate and AMPA in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 2005

des structures semblables à celles des acides aminés qui pourraient interférer avec la formation d'acides aminés et d'autres produits chimiques dans les plantes. En 2015, le centre international de recherche sur le cancer de l'OMS a classé le glyphosate comme "probablement cancérigène pour l'homme" (IARC 2015)¹⁰. Plusieurs autres études ont démontré le potentiel du glyphosate en tant que perturbateur endocrinien (Dallegrave *et al.*, 2007, de Souza, Kizys *et al.*, 2017, Gasnier *et al.*, 2009). Ainsi, les organisations internationales ont tenté de réglementer les niveaux de glyphosate admis dans l'environnement. L'Union Européenne a ainsi requis une limite de 0,1 µg L⁻¹ (soit $5,9 \times 10^{-10}$ M) dans l'eau potable. Ces préoccupations sanitaires ont ainsi motivé le développement de nombreuses méthodes analytiques et de capteurs chimiques de plus en plus performants. Une des approches intéressantes est celle basée sur des capteurs fonctionnalisés avec un polymère à empreinte moléculaire (MIP), car elle est peu coûteuse tout en étant sensible, sélective, spécifique et polyvalente (Cieplak *et al.*, 2016, Dickert *et al.*, 2006, Ktari *et al.*, 2015, Maouche *et al.*, 2012, Zouaoui *et al.*, 2021).

Dans cette étude, le MIP consiste en une matrice de polypyrrol (PPy), dans laquelle des molécules cibles du Gly ont été incorporées. Le PPy a été choisi parmi la grande variété de polymères conducteurs pour plusieurs raisons : sa stabilité dans une large gamme de pH, la stabilité dans le temps des films synthétisés et la facilité d'électro-polymérisation sur divers substrats. Alvarez-Lorenzo *et al* ont rapporté que la stabilité des sites imprimés créés dans ce polymère est liée à sa suroxydation irréversible et que les propriétés de reconnaissance sont attribuables à l'incorporation de groupes carbonyles et carboxyliques dans le squelette du polypyrrole pendant le processus de suroxydation (Alvarez-Lorenzo 2013). Selon ces auteurs, la liaison hydrogène PPy-cible, par exemple entre le groupe N-H du pyrrole et certains groupes fonctionnels tels que le groupe C=O ou l'atome de nitrogène dans la cible, explique la sélectivité du capteur vis-à-vis dudit analyte. Toutes ces hypothèses peuvent être vérifiées par des calculs de chimie computationnelle basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) afin d'évaluer la complémentarité conformationnelle et chimique entre les modèles de Gly et deux pesticides interférents (simétryne et ométhoate) avec la matrice PPy. Par rapport à d'autres études, nous avons décrit ici le polymère PPy par deux couches séparées par une distance, et non par un nombre limité de monomères de pyrrole (Jin *et al.*, 2012, Lattach, Fourati *et al.*, 2012, Rad *et al.*, 2015, Singh *et al.*, 2012).

Les deux techniques de transduction, la gravimétrie et l'électrochimie, ont été utilisées dans cette étude. Cette redondance est un moyen efficace qui permet d'éliminer tous les biais expérimentaux et de valider les résultats obtenus, tout en donnant accès à des informations complémentaires (Lattach, Fourati *et al.*, 2012, Lattach, Fourati *et al.*, 2011).

Cette étude était la première concernant la détection du Gly par un capteur à ondes acoustiques de surface fonctionnalisé avec un polymère à empreinte moléculaire, et le premier travail qui avait permis d'estimer les valeurs des constantes de dissociation entre la matrice de polypyrrole et Gly à partir de deux techniques de transduction différentes.

10 https://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/2016/glyphosate_IARC2016.php

La sélectivité et la compétitivité ont été étudiées avec le gluphosinate d'ammonium, la simétryne, la terbuthylazine -2- hydroxy, l'ométhoate et le méthidathion, des pesticides qui coexistent habituellement avec le Gly.

Les mesures de chronampérométrie (CA) et de voltampérométrie à ondes carrées (SWV) ont été réalisées avec une station de travail électrochimique CHI 650E (CH Instrument Inc., USA) en utilisant une configuration à trois électrodes : une électrode en or, une électrode au calomel saturé (SCE) et un fil de platine, comme électrodes de travail, de référence et auxiliaire respectivement. Selon la technique utilisée, l'électrode de travail ($S = 22 \text{ mm}^2$) était soit la zone de détection du capteur SAW, soit une électrode en or. Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante et sous air ambiant.

Dans cette étude, la CA a été utilisée pour électropolymériser les MIP sur la zone de détection des capteurs électrochimiques et gravimétriques, tandis que la SWV a été étudiée pour optimiser les paramètres de caractérisation des MIP et pour suivre l'extraction du modèle Gly et la détection de l'analyte (Gly et autres molécules de pesticides).

Avant toute mesure, les électrodes ont été immergées dans un bain d'acétone et d'éthanol pendant 10 min. Par la suite, et après séchage à l'air, une goutte d'une solution piranha (98% H_2SO_4 / 30% H_2O_2 1:1 v/v) est déposée sur les zones de détection en or des deux transducteurs SAW et électrochimiques, et laissée agir pendant 20 min. Les substrats ont ensuite été copieusement rincés à l'eau ultrapure, puis à l'éthanol avant d'être séchés à l'air ambiant.

Comme démontré dans nos précédentes études (Ktari, Fourati et al., 2015), l'électrodéposition d'une fine couche de blocage (BL) de polypyrrole sur une électrode en or est nécessaire pour éviter la formation de complexes avec l'or. Cette couche primaire a également l'avantage d'abaisser le potentiel d'oxydation du pyrrole lors de la préparation du MIP (Maouche, Guergouri et al., 2012). Ici, nous avons préparé la BL ($[\text{PPy}] = 10^{-2} \text{ M}$ et $[\text{LiClO}_4] = 10^{-1} \text{ M}$) par CA à un potentiel constant de 1.05 V vs SCE pendant 2 s.

Les MIPs ont ensuite été préparés par CA à un potentiel fixe de 1.05 V vs SCE pendant 7s avec les concentrations suivantes $[\text{PPy}] = 10^{-2} \text{ M}$, $[\text{Gly}] = 10^{-4} \text{ M}$ et $[\text{LiClO}_4] = 10^{-1} \text{ M}$. Le pH de la solution de prépolymérisation était égal à 5.

Plusieurs mesures de SWV ont été réalisées afin de déterminer la durée optimale d'incubation des templates dans une solution de pyrrole. Les résultats, présentés dans la Figure.2.7, montrent que le pic d'oxydation du Gly augmente avec le temps et se stabilise à environ 25 min. Une durée d'incubation de 30 min a donc été retenue pour la réalisation du MIP.

Des films minces de polymère de polypyrrole non imprimé (NIP) ont également été préparés dans des conditions d'électro-polymérisation identiques mais sans Gly, afin d'évaluer les adsorptions non spécifiques.

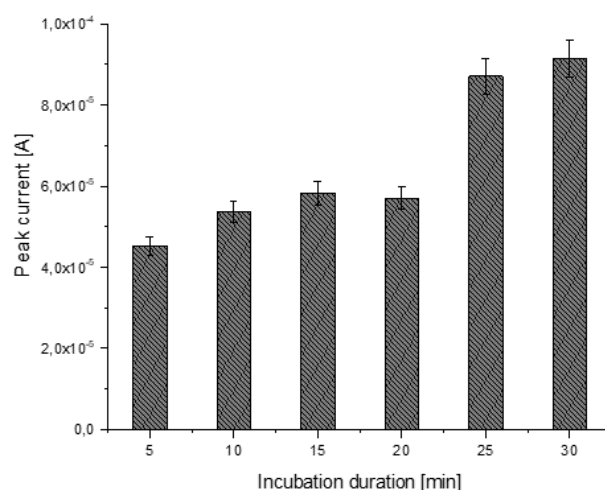


Figure.2.7. Suivi de la variation du pic d'oxydation du glyphosate en fonction de la durée d'incubation dans une solution de pyrrole/glyphosate/LiClO₄.

2.2.3.1. Extraction des molécules cibles

Les électrodes recouvertes d'or, destinées aux mesures électrochimiques, ont été entièrement plongées dans la solution protique (méthanol/acide acétique 1:1 v/v), puis dans l'eau ultrapure pendant 30 min, avant d'être séchées à l'air. Le suivi des variations des pics de courants (déterminés à partir des mesures de SWV), en fonction de la durée d'extraction dans la solution protique, indique que l'extraction du Gly pendant 30 min (réduction du le pic de courant attribué à l'oxydation du Gly d'environ 88%) est un optimum pour l'extraction de la cible tout en maintenant la matrice PPy intacte (Figure.2.8).

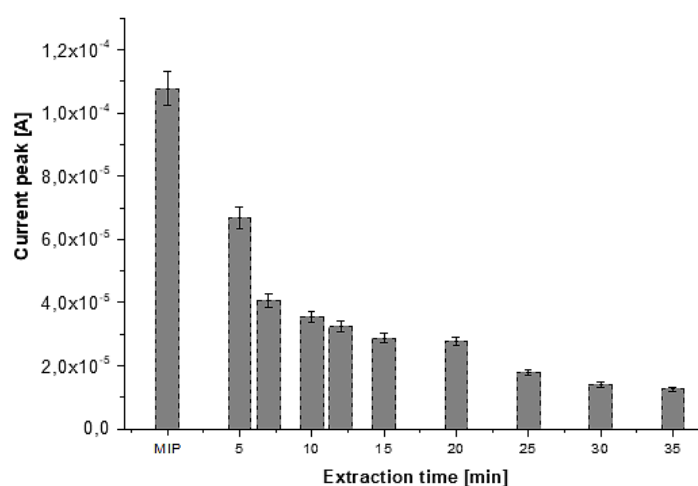


Figure.2.8. Suivi de la variation de l'amplitude du pic de courant de pointe en fonction de la durée d'extraction dans le méthanol.

2.2.3.2. Détection du glyphosate

Avant la détection du Gly, une évaluation d'une possible adsorption non spécifique entre le Gly et la matrice de polypyrrole a été menée. Dans ce but, nous avons préparé deux électrodes, l'une fonctionnalisée avec un MIP, l'autre avec un NIP, auxquelles nous avons fait subir les mêmes traitements (incubation/extraction) et caractérisations (par SWV après chaque traitement). Les résultats sont regroupés dans la Figure.2.9a, où les voltammogrammes montrent clairement le pic d'oxydation du Gly à 0,38 V, apparaissant pour le MIP contenant le template. Ce pic est quasi-absent de la réponse du MIP extrait (ligne rouge), indiquant une extraction efficace ; puis réapparaît (avec la même amplitude) après l'incubation du MIP dans une solution de Gly de concentration de 10^{-4} M.

Comme attendu, le voltammogramme du (NIP) incubé dans une solution de 10^{-4} M de Gly montre un léger pic d'oxydation, qui est comparable à celui du MIP extrait. Ceci peut être attribué à l'adsorption non spécifique, et peut être expliqué par le fait qu'à pH 5 (pH auquel les mesures ont été effectuées), les groupes carboxyles fonctionnels des Glys sont chargés négativement et peuvent interagir avec les groupes N-H des unités de pyrrole chargés positivement. Cette valeur reste cependant largement inférieure à celle du MIP après incubation dans la solution de Gly, indiquant la très faible adsorption non spécifique.

Afin d'évaluer les propriétés de détection du capteur électrochimique conçu, les électrodes extraites à base de MIP ont été incubées pendant 30 min dans une solution de Gly à des concentrations croissantes de 10^{-13} M à 10^{-4} M (la concentration de réalisation du MIP) (Figure.2.9b).

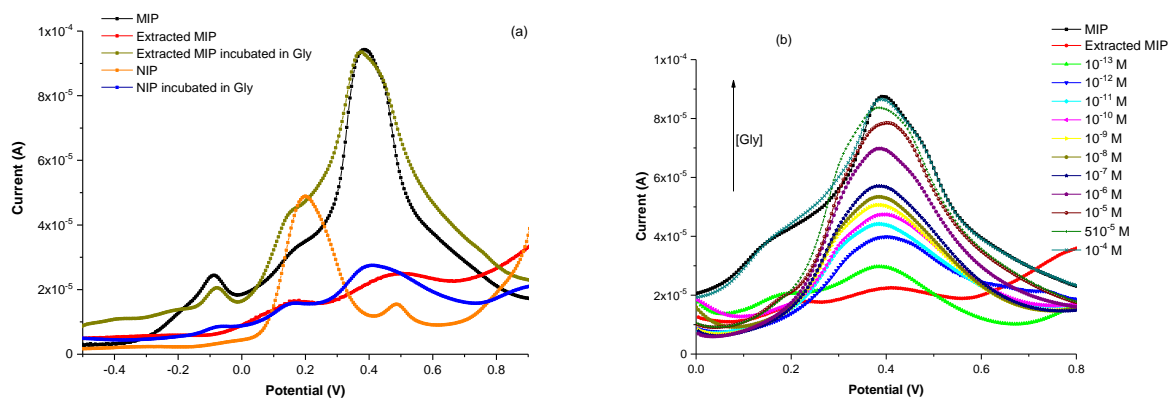


Figure.2.9. Voltammogrammes à ondes carrées de (a) un MIP PPy, avant et après extraction du Gly, un NIP et un MIP extrait incubé de nouveau dans une solution 10^{-4} M de Gly (b) réponse du capteur à base de MIP, pour différentes concentrations de Gly.

L'exploitation des mesures présentées sur la Figure.2.9b, permet d'estimer la limite de détection (LOD) de ce capteur à 10^{-12} M, pratiquement deux ordres de grandeur plus basse que la valeur limite requise par l'UE pour l'eau potable ($0.1 \mu\text{g/L}$ pour les pesticides sans distinction). Cette LOD relativement basse est d'autant plus appréciable dans les applications visant des éléments traces et ultra-traces, que le protocole de fonctionnalisation est assez simple et ne nécessite qu'une seule étape d'électro-polymérisation.

La détection du Gly a également été étudiée par gravimétrie pour des concentrations allant de 10^{-12} M à 4×10^{-6} M. Toutes les expériences ont été réalisées dans de l'eau ultrapure. Le suivi de la diminution de la phase du signal de sortie en fonction du temps, après l'injection de solutions de Gly, donne accès à des informations sur la cinétique de reconnaissance de ce pesticide par le capteur MIP-SAW (une courbe typique est présentée sur la Figure.2.10).

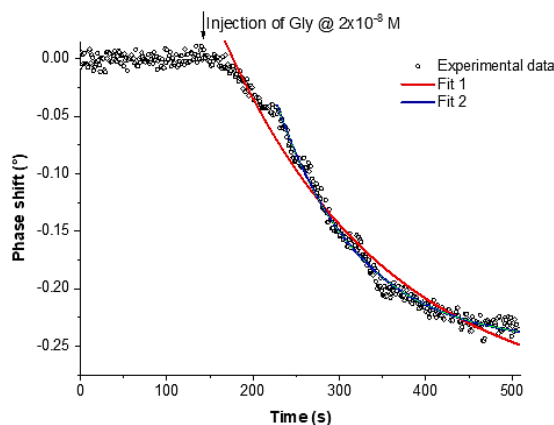


Figure.2.10. Suivi temporel de la variation de phase du capteur SAW fonctionnalisé avec un MIP_Gly après l'injection d'une solution de 2×10^{-8} M de Gly : ajustement des points expérimentaux avec une exponentielle décroissante. Ajustement 1 (ligne continue rouge) en considérant l'ensemble du temps de reconnaissance ; ajustement 2 (ligne continue bleue) en considérant un domaine temporel restreint en fin du processus de détection.

La forme typique de la dépendance temporelle de la reconnaissance du glyphosate peut être ajustée par une exponentielle décroissante, avec une constante de temps globale de (188 ± 7) s. Une première phase durant une quarantaine de seconde, relativement lente, correspond probablement à des réarrangements nanométriques des cavités du MIP, afin de s'adapter aux molécules de Gly. Ensuite, le processus de reconnaissance devient plus rapide (96 ± 2) s. Ce changement de pente suggère une contribution combinée du réarrangement structural et des complémentarités chimiques dans les processus de reconnaissance.

2.2.3.3. Constantes de dissociation

Afin de comparer les deux modes de transduction, les variations des signaux de sortie des capteurs électrochimiques et gravimétriques, en fonction des concentrations du Gly, sont présentées dans la Figure.2.11. Ces relevés permettent dans un premier temps d'estimer les sensibilités (à l'origine) des deux capteurs conçus : de l'ordre de $(75 \pm 41) \mu\text{A/nM}$ et $(6.9 \pm 2.9) \times 10^{-2} \text{°/nM}$ pour les capteurs électrochimiques et gravimétriques respectivement. Ces valeurs suffisamment élevées, associées à une faible limite de détection (0,1 pM), permettent d'envisager d'utiliser ces deux capteurs, séparément ou de manière corrélée, dans toute application pour la surveillance de l'environnement. En plus de ces deux caractéristiques importantes, il convient également d'estimer les constantes de dissociation qui renseignent sur le degré d'affinité entre le MIP et les molécules de Gly.

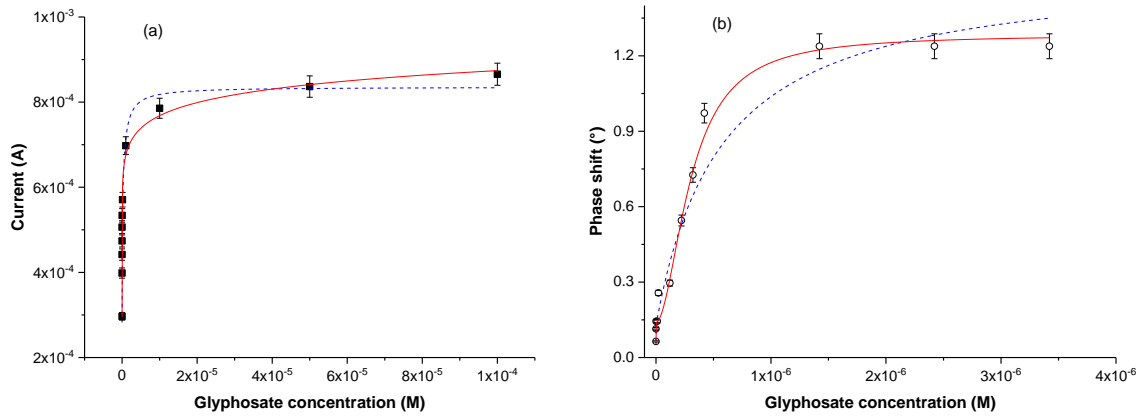


Figure.2.11. (a) Variation de la valeur du pic de courant en fonction de la concentration en Gly ; (b) Valeurs absolues cumulées des déphasages en fonction de la concentration en Gly. Ligne bleue : ajustement avec le modèle à deux sites de reconnaissance ; ligne rouge : ajustement avec le modèle combiné One site et Hill,

Les données expérimentales gravimétriques et électrochimiques (Figure.2.11) ont été ajustées dans un premier temps par un modèle à deux sites de liaison (équation.2.1) :

$$y(C) = \frac{A_1 \times C}{K_{d1} + C} + \frac{A_2 \times C}{K_{d2} + C} \quad (\text{eq.2.1})$$

où $y(C)$ correspond à la réponse du signal du capteur de sortie (phase ou courant pour la transduction gravimétrique ou électrochimique respectivement), pour une concentration C donnée de Gly, K_{d1} et K_{d2} sont les première et deuxième constantes de dissociation, A_1 et A_2 sont des constantes empiriques, dont la somme indique la valeur maximale de la réponse du signal de sortie (intensité de courant ou variation de phase).

Les constantes de dissociation ont été estimées à : $[K_{d1} = (1,4 \pm 0,8) \times 10^{-12} \text{ M}]$ et $[K_{d2} = (6,7 \pm 2,7) \times 10^{-7} \text{ M}]$ et $[K_{d1} = (2,0 \pm 0,8) \times 10^{-12} \text{ M}]$ et $[K_{d2} = (5,7 \pm 1,8) \times 10^{-7} \text{ M}]$ pour les mesures électrochimiques et gravimétriques respectivement. La très faible valeur de K_{d1} confirme l'hypothèse de liaisons fortes entre les cavités du MIP et les molécules de Gly. Cependant, la valeur très faible est davantage observée pour des entités biologiques complémentaires, que pour des systèmes mimétiques. Dans le cas présent, les phénomènes de reconnaissance impliquent non seulement les groupes fonctionnels complémentaires de la matrice et de la cible, mais aussi la taille et la forme des cavités créées. Cela implique que la reconnaissance peut conduire à des liaisons fortes où toutes les charges négatives de Gly se lient aux charges positives du pyrrole. De plus, le réarrangement nécessaire du film de polypyrrole autour des molécules de Gly contribue au renforcement de ces liaisons.

Pour prendre en compte l'inévitable restructuration mécanique du polymère, à l'échelle du nanomètre, nous avons remplacé le modèle de liaison à deux sites, par un modèle similaire où un exposant est associé à la fois à la concentration et à la constante de dissociation (équation 2. 2).

Selon le modèle de Hill, cette "pondération" permet de considérer une constante de dissociation apparente, sans changer radicalement le point de vue initial.

$$y(C) = \frac{A_1 \times C}{K_{d1} + C} + \frac{A_2 \times C^\alpha}{K_{d2}^\alpha + C^\alpha} \quad (\text{eq.2.2})$$

où $y(C)$ est la réponse du signal du capteur de sortie (phase ou courant pour la transduction gravimétrique ou électrochimique respectivement), pour une concentration C donnée de Gly, K_{d1} et K_{d2} sont les première et deuxième constantes de dissociation, A_1 et A_2 sont des constantes empiriques, dont la somme indique la valeur maximale de la réponse du signal de sortie (intensité de courant ou variation de phase), α est un exposant de pondération empirique.

Selon ce nouveau modèle combiné (Figure 2.11), les constantes de dissociation apparentes calculées à partir des mesures électrochimiques sont : $K_{d1} = (7,1 \pm 3,2) \times 10^{-13} \text{ M}$ et $K_{d2} = (1,6 \pm 1,4) \times 10^{-6} \text{ M}$, et celles obtenues à partir des mesures gravimétriques sont de l'ordre de $K_{d1} = (2,4 \pm 0,9) \times 10^{-12} \text{ M}$ et $K_{d2} = (3,0 \pm 0,7) \times 10^{-7} \text{ M}$. Comme espéré, le nouveau modèle s'adapte mieux aux données expérimentales électrochimiques comme gravimétriques. Les valeurs estimées de K_d sont cependant légèrement différentes de celles obtenues à partir du modèle de liaison à deux sites.

La légère différence entre les constantes de dissociation estimées à partir des mesures gravimétriques et électrochimiques est due au fait que la force ionique n'est pas la même dans les milieux étudiés. En effet, les mesures électrochimiques sont réalisées dans des solutions contenant une concentration relativement élevée d'électrolyte de support (LiClO_4 10^{-1} M dans notre cas), alors que la détection gravimétrique est réalisée dans l'eau ultrapure. Cette différence reste toutefois faible au regard des incertitudes de mesures.

2.2.3.4. Calcul par DFT

Pour essayer de comprendre l'interaction entre la matrice de polypyrrole et les analytes détectés, nous avons effectué des calculs de chimie quantique, en décrivant le polymère par deux couches séparées par une distance optimisée (Figure.2.12).

Les calculs ont été effectués en utilisant la méthode de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) dans des conditions périodiques fournies au moyen du code "VASP 5.2.11" (Vienna Ab Initio Simulation Package) (Kresse *et al.*, 1994, Kresse *et al.*, 1993). Les interactions électron-ion ont été décrites par la méthode "PAW" (Projector Augmented Wave) (Blöchl 1994, Kresse *et al.*, 1999). La convergence de l'expansion de l'onde plane est obtenue avec un cut-off de 500 eV. L'approximation du gradient généralisé (GGA) a été utilisée avec la fonctionnelle Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) (Hammer *et al.*, 1999, Perdew *et al.*, 1996). L'échantillonnage dans la zone de Brillouin a été effectué sur une grille de $(3 \times 3 \times 3)$ k-points. Tous les calculs rapportés dans cette partie ont été effectués à l'aide de la méthode DFT- D3 pour décrire les effets de la dispersion (Grimme 2006).

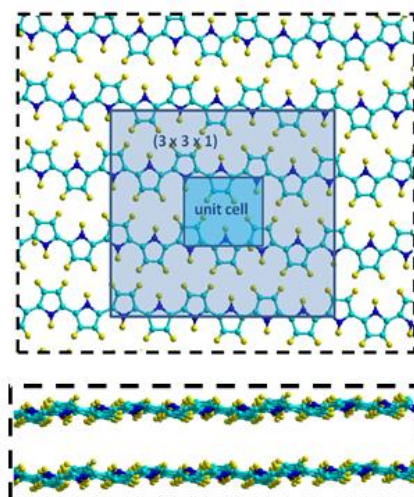


Figure.2.12. Modèle de matrice polymère considéré pour les calculs. La projection dans le plan montre le réseau primitif et le super réseau utilisé (3 x 3 x 1) (en haut) et la vue latérale montre la distance inter-plans (en bas). C, bleu clair ; H, jaune et N, bleu foncé

Une supercellule suffisamment grande pour contenir les molécules (3 × 3 × 1) est construite et un vide de 9 Å est fixé le long de l'axe z afin de piéger une molécule considérée entre les couches de PPy. Cette méthode est assez différente de celles généralement citées dans la littérature, y compris la nôtre (Ktari *et al.*, 2015) car le PPy a été modélisé par une couche complète et non par des fragments (monomère, dimère...). Le système est entièrement optimisé et les molécules de Gly ont été placées en tenant compte des sites d'interactions possibles. L'interaction entre Gly et polypyrrole est schématisée dans la Figure.2.13, via des liaisons hydrogène.

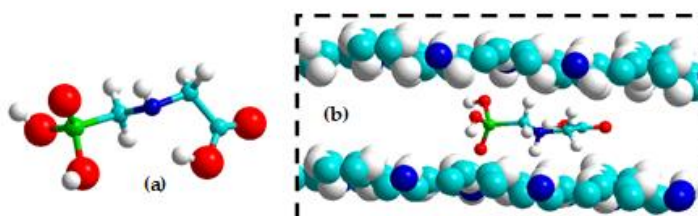


Figure.2.13. (a) Géométries optimisées de Gly. (b) Configurations les plus stables de Gly à l'intérieur de la matrice PPy. C, bleu clair ; H, blanc ; O, rouge, P, phosphore et N, bleu foncé

L'énergie d'interaction ΔE_{int} est calculée à partir de la différence des énergies entre le complexe ($E_{PPy + Gly}$) et celles de la molécule isolée (E_{Gly}) et du polymère (E_{PPy}), selon l'équation 2.3 :

$$\Delta E_{int} = E_{(PPy + Gly)} - \left[E_{(PPy)} + E_{(Gly)} \right] \quad (\text{eq.2.3})$$

Les calculs théoriques donnent une valeur de l'énergie d'interaction ΔE_{int} de l'ordre de -145 kJ/mol. Cette valeur négative élevée indique que le processus d'adsorption est exothermique. Cela peut être s'expliquer par le fait que les deux liaisons hydrogène sont fortement couplées à l'empilement entre les plans de la matrice qui se rapprochent lors de la complexation.

2.2.3.5. Tests de sélectivité et de compétitivité

Pour tester la sélectivité des capteurs réalisés, nous avons considéré plusieurs pesticides : gluphosinate d'ammonium, simetryn, terbuthylazine -2- hydroxy, ométhoate et méthidathion. A faible concentration (inférieure à 0,1 μM), les réponses de chacun de ces pesticides étaient comparables à celles des adsorptions non spécifiques observées avec le NIP, donc négligeables au regard des incertitudes des mesures. Malgré cela, nous avons réalisé des expériences avec des concentrations élevées, même si elles sont improbables.

La réponse électrochimique du capteur à base de MIP vis-à-vis de chacun de ces pesticides utilisés à 10^{-4} M a été comparée à celle obtenue pour Gly à 10^{-11} M (Figure.2.14).

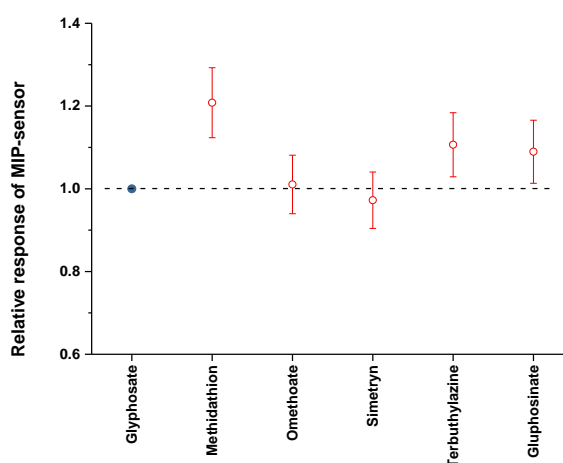


Figure.2.14. Réponses électrochimiques relatives du capteur MIP au gluphosinate d'ammonium, au simetryn, à la terbuthylazine -2- hydroxy, à l'ométhoate et au méthidathion à la concentration de 10^{-4} M, comparées à la réponse du glyphosate à 10^{-11} M.

Compte-tenu des écarts de concentrations, ces résultats indiquent que le capteur réalisé est hautement sélectif. Les mêmes expériences réalisées avec les capteurs à ondes acoustiques de surface ont confirmé la grande sélectivité des capteur basés sur les MIP.

Nous avons également réalisé des tests de compétitivité en utilisant un mélange de Gly à 10^{-4} M et chacun des cinq pesticides considérés à la même concentration. Les écarts relatifs entre les réponses obtenus et celles correspondant au Gly seul, étaient compris entre 1,7 % (pour l'ométhoate) et 5 % (pour le gluphosinate d'ammonium), c'est-à-dire proches des incertitudes de la mesure.

2.3. Les ions lourds

2.3.1. Préambule

Les ions lourds métalliques sont impliqués dans d'importantes contaminations environnementales ainsi que des problèmes de santé dans de nombreuses régions du monde. Parmi ces substances, le plomb est considéré comme l'un des plus toxiques, car il affecte de nombreux systèmes de l'organisme, notamment les systèmes neurologique, hématologique, gastro-intestinal, cardiovasculaire et rénal (Ayuso-Álvarez *et al.*, 2019). Au cours des dernières décennies, de nombreuses régions du monde ont été touchées par de graves problèmes de pollution au plomb. La surveillance des écosystèmes et la quantification des faibles niveaux d'ions métalliques toxiques en général et de ceux du plomb en particulier est donc un enjeu de société et de santé publique. C'est pour cette raison que de nombreuses études ont été orientées vers le développement de capteurs chimiques, pour le dosage du plomb en solution. A cet effet, plusieurs fonctionnalisations ont été envisagées, avec des couches de reconnaissance organiques et/ou inorganiques, des ADN (Zhou *et al.*, 2016), des aptamères (Yang *et al.*, 2017), des polymères à empreintes ioniques (Malitesta *et al.*, 2017) ou encore des molécules d'anthracène (Kaur *et al.*, 2015).

Pour notre part, nous nous sommes également intéressés à la mise au point de méthodes précises et sensibles de quantification d'ions métalliques et plus particulièrement le plomb. Pour cela, plusieurs types de capteurs gravimétriques ou électrochimiques ont été réalisés. La principale différence entre eux réside dans la nature de la couche de fonctionnalisation (β -cyclodextrine thiolée, dérivés d'anthracène, polymères à empreintes ioniques (IIP)...). Tous ces dispositifs se sont avérés extrêmement sensibles pour la détection du cation divalent du plomb. Ils ont également présenté une limite de détection (LOD) très inférieure à la valeur de 10 $\mu\text{g/l}$, fixée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), comme concentration limite de Pb^{2+} dans l'eau potable (Cotruvo 2017). Cependant, la sélectivité des capteurs développés était très dépendante du mode de fonctionnalisation et de la nature de la couche de reconnaissance. A titre de comparaison, nous aborderons dans la suite de ce chapitre deux capteurs d'ions lourds fonctionnalisés différemment.

2.3.2. Capteur SAW fonctionnalisé avec des anthracènes

L'affinité entre les anthracènes et les ions lourds a été montrée dans de nombreuses études impliquant des capteurs, notamment optiques (Prabhu *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2010).

Dans nos travaux sur cette thématique, nous avons synthétisé trois nouveaux dérivés d'anthracène, sur la base de calculs chimiques théoriques établissant leur capacité à piéger les ions plomb : 4-(9-anthrylméthoxy) benzyl[4-(9-anthrylméthoxy) phényl] sulfone (**BPS-AN**) ; 9-[[4-([4-(9-anthrylméthoxy) phényl]sulfanyl)méthyl]méthyl] anthracène (**TDP-AN**) et 2,2-bis(4-anthracényméthoxy-1,1'-biphényle) (**BP-AN**). La synthèse a été réalisée via la réaction de Williamson, une condensation du 9-chlorométhyl anthracène (AnCl) avec le 4,4'-sulfonyldiphénol, le 4,4'-thiodiphénol et le 4,4'-biphénol respectivement. Ces molécules (schéma.2.1) ont ensuite été utilisées comme couches de reconnaissance liées à un capteur gravimétrique SAW, en optant pour une fonctionnalisation très simple par drop-coating.

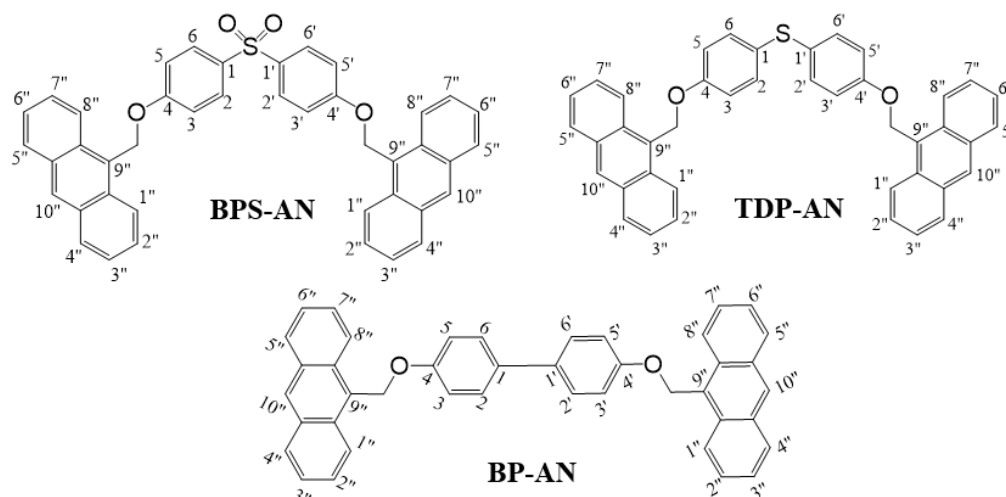


Schéma.2.1. Formules chimiques des molécules de BPS-AN, TDP-AN et BP-AN.

Au-delà du caractère pionnier de l'association anthracènes/SAW pour détecter des cations de métaux lourds en milieu liquide, c'est aussi la compréhension des modes d'interaction mis en jeu qui nous motivait ; aidés en cela par les apports complémentaires de l'expérience et des calculs chimiques théoriques.

2.3.2.1. Approche théorique

Les calculs théoriques ont permis dans un premier temps d'optimiser la géométrie des trois molécules en absence d'ions lourds (Figure.2.15), à l'aide du programme Gaussian09 D.01(Frisch 2009) en utilisant la méthode de la Fonctionnelle de la densité (DFT) avec la fonctionnelle B3LYP, la plus appropriée pour les études de réactivité. Puis dans un second temps, nous avons intégré les ions lourds (Cu, Hg et Pb) et déterminé les configurations les plus stables du complexe anthracène/métal (Figure 2.16). La base 6-31G (d, p) a été utilisée pour les atomes de carbone (C), d'oxygène (O), d'hydrogène (H) et de soufre (S), tandis que celle du LANL2DZ ECP a été étudiée pour les atomes de cuivre (Cu), de mercure (Hg) et de plomb (Pb) (Feller 1996). Tous les calculs rapportés ont été effectués à l'aide de la méthode B3LYP-D3 incluant la dispersion, afin de décrire de manière adéquate les interactions de dispersion entre une particule et ses voisins dans un rayon donné, via un simple champ de force, additionné à l'énergie DFT pure (Grimme *et al.*, 2010). La méthode des contreponds est utilisée pour corriger l'erreur de superposition de base (BSSE). L'effet de solvation est décrit par le modèle de continuum polarisable en utilisant des cavités atomiques de topologies unifiées Hartree Fock (UAHF) tel qu'implémenté dans le logiciel Gaussian 09.

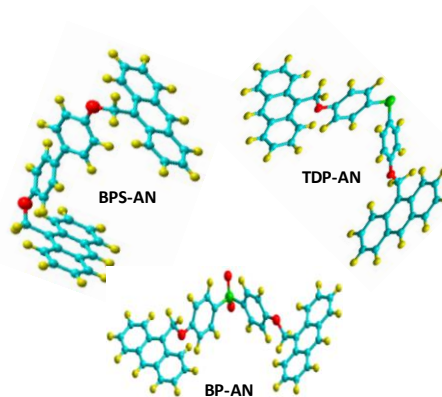


Figure.2.15. Structures optimisées du point de vue géométrique (B3LYP/6-31G (d, p)) de : BPS-AN, TDP-AN et BP-AN. S, vert ; O, rouge ; C, bleu ; H, jaune.

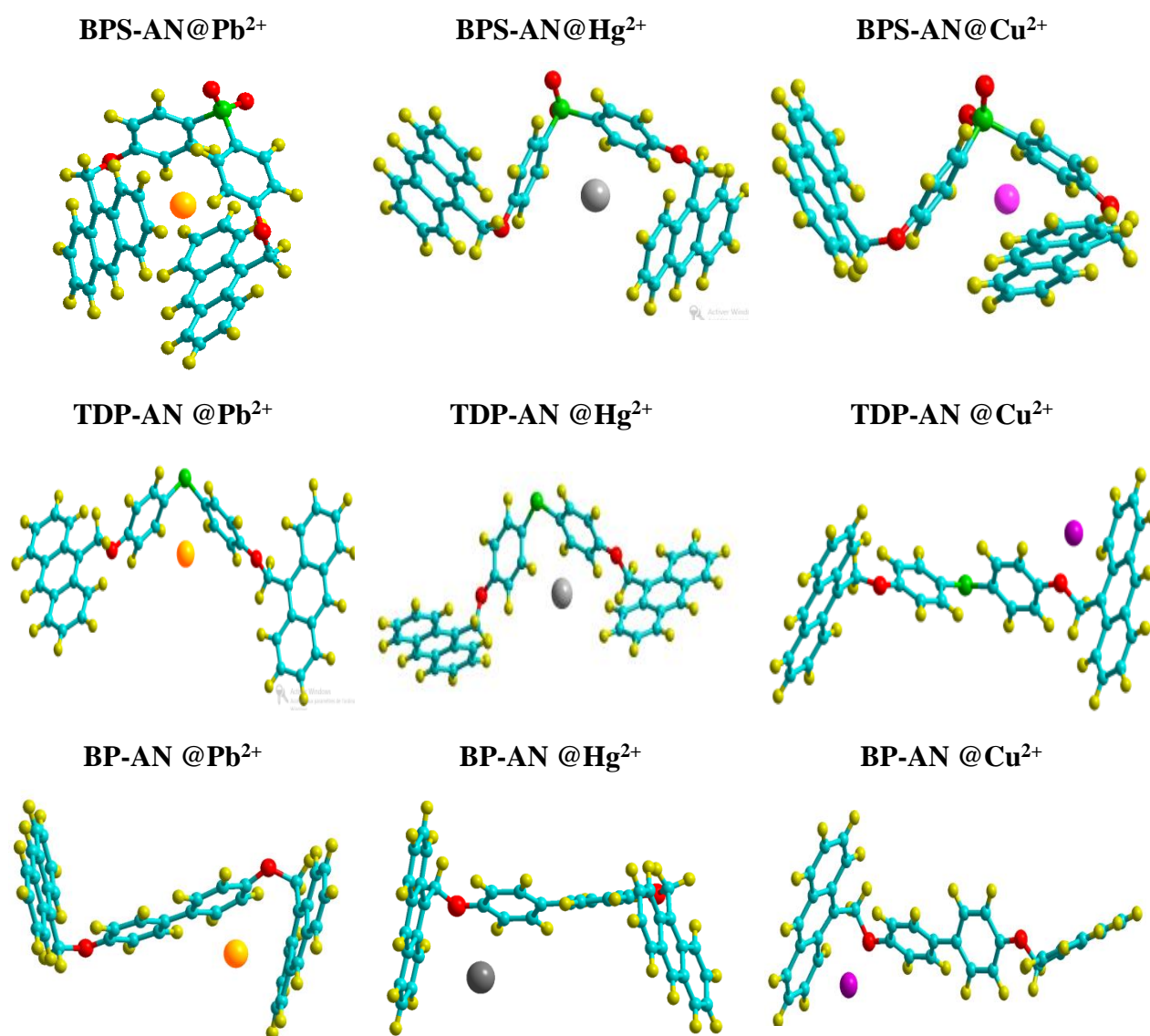


Figure.2.16. Les structures moléculaires optimisées des complexes Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+} / (BPS-AN, TDP-AN et BP-AN). S, vert ; O, rouge ; C, bleu ; H, jaune ; Pb, orange ; Hg, gris foncé ; Cu, violet

Les données énergétiques associées aux configurations les plus stables sont rassemblées dans le Tableau 2.1. En phase gazeuse, toutes les énergies d'adsorption calculées sont négatives, indiquant des complexations ion métallique/anthracène exothermiques. En tenant compte de l'énergie de solvation, on remarque que la réaction en phase liquide avec Hg^{2+} est défavorable, pour les trois anthracènes (énergies d'interaction positives). En revanche, pour Cu^{2+} comme Pb^{2+} , les complexations sont possibles, les énergies d'interaction restant toujours négatives.

Tableau 2.1. Energies d'adsorption (d'interaction) des ions métalliques sur les molécules d'anthracène en phases gazeuse et liquide.

	$\Delta E_{\text{int, gaz}} \text{ (kJ/mol)}$			$\Delta E_{\text{int, solv}} \text{ (kJ/mol)}$		
	Pb^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}
BPS-AN	-840,2	-939,1	-882,7	-290,1	-101,5	284,4
TDP-AN	-708,9	-991,5	-923,9	-196,0	-124,6	259,4
BP-AN	-656,4	-1068,3	-1102,7	-172,1	-209,6	74,0

En recentrant notre propos sur les ions plomb uniquement, nous pouvons envisager l'aspect quantité de charges dans une interaction électrostatique. La Figure.2.17 montre une certaine flexibilité du BPS-AN avec une configuration propice au piégeage de l'ion Pb^{2+} entre ses fragments aromatiques, à une distance estimée à 3.10 Å. Ceci maximise naturellement l'interaction électrostatique entre le cation Pb^{2+} et les nuages électroniques de deux anthracènes.

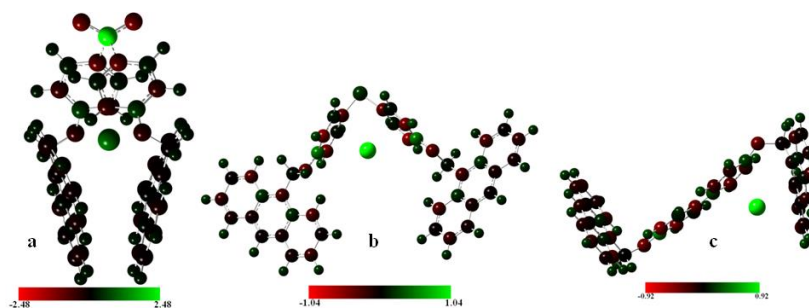


Figure.2.17. Les couleurs des charges atomiques des complexes Pb^{2+} les plus stables : (a) BPS-AN, (b) TDP-AN et (c) BP-AN.

Par ailleurs, l'atome de soufre dans le cas du BPS-AN est rendu plus positif ($Q = +2.48 \text{ e}$), du fait de l'importante conjugaison du système et des atomes d'oxygène électronégatifs. L'interaction entre les fragments aromatiques négatifs et les cations plomb est donc forte. Pour le TDP-AN, la conjugaison est brisée par le groupe CH_2 alors que pour le BP-AN, l'interaction est limitée par l'encombrement stérique des groupes phényles. Ces résultats suggèrent que les trois molécules considérées pourraient être envisagées comme des couches de reconnaissance pour les ions plomb, même si le BPS-AN est potentiellement le meilleur candidat. C'est d'ailleurs intéressant de confronter les résultats issus des

calculs à des résultats empiriques qui renseignent sur les interactions mises en jeu, via des capteurs SAW fonctionnalisés avec les trois molécules, BPS-AN, TDP-AN et BP-AN.

2.3.2.2. Investigations expérimentales

Des capteurs SAW ont été fonctionnalisés par les trois anthracènes objets des calculs théoriques. Dans un premier temps, nous avons testé la réponse des capteurs SAW à la présence des ions Pb^{2+} en solution. Les réponses estimées en termes de variations de phase pour différentes concentrations sont rassemblées dans la Figure.2.19. Comme attendu, la meilleure réponse est obtenue pour le capteur BPS-AN/SAW, en parfait accord avec les calculs par DFT. Une réponse moins favorable est obtenue pour le BP-AN.

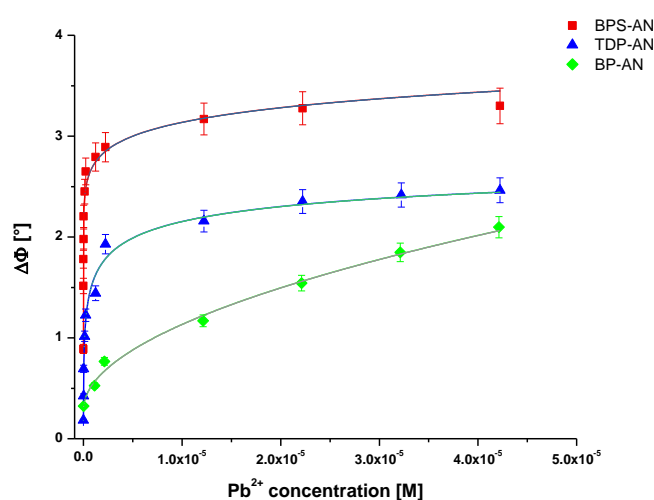


Figure.2.19. Variations cumulatives du déphasage ($\Delta\Phi$) pour les molécules BPS-AN, TDP-AN et BP-AN en fonction de la concentration cumulative en ions plomb.

Aucun capteur n'ayant présenté une réponse linéaire, nous avons estimé leurs sensibilités à partir de la pente à l'origine des courbes phase / concentration (Figure.2.19). Les valeurs obtenues ainsi que les limites de détection rassemblées dans le Tableau 2.3, indiquent que la sensibilité du capteur BPS-AN/SAW est supérieure d'environ deux ordres de grandeur à celle du capteur TDP-AN/SAW et d'environ trois ordres de grandeur à celle du capteur BP-AN/SAW.

Tableau 2.3. Estimation de la sensibilité (S) aux ions Pb^{2+} et de la limite de détection (LOD) des capteurs SAW à base de dérivés de l'anthracène.

	S [°/M]	LOD
BPS-AN	$(7,2 \pm 4,6) \times 10^8$	22 pM
TDP-AN	$(1,7 \pm 0,3) \times 10^6$	2 nM
BP-AN	$(0,20 \pm 0,02) \times 10^6$	11 nM

Habituellement, les limites de détection des capteurs (LOD) sont calculées à partir du rapport signal/bruit. Ici, nous avons fait le choix de considérer la plus faible concentration détectée par le capteur SAW fonctionnalisé avec une molécule d'anthracène donnée.

Le capteurs BPS-AN/SAW présente la meilleure valeur de sensibilité et surtout une très faible LOD, de l'ordre de 22 pM (la plus basses rapportée dans la littérature concernant la détection d'ions lourds avec des dérivés de l'anthracène), permettant de l'envisager comme outil sensible très efficace pour la détection du plomb dans les milieux liquides.

Les résultats expérimentaux sont en accord avec les calculs DFT et confirment que les molécules BPS-AN présentent la meilleure affinité pour les ions plomb par rapport aux autres molécules d'anthracène étudiées.

Pour mieux comparer les trois capteurs conçus, les constantes de dissociation ont été considérées pour évaluer la force de l'interaction entre les molécules d'anthracène étudiées et les ions plomb. La forme des courbes de variation de la phase en fonction de la concentration (Figure.2.19) montre une différence notable entre les réponses du capteur basé sur le BP-AN et les deux autres. Pour le premier, la variation phase/concentration suit une relation de type loi de puissance. Ce modèle est utilisé dans divers domaines, notamment celui des matériaux, où il décrit bien les propriétés des matériaux présentant un caractère viscoélastique. Pour les capteurs basés sur les dérivés du BPS-AN et du TDP-AN, le modèle en loi de puissance n'était pas approprié pour approcher les données expérimentales. L'utilisation d'un modèle combiné peut mieux décrire les mécanismes complexes impliqués dans la reconnaissance des ions plomb par les dérivés d'anthracène.

Le modèle de Hill s'est déjà avéré plus approprié que le "modèle de liaison à un site", dans le cas où la reconnaissance nécessite également une restructuration mécanique (Mazouz *et al.*, 2017). En utilisant le même modèle combiné (équation. 2.4) pour les trois dérivés d'anthracène, en plus d'un ajustement précis des données expérimentales, nous avons pu comparer les paramètres caractérisant les processus de reconnaissance pour chaque capteur chimique.

$$y(C) = \left(A + B \times C^\alpha \right) + \frac{D \times C^\beta}{K_d^\beta + C^\beta} \quad (\text{eq.2.4})$$

Le paramètre le plus approprié est "la constante de dissociation apparente K_d ". Elle a été trouvée de l'ordre de $(1,1 \pm 2,7) \times 10^{-10}$; $(5,8 \pm 8,1) \times 10^{-7}$ et $(2,7 \pm 3,4) \times 10^{-5}$ M pour BPS-AN, TDP-AN et BP-AN respectivement. La très faible valeur de K_d dans le cas de BPS-AN / Pb^{2+} , même si elle doit être pondérée par une valeur d'exposant, confirme la forte interaction impliquée entre les deux espèces.

Compte tenu de la très grande affinité entre la molécule BPS-AN et les ions plomb, nous avons choisi de limiter la suite de l'étude à ce seul dérivé d'anthracène.

2.3.2.3. Tests de sélectivité et confrontation calcul théorique-expérience

Les tests de sélectivité ont été menés en considérant les cations divalents cuivre (Cu^{2+}) et mercure (Hg^{2+}), deux ions lourds qui coexistent avec le plomb dans les milieux réels. Généralement, les estimations de la sélectivité se font sur une concentration donnée. Cela peut se concevoir pour les

capteurs qu'on sait relativement sélectifs, autrement il convient, de suivre la courbe de réponse des capteurs sur toute une gamme de concentration des ions considérés. C'est que nous avons entrepris et les résultats obtenus sont représentés dans la Figure.2.20.

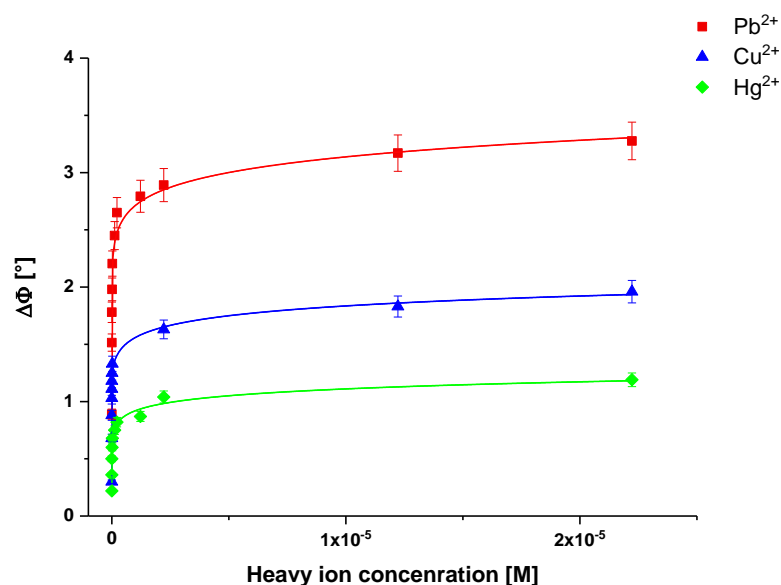


Figure.2.20. Variations cumulatives du déphasage ($\Delta\Phi$) en fonction des concentrations cumulatives de Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+} pour le capteur SAW fonctionnalisé avec BPS-AN.

Si la meilleure courbe de réponse est bien celle correspondant à la détection de l'ion Pb^{2+} , il n'en demeure pas moins que le capteur BPS-AN/SAW détecte les trois ions. La sensibilité et la limite de détection relatives à chacun de ces ions sont rassemblées dans le Tableau.2.4.

Tableau 2.4. Estimation des sensibilités (S) et de la limite de détection (LOD) des capteurs BPS-AN/SAW, vis-à-vis des ions Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+}

	Pb^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}
S [$^{\circ}/\text{M}$]	$(7,2 \pm 4,6) \times 10^8$	$(3,9 \pm 2,3) \times 10^8$	$(1,2 \pm 0,8) \times 10^8$
LOD [pM]	22	22	100

Cette différence entre les valeurs de sensibilité du capteur BPS-AN/SAW vis-à-vis de ces trois ions semble en phase avec les résultats des calculs théoriques, exprimés en termes d'énergies de solvation pour les complexes PBS-AN/Pb^{2+} , PBS-AN/Cu^{2+} et PBS-AN/Hg^{2+} , comme illustrée sur la Figure 2.21.

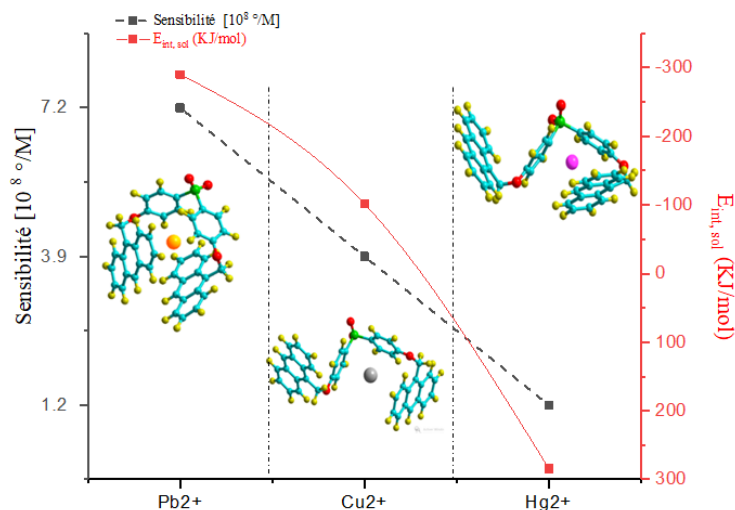


Figure.2.21. Confrontation entre les valeurs expérimentales de sensibilité des capteurs BPS-AN/SAW et les valeurs des énergies de solvation des complexes PBS-AN/(Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+}).

Cette corrélation entre les mesures expérimentales et les calculs théoriques rappelle tout le potentiel offert par les calculs dans ce champ d'application. Cela concerne aussi bien les études amont avec une investigation exploratoire permettant de cibler quelques molécules d'intérêt à synthétiser et tester parmi plusieurs, jusqu'à des investigations complémentaires permettant d'étayer et de comprendre les résultats expérimentaux.

2.3.3. Capteurs à couche de reconnaissance à base polymère à empreinte moléculaire

L'impression d'ions est certainement l'une des techniques les plus prometteuses pour la capture d'ions lourds. Le principe est basé sur la fabrication de sites de reconnaissance spécifiques prédéterminés, dans une matrice polymère organique, qui sont complémentaires aux modèles à la fois en termes de forme et de fonctions chimiques. Outre un choix judicieux de monomères fonctionnels, la conception de polymères à empreintes ioniques (IIP) efficaces nécessite l'utilisation d'un agent de réticulation, qui permet de créer des sites de liaison sélectifs après extraction du modèle. Le processus de polymérisation doit être un compromis entre une rigidité suffisante pour assurer la forme des empreintes, et une flexibilité appropriée pour permettre l'extraction des ions de la matrice polymère. Le potentiel de cette technique de fonctionnalisation sera éprouvé dans cette partie avec des détecteurs électrochimique et gravimétrique

2.3.3.1 Fonctionnalisation de capteurs pour la détection du plomb en solution

Cette étude est dédiée à la détection de Pb^{2+} par des voies électrochimique et gravimétrique, via des polymères à empreintes ioniques (IIP pour ionic imprinted polymers). Nous avons utilisé un même polymère de base, le polypyrrole, avec deux agents chélateurs différents, l'acide acrylique (AA) et la L-cystéine (L-Cys). Le choix de ce dernier était principalement dicté par l'efficacité des protéines riches en cystéine dans l'élimination des métaux lourds des cellules et des tissus, inspirant ainsi l'utilisation de la L-cystéine (L-Cys) comme agent écologique de décontamination des milieux

pollués par les métaux lourds, grâce à ses groupes amino, thiol et carboxylique. Nous avons par ailleurs choisi l'acide acrylique (AA) pour son groupe carboxylate accessible.

Les films de polypyrrole imprimés au plomb ont été préparés par chronoampérométrie (à un potentiel constant de 0,9 V/SCE) dans des solutions aqueuses contenant 10^{-2} M de pyrrole, 10^{-4} M d'agent chélateur (L-cystéine ou acide acrylique) et 10^{-3} M d'ions plomb, en présence de 10^{-1} M de l'électrolyte support (perchlorate de lithium). La technique CA offre en effet la possibilité de réaliser des films minces d'épaisseurs contrôlées. Les durées d'électro-polymérisation ont été optimisées à 10 s pour L-Cys-PPy et 12 s pour AA-PPy. Des films minces de polymères de polypyrrole non imprimés (NIP) ont été préparés dans les mêmes conditions, mais sans l'analyte Pb^{2+} . L'extraction de l'analyte des matrices polymères pour pouvoir utiliser les capteurs réalisés, se fait à l'aide d'une solution d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA, 0,1 M), suivi d'un rinçage avec de l'eau ultrapure.

2.3.3.2 Transduction gravimétrique

Dans des travaux précédents, nous avons constaté que le mécanisme de reconnaissance entre un polymère à empreinte moléculaire et un analyte donné dépendait de la concentration de ce dernier. Nous avons donc essayé de vérifier cela sur les deux capteurs SAW fonctionnalisés avec AA-PPy-IIP et L-Cys-PPy-IIP (Sakhraoui *et al.*, 2019). Les variations de phase du signal de sortie de ces deux capteurs, en réponse à l'injection de solutions de plomb, à faible (10^{-10} M) et forte (10^{-3} M) concentrations, sont portées en fonction du temps sur les Figures 2.21 et 2.22.

Pour une meilleure comparaison entre les réponses des deux capteurs, nous avons considéré l'ensemble des réponses. Pour les deux capteurs SAW, l'injection des solutions d'ions Pb^{2+} conduit à une diminution de phase, signe de leur détection par le film IIP.

Au regard des courbes de réponses des deux capteurs, les mécanismes impliqués semblent être différents selon l'agent chélateur considéré. En effet, dans le cas de l'AA-PPy-IIP, la reconnaissance des analytes par les cavités s'effectue en deux étapes, indépendamment de la teneur en plomb de la solution. Les constantes de temps, estimées à partir des ajustements des courbes de variation de la phase sont de l'ordre de (803 ± 48) s et (170 ± 5) s après l'injection de l'analyte à une concentration de 10^{-10} M, et de (22 ± 1) s et (1600 ± 86) s après l'injection d'une solution de plomb 10^{-3} M.

Dans le cas de la L-Cys-PPy-IIP, la reconnaissance des ions plomb par les cavités se fait en une seule étape. Les constantes de temps caractéristiques sont de l'ordre de (409 ± 50) s et (37 ± 1) s après l'injection des solutions de Pb^{2+} à 10^{-10} M et 10^{-3} M respectivement (Figure.2.23). Une explication possible de cette différence de comportement est que dans le cas de la L-Cys-PPy-IIP, les cavités sont occupées de manière quasi-instantanée après injection de Pb^{2+} , probablement sous l'effet combiné de l'important caractère chélateur de la L-Cystéine, et de la morphologie de la couche polymérique.

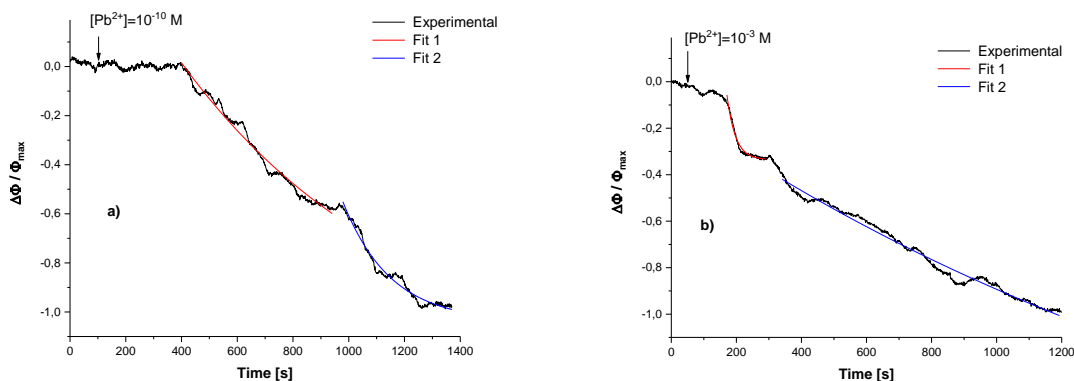


Figure.2.22. Variations du déphasage normalisé ($\Delta\Phi/\Phi_{\max}$) pour le capteur à base de AA-PPy-IIP après l'injection d'une solution d'ions plomb à une concentration de : (a) 10^{-10} M (b) 10^{-3} M.

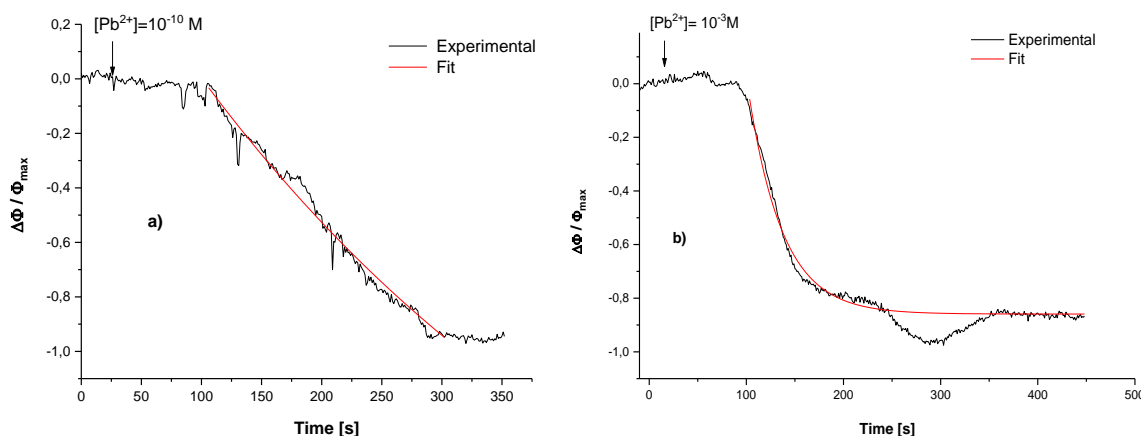


Figure. 2.23. Variations du déphasage normalisé ($\Delta\Phi/\Phi_{\max}$) pour le capteur à base de L-Cys-PPy-IIP après l'injection d'une solution d'ions plomb à une concentration de : (a) 10^{-10} M and (b) 10^{-3} M.

Ces résultats confirment la dépendance de la reconnaissance par les IIP des analytes, à la concentration de ces derniers. Ils soulignent ainsi l'importance de considérer de façon systématique les cinétiques de reconnaissance des polymères à empreinte ionique ou moléculaire. Pour les deux IIP/SAW, les constantes de temps calculées pour une concentration en Pb^{2+} de 10^{-3} M sont largement inférieures à celles obtenues pour une concentration de 10^{-10} M. Cela est probablement dû au fait que les ions Pb^{2+} se lient progressivement aux diverses empreintes, en partant de la surface. Pour les concentrations élevées de Pb^{2+} , les surfaces des deux IIP sont rapidement saturées, les ions occupant quasi instantanément les cavités superficielles et limitent ainsi l'accès aux sites plus en profondeur. La différence morphologique entre les deux films contribue également à cette différence de mécanisme de reconnaissance.

Les variations cumulées des déphasages en fonction des concentrations d'ions plomb sont présentées dans la Figure. 2.24 pour les deux Capteurs. Les résultats gravimétriques indiquent une augmentation des valeurs du déphasage avec la concentration de Pb^{2+} , jusqu'à des valeurs de saturation de 10^{-6} M

pour AA-PPy-IIP/SAW et 10^{-3} M pour L-Cys-PPy-IIP/SAW. Les sensibilités et limites de détection (LOD) des capteurs conçus étaient respectivement de $(74,6 \pm 38,1)$ [$^{\circ}$ /nM] et 0,1 pM pour le premier et $(31,7 \pm 16,6)$ [$^{\circ}$ /μM] et 21 pM pour le second. Les deux valeurs de LOD sont nettement inférieures à la limite maximale acceptée par l'OMS permettant d'envisager ces deux capteurs chimiques pour l'analyse de la qualité des eaux.

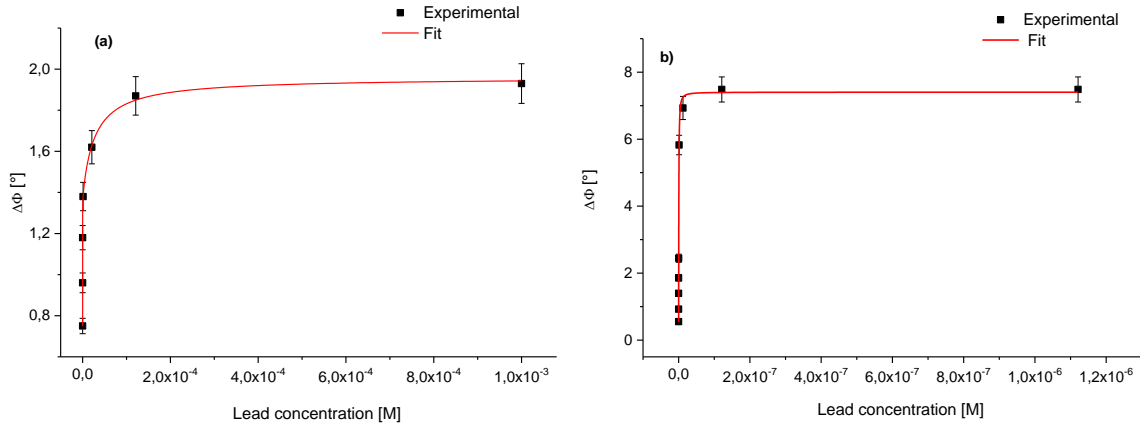


Figure.2.24. Variation cumulée du déphasage en fonction de la concentration des solutions en ions plomb, pour des capteurs SAW fonctionnalisés avec a) L-Cys-PPy-IIP, b) AA-PPy-IIP

L'un des avantages les plus importants de la gravimétrie est la possibilité d'estimer deux paramètres clés étroitement liés à la reconnaissance analytes/couche de détection : la constante de temps cinétique et la constante de dissociation. Les deux sont généralement obtenus à partir d'un ajustement adéquat des réponses gravimétriques du capteur SAW. Il faudra toutefois veiller à ce que l'approche adoptée dans le choix du "modèle d'ajustement" ait une signification "physique réelle" (et non purement mathématique) En outre, les écarts entre les modèles et l'expérience ne doivent pas être importants, pour s'assurer que les constantes de dissociation estimées constituent une représentation fidèle des interactions chimiques mises en jeu.

Dans ce travail, nous avons testé plusieurs modèles (un site, deux sites, Hill et modèle combiné un site / Hill) pour ajuster les données gravimétriques des deux IIP et pour estimer les valeurs des constantes de dissociation. Le modèle le plus approprié était un modèle combiné un site / Hill (équation 2.5).

$$\Delta\Phi(C) = \frac{A_1 \times C}{K_{d1} + C} + \frac{A_2 \times C^\alpha}{K_{d2}^\alpha + C^\alpha} \quad (\text{eq.2.5})$$

$\Delta\Phi$ correspond aux variations de phase, pour une concentration C donnée d'ions Pb^{2+} , K_{d1} et K_{d2} sont les première et deuxième constantes de dissociation, A_1 et A_2 sont des constantes empiriques, et α est le coefficient de Hill.

Pour le capteur à base de L-Cys-IIP (Figure. 2.24a), les constantes de dissociation ont été estimées à : $K_{d1} = (1,1 \pm 0,4) \times 10^{-10}$ M et $K_{d2} = (1,1 \pm 0,8) \times 10^{-5}$ M. Le coefficient de Hill ($0,14 \pm 0,02$), indique des interactions coopératives négatives entre les ions Pb^{2+} et les sites de reconnaissance au sein de la matrice polymère. Dans le cas du capteur fonctionnalisé avec AA-PPy-IIP (Figure. 2.24b), les constantes de dissociation ont été estimées à : $K_{d1} = (1,1 \pm 0,3) \times 10^{-13}$ M et $K_{d2} = (5,9 \pm 1,8) \times 10^{-10}$ M. Le coefficient de Hill, de l'ordre de ($1,22 \pm 0,27$), indique des interactions coopératives positives entre les ions Pb^{2+} et les sites de liaison.

La grande différence entre les constantes de dissociation associées aux deux agents chélateurs est probablement liée à leur configuration spatiale. En effet, grâce aux nombreuses liaisons hydrogène intramoléculaires possibles et aux rotamères à liaison simple, la L-Cys peut adopter plusieurs conformations. Ici, nous pensons que deux conformations structurales de la L-Cys ont été impliquées dans la formation des complexes L-Cys-PPy-IIP. Au contraire, l'acide acrylique, en raison de sa structure simple et unique, peut plus facilement interagir avec PPy via les cations plomb pour former un complexe ternaire, qui ne dépend que de la concentration en Pb^{2+} . Notons que des tests gravimétriques ont été réalisés avec des capteurs SAW fonctionnalisés avec des NIP, sans qu'aucune variation de phase ne soit enregistrée, indiquant que la détection des ions plomb par les deux film IIP se fait spécifiquement par les empreintes.

2.3.3.3 Tests de sélectivité

Des tests de sélectivité ont été réalisés avec des ions divalents de mercure, cadmium, cuivre, zinc et nickel, qui peuvent coexister avec ceux le plomb dans les sols, les rivières et les eaux usées. De plus, leurs rayons ioniques ainsi que leurs propriétés chimiques sont relativement proches de ceux du Pb^{2+} . Pour ces tests, nous avons pris une concentration des ions interférents de 10^{-10} M, dix fois plus importante que celle des ions plomb. Les résultats relatifs au capteur à base de AA, sont exprimés sous forme de pourcentage par rapport à la variation de phase obtenue pour Pb^{2+} et regroupés dans la Figure.2.25. Comme on peut le constater, la réponse du capteur aux interférents est largement inférieure à celle au plomb, alors que leur concentration était 10 fois plus élevée ; montrant la bonne sélectivité du capteur conçu.

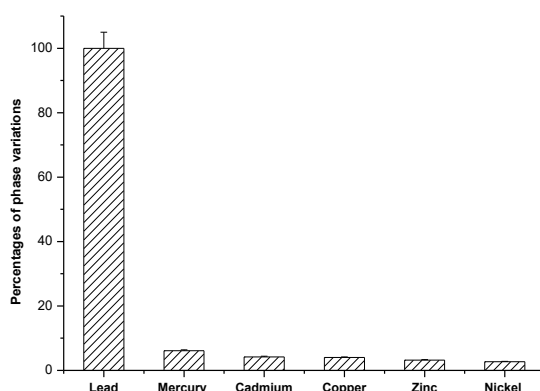


Figure.2.25. Variations relatives de la phase du signal de sortie d'un capteur AA-PPy-IIP/SAW pour différents analytes : $[Pb^{2+}] = 10^{-11}$ M; $[Hg^{2+}] = [Cd^{2+}] = [Cu^{2+}] = [Zn^{2+}] = [Ni^{2+}] = 10^{-10}$ M

Nous avons également testé le capteur SAW fonctionnalisé avec L-Cys-PPy-IIP dans les mêmes conditions et contrairement à ce que nous attendions il n'était pas sélectif. Les pourcentages du déphasage, pour tous les interférents étudiés, atteignaient 60% de la réponse gravimétrique de l'ion plomb. Il est indéniable que ce genre de situation comporte une part importante de frustration liée au fait de devoir écarter un capteur juste pour un défaut de sélectivité, alors qu'il a présenté de bonnes qualités métrologiques et une très bonne capacité de complexation. Cela soulève naturellement la question d'une utilisation de L-Cys-PPy-IIP autrement. Nous avons alors opté pour un changement de technique de transduction en utilisant l'électrochimie au lieu de la gravimétrie. Cela devrait nous permettre de contourner cette limitation liée à la non-sélectivité, étant donné que les valeurs des potentiels caractéristiques des analytes Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Ni^{2+} sont différentes. La sélectivité se faisant ainsi par la technique elle-même, à défaut d'être assurée par la couche de reconnaissance.

2.3.3.3 Détection électrochimique par un capteur basé sur L-Cys-PPy-IIP

Les modes de préparation du polymère L-Cys-PPy et de fonctionnalisation des électrodes sont strictement identiques à ce qui était réalisé pour les capteurs SAW. Les propriétés de détection du capteur électrochimique L-Cys-PPy-IIP ont été vérifiées via des solutions de plomb de concentrations variant de 10^{-11} à 10^{-3} M. Les voltammogrammes correspondants, présentés dans la Figure.2.26, montrent la reconnaissance, comme prévu, des ions plomb par l'électrode L-Cys-PPy-IIP avec une augmentation de l'intensité du pic de courant en fonction de la concentration en ions Pb^{2+} .

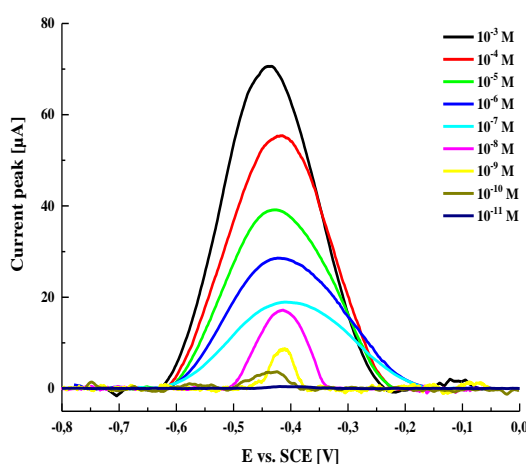


Figure.2.26. Voltammogrammes à ondes carrées des électrodes L-Cys-PPy-IIP enregistrés dans une solution tampon 0,1 M pour différentes concentrations d'ions plomb (durée de l'onde carrée : 0,02 s, amplitude : 2 mV, Impulsion : 50 mV).

Ces variations des pics de courant du plomb peuvent être relevées en fonction de la concentration en ions plomb (Figure.2.27), et ajustées comme pour les résultats gravimétriques, avec un modèle approprié. L'ajustement le plus approprié des données électrochimiques a été obtenu avec un modèle combiné Hill / un site, selon l'équation 2.6.

$$I(C) = \frac{A_3 \times C}{K'_{d1} + C} + \frac{A_4 \times C^\alpha}{K'^{\alpha}_{d2} + C^\alpha} \quad (\text{eq.2.6})$$

$I(C)$ correspond aux variations du pic de courant pour une concentration C donnée d'ions Pb^{2+} , K'_{d1} et K'_{d2} sont les première et deuxième constantes de dissociation, A_3 et A_4 sont des constantes empiriques.

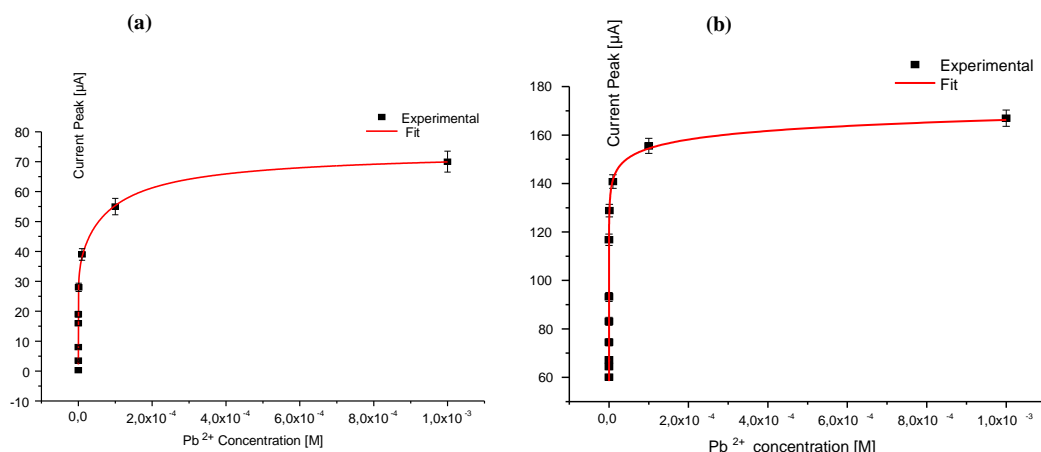


Figure.2.27. Variations de l'intensité des pics courants en fonction de la concentration en ions plomb pour les capteurs fonctionnalisés avec a) L-Cys-PPy-IIP et b) AA-PPy-IIP.

Selon ce modèle combiné, les constantes de dissociation apparentes étaient de l'ordre de $K'_{d1} = (7,6 \pm 3,0) \times 10^{-10}$ M et $K'_{d2} = (1,0 \pm 0,9) \times 10^{-4}$ M, et le coefficient de Hill était de l'ordre de $(0,32 \pm 0,06)$.

Par souci de comparaison nous avons également réalisé un capteur électrochimique fonctionnalisé avec un IIP AA-PPy. Une même procédure et un même traitement des résultats permet d'avoir les constantes de dissociation apparentes $K'_{d1} = (6,5 \pm 3,0) \times 10^{-12}$ M et $K'_{d2} = (2,1 \pm 1,4) \times 10^{-8}$ M, et le coefficient de Hill $\alpha = (0,10 \pm 0,02)$.

Les constantes de dissociation obtenues sont cohérentes avec celles obtenues à partir de mesures gravimétriques.

Les tests de sélectivité ont été réalisés avec les mêmes ions interférents que ceux testés dans les mesures gravimétriques, et comme prévu, le capteur basé sur LCys-PPy-IIP n'était pas spécifique puisqu'il a détecté les ions Hg^{2+} et Cd^{2+} .

Nous avons néanmoins entrepris de tester ce capteur dans une matrice réelle, un échantillon d'eau prélevé dans la rivière Bousselem (dans la ville de Sétif, Algérie). Le voltamogramme SWV obtenu est présenté dans la Figure.2.28, où nous avons ajusté la fenêtre de potentiel entre -0.8 et 0 V, autour de la zone d'intérêt. Ce relevé montre plusieurs pics qui révèlent que la rivière Bousselem contient différents contaminants. Nous avons alors opéré une déconvolution de la réponse électrochimique et identifié ainsi la nature des espèces présentes dans la rivière. Nous retrouvons principalement les ions

plomb, mais aussi l'étain, le nickel et le cobalt (-0,43 V ; -0,49 V ; -0,53 V et -0,60 V). La présence de ces ions lourds est principalement liée aux activités industrielles (industrie de l'électronique et des batteries, usines de briques et de plastique, station de traitement des eaux...) dans la région de Sétif, le long de la rivière Bousselem.

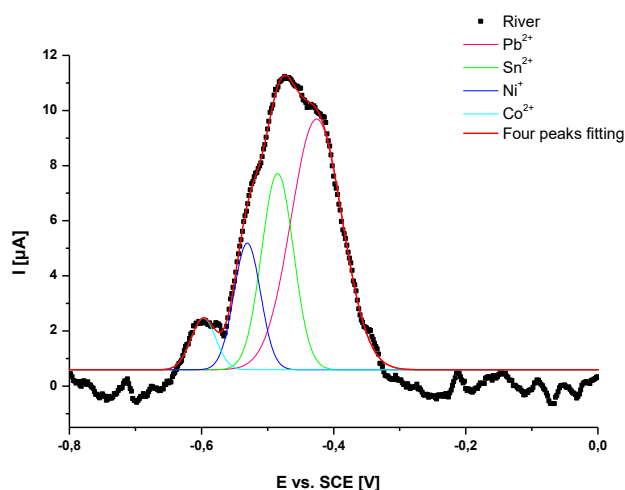


Figure.2.28. Réponse SWV d'un IIP incubé dans un échantillon d'eau de l'oued Bousselem, et la déconvolution gaussienne correspondante (durée d'incubation : 20 min).

Nous avons également étendu la gamme de potentiel jusqu'à 0,3 V pour vérifier la présence du mercure, mais aucun pic caractéristique de Hg^{2+} n'a été observé.

Sur la base de la courbe d'étalonnage présentée en Figure 2.27a, la concentration en ions plomb dans l'oued a été estimée à 14 $\mu\text{g/l}$, une valeur légèrement inférieure à celle détectée 5 ans auparavant, présentée en 2012 par Djazia Sersoub (Sersoub 2012).

Avec ces tests, la sélectivité qui est toujours considérée comme un élément clé dans la conception des capteurs chimiques, pourrait être obtenue différemment. Avec une détermination préalable du potentiel d'oxydation de chaque ion, la déconvolution adéquate d'une réponse électrochimique permet de discriminer plusieurs ions présents dans un milieu aussi complexe qu'une rivière. Cette approche pourrait être généralisée pour détecter d'autres entités chimiques ou biologiques.

2.4. Synthèse et regards critiques

Cette présentation synthétique aborde quelques-unes des applications que nous avons développées durant les 15 dernières années, autour des capteurs chimiques pour l'environnement. Elle n'a donc pas pour finalité de dresser une liste exhaustive de nos travaux, mais d'en révéler suffisamment pour ouvrir la voie à des discussions.

Dans ces applications, l'une ou l'autre des transductions, électrochimique et gravimétrique, sont utilisées en association avec différentes couches de reconnaissance, obtenues par divers procédés de fonctionnalisation. C'est justement là un point clé de cette partie. A savoir, un nombre conséquent de possibilités mettant en jeu des modes de transduction et de fonctionnalisation différents, pouvant être adaptés, changés et/ou optimisés pour obtenir le « meilleur » capteur pour une application donnée.

En considérant par exemple un mode de fonctionnalisation aussi rapide et simple qu'un dépôt par goutte (drop coating) sur des électrodes faciles à fabriquer (un dépôt d'or sur substrat polymère flexible par exemple), nous acceptons de dégrader partiellement une partie des caractéristiques métrologiques, principalement la reproductibilité des dépôts en termes d'épaisseur et d'homogénéité. Toutefois, ce prix peut paraître raisonnable au regard du bénéfice principal de disposer rapidement et facilement de capteurs pouvant servir à esquisser une nouvelle voie. On peut ainsi imaginer toutes les possibilités d'optimisations d'un nouveau procédé de détection avant d'envisager des fonctionnalisations plus élaborées et donc reproductibles.

Un autre point soulevé ici et qui peut être sujet à discussion, celui de la non-sélectivité. Souvent vue comme une limitation, elle pourrait être tournée à notre avantage. Bien sûr la question ne se posera pas quand il s'agira de doser une entité de nature parfaitement connue dans un milieu complexe, disposer de capteurs sélectifs voire spécifiques est primordial. Mais ce n'est pas le cas général dans la mesure où il est très rare de trouver des sites pollués par un seul type de polluants. Et dans ce cas, il devient plus intéressant de disposer en entrée de chaîne de détection/analyse de capteurs à « large spectre », sensibles à une famille de polluants (les ions lourds, les organophosphorés, les halogénures...) plutôt qu'un seul bien identifié. Cela permet une discrimination aisée et rapide entre un site non pollué et un autre site pollué, et de distinguer dans ce dernier cas le type de polluants présents. Il convient ensuite de rétrécir le champ d'investigation pour identifier et doser au sein de la famille identifiée, les différents composés présents.

En considérant des études diversifiées où les expériences ont été confrontées aux calculs numériques, cette présentation se voulait aussi un révélateur de l'interconnexion et l'interdépendance et, *in fine*, la complémentarité des sciences.

Nous avons clairement mis en avant l'apport du calcul à l'expérience, ce qui est indéniable. Mais les apports sont mutuels, l'un enrichissant et s'enrichissant de l'autre. Si on reprend la figure 2.20, qui paraît évidente a posteriori, avec cette bonne corrélation expérience/calcul, cela ne fût pas le cas naturellement. En effet, les premiers calculs étaient effectués en phase gazeuse par ce que c'était plus simple à implémenter et avions, à tort, minimiser l'effet du changement de milieu. Et les premières comparaisons portaient plutôt sur les valeurs des énergies d'interaction en phase gazeuse. Dans ce cas, les énergies d'adsorption étaient toutes négatives indiquant un processus d'adsorption exothermique, c'est-à-dire que les trois complexes formés étaient stables.

La Figure.2.22. destinée à comparer les énergies calculées aux sensibilités expérimentales des capteurs a révélé un désaccord qui nous a amené à reconsidérer l'approche et à intégrer les énergies de solvation. C'est donc l'expérience qui a permis de corriger l'approche de calcul théorique pour enfin de compte arriver à obtenir des résultats concordants.

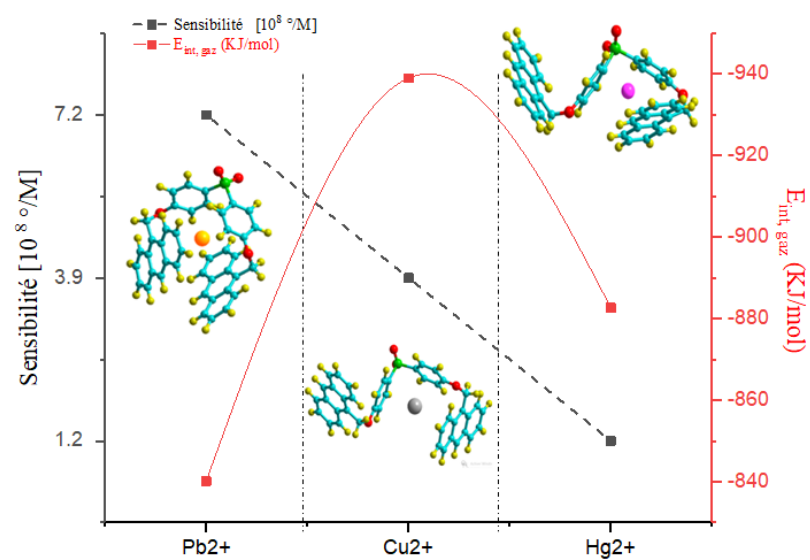


Figure.2.22. Confrontation entre les valeurs expérimentales de sensibilité des capteurs PBS-AN/SAW et les valeurs calculées des énergies d'interaction des complexes PBS-AN/(Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+}) en phase gazeuse.

Références bibliographiques

- Alexander C, Andersson H, Andersson L, Ansell R, Kirsch N, Nicholls I. O, Mahony, J.; Whitcombe, MJ Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. *J Mol Recognit*. 2006;19:106-80.
- Alvarez-Lorenzo C. Handbook of molecularly imprinted polymers: Smithers Rapra; 2013.
- Ayuso-Álvarez A, Simón L, Nuñez O, Rodríguez-Blázquez C, Martín-Méndez I, Bel-Lán A, et al. Association between heavy metals and metalloids in topsoil and mental health in the adult population of Spain. *Environmental research*. 2019;179:108784.
- Bakas I, Fourati N, Zerrouki C, Seydou M, Maouche N, Singh A, et al., editors. Surface acoustic wave sensor based on nickel (II) phthalocyanine thin films for organophosphorous pesticides selective detection. *SENSORS*, 2014 IEEE; 2014: IEEE.
- Barone V, Cossi M, Tomasi J. Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. *Journal of Computational Chemistry*. 1998;19(4):404-17.
- Basova T, Plyashkevich V, Hassan A, Gürek AG, Gümüş G, Ahsen V. Phthalocyanine films as active layers of optical sensors for pentachlorophenol detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2009;139(2):557-62.
- Blöchl PE. Projector augmented-wave method. *Physical review B*. 1994;50(24):17953.
- Chen L, Wang X, Lu W, Wu X, Li J. Molecular imprinting: perspectives and applications. *Chemical Society Reviews*. 2016;45(8):2137-211.
- Cieplak M, Kutner W. Artificial biosensors: How can molecular imprinting mimic biorecognition? *Trends in biotechnology*. 2016;34(11):922-41.
- Cotruvo JA. 2017 WHO guidelines for drinking water quality: first addendum to the fourth edition. *Journal-American Water Works Association*. 2017;109(7):44-51.
- Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira RT, Andrade AJ, Dalsenter PR, Langeloh A. Pre-and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Archives of Toxicology*. 2007;81(9):665-73.
- de Souza JS, Kizys MML, da Conceição RR, Glebocki G, Romano RM, Ortiga-Carvalho TM, et al. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. *Toxicology*. 2017;377:25-37.
- Dickert FL, Lieberzeit PA. Imprinted polymers in chemical recognition for mass-sensitive devices. *Piezoelectric Sensors*: Springer; 2006. p. 173-210.
- Erbahar DD, Gürol I, Gümüş G, Musluoğlu E, Öztürk ZZ, Ahsen V, et al. Pesticide sensing in water with phthalocyanine based QCM sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012;173:562-8.
- Erbahar DD, Harbeck M, Gürol I, Gümüş G, Musluoğlu E, Öztürk ZZ, et al. Zinc phthalocyanines with fluorinated substituents for direct sensing of carbamate and organophosphate pesticides in water. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2013;17(10):989-95.
- Feller D. The role of databases in support of computational chemistry calculations. *Journal of computational chemistry*. 1996;17(13):1571-86.

- Frisch M. Gaussian09. <http://www.gaussian.com/>. 2009.
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian 16 Rev. C.01. Wallingford, CT2016.
- Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon M-C, Séralini G-E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*. 2009;262(3):184-91.
- Grimme S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *Journal of computational chemistry*. 2006;27(15):1787-99.
- Grimme S, Antony J, Ehrlich S, Krieg H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *The Journal of chemical physics*. 2010;132(15):154104.
- Hammer B, Hansen LB, Nørskov JK. Improved adsorption energetics within density-functional theory using revised Perdew-Burke-Ernzerhof functionals. *Physical review B*. 1999;59(11):7413.
- Haupt K. *Molecular Imprinting*: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2012. 350 p.
- IARC TIAfRoC. Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides 2015. Available from: <https://www.iarc.who.int/featured-news/media-centre-iarc-news-glyphosate/>.
- Istamboulie G, Andreescu S, Marty J-L, Noguier T. Highly sensitive detection of organophosphorus insecticides using magnetic microbeads and genetically engineered acetylcholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;23(4):506-12.
- Istamboulie G, Cortina-Puig M, Marty J-L, Noguier T. The use of Artificial Neural Networks for the selective detection of two organophosphate insecticides: Chlorpyrifos and chlorfenvinfos. *Talanta*. 2009;79(2):507-11.
- Jin R, Sun W, Tang S. A DFT study of pyrrole-isoxazole derivatives as chemosensors for fluoride anion. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(9):10986-99.
- Kaur N, Dhaka G, Singh J. Hg 2+-induced deprotonation of an anthracene-based chemosensor: set–reset flip-flop at the molecular level using Hg 2+ and I– ions. *New Journal of Chemistry*. 2015;39(8):6125-9.
- Köksoy B, Akyüz D, Şenocak A, Durmuş M, Demirbas E. Sensitive, simple and fast voltammetric determination of pesticides in juice samples by novel BODIPY-phthalocyanine-SWCNT hybrid platform. *Food and Chemical Toxicology*. 2021;147:111886.
- Kresse G, Hafner J. Ab initio molecular-dynamics simulation of the liquid-metal–amorphous-semiconductor transition in germanium. *Physical Review B*. 1994;49(20):14251.
- Kresse G, Hafner J. Ab initio molecular dynamics for liquid metals. *Physical Review B*. 1993;47(1):558.
- Kresse G, Joubert D. From ultrasoft pseudopotentials to the projector augmented-wave method. *Physical review b*. 1999;59(3):1758.
- Ktari N, Fourati N, Zerrouki C, Ruan M, Seydou M, Barbaut F, et al. Design of a polypyrrole MIP-SAW sensor for selective detection of flumequine in aqueous media. Correlation between experimental results and DFT calculations. *RSC advances*. 2015;5(108):88666-74.

- Lattach Y, Fourati N, Zerrouki C, Fournion J-M, Garnier F, Pernelle C, et al. Molecularly imprinted surface acoustic wave sensors: The synergy of electrochemical and gravimetric transductions in chemical recognition processes. *Electrochimica Acta*. 2012;73:36-44.
- Lattach Y, Fourati N, Zerrouki C, Fournion J, Garnier F, Remita S. Surface acoustic wave sensor combining gravimetric and electrochemical transductions: application for atrazine detection. *Sensor Letters*. 2011;9(6):2249-52.
- Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical review B*. 1988;37(2):785.
- Lotti M, Johnson MK. Neurotoxicity of organophosphorus pesticides: predictions can be based on in vitro studies with hen and human enzymes. *Archives of toxicology*. 1978;41(3):215-21.
- Malitesta C, Di Masi S, Mazzotta E. From electrochemical biosensors to biomimetic sensors based on molecularly imprinted polymers in environmental determination of heavy metals. *Frontiers in chemistry*. 2017;5:47.
- Maouche N, Guergouri M, Gam-Derouich S, Jouini M, Nessark B, Chehimi MM. Molecularly imprinted polypyrrole films: Some key parameters for electrochemical picomolar detection of dopamine. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2012;685:21-7.
- Mazouz Z, Rahali S, Fourati N, Zerrouki C, Aloui N, Seydou M, et al. Highly selective polypyrrole MIP-based gravimetric and electrochemical sensors for picomolar detection of glyphosate. *Sensors*. 2017;17(11):2586.
- Mensah-Brown AK, Wenzel MJ, Bender F, Josse F. Analysis of the absorption kinetics for the detection of parathion using hybrid organic/inorganic coating on SH-SAW devices in aqueous solution. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014;196:504-10.
- Perdew JP, Burke K, Ernzerhof M. Generalized gradient approximation made simple. *Physical review letters*. 1996;77(18):3865.
- Prabhu J, Velmurugan K, Nandhakumar R. Development of fluorescent lead II sensor based on an anthracene derived chalcone. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015;144:23-8.
- Rad AS, Valipour P. Interaction of methanol with some aniline and pyrrole derivatives: DFT calculations. *Synthetic Metals*. 2015;209:502-11.
- Rhouati A, Istamboulie G, Cortina-Puig M, Marty J-L, Noguer T. Selective spectrophotometric detection of insecticides using cholinesterases, phosphotriesterase and chemometric analysis. *Enzyme and microbial technology*. 2010;46(3-4):212-6.
- Sakhraoui HEEY, Mazouz Z, Attia G, Fourati N, Zerrouki C, Maouche N, et al. Design of L-cysteine and acrylic acid imprinted polypyrrole sensors for picomolar detection of lead ions in simple and real media. *IEEE Sensors Journal*. 2019;20(8):4147-55.
- Sersoub D. Aménagement et Sauvegarde de la Biodiversité de la Vallée d'Oued Boussellem* Sétif: Université de Sétif 1-Ferhat Abbas; 2012.
- Shoji R, Takeuchi T, Kubo I. Atrazine sensor based on molecularly imprinted polymer-modified gold electrode. *Analytical Chemistry*. 2003;75(18):4882-6.

Singh DK, Asthana BP, Srivastava SK. Modeling the weak hydrogen bonding of pyrrole and dichloromethane through Raman and DFT study. *Journal of molecular modeling*. 2012;18(8):3541-52.

Wang Y, Qian G, Xiao Z, Wang H, Long L, Wang H, et al. Synthesis and characterisation of anthracene-based fluorophore and its interactions with selected metal ions. *Inorganica Chimica Acta*. 2010;363(10):2325-32.

Yang D, Liu X, Zhou Y, Luo L, Zhang J, Huang A, et al. Aptamer-based biosensors for detection of lead (ii) ion: a review. *Analytical Methods*. 2017;9(13):1976-90.

Ye L. *Molecular imprinting: Principles and applications of micro-and nanostructure polymers*: CRC press; 2013.

Zhou Y, Tang L, Zeng G, Zhang C, Zhang Y, Xie X. Current progress in biosensors for heavy metal ions based on DNazymes/DNA molecules functionalized nanostructures: A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016;223:280-94.

Zouaoui F, Bourouina-Bacha S, Bourouina M, Alcacer A, Bausells J, Jaffrezic-Renault NJ, et al. Electrochemical impedance spectroscopy microsensor based on molecularly imprinted chitosan film grafted on a 4-aminophenylacetic acid (CMA) modified gold electrode, for the sensitive detection of glyphosate. *Frontiers in Chemistry*. 2021;9:263.

Chapitre 3 : biocapteurs pour le diagnostic et des applications médicales innovantes

3.1. Avant-propos

Dans nos différentes études, celles orientées vers le domaine du diagnostic médical précoce comme celles tournées vers la protection de l'environnement, nous avons utilisé l'une ou l'autre de ces deux techniques de transduction, électrochimique et gravimétrique, voire les deux de façons corrélées ou indépendantes. Nous accédons ainsi à des renseignements complémentaires sur les molécules d'intérêt, du point de vue de leur quantification, du suivi de leurs cinétiques de reconnaissance ou encore des estimations des constantes d'association et de dissociations analyte/couche de reconnaissance.

3.2. Les biocapteurs d'ADN

3.2.1. Introduction

L'analyse de l'ADN joue un rôle de plus en plus important dans des domaines aussi variés que le suivi des mutations génétiques (Hájková et al., 2017, Sohrabi et al., 2016), l'analyse de médicaments (Karadurmuz et al., 2017, Kurbanoglu et al., 2016), le diagnostic des maladies infectieuses (Faria et al., 2019, Ilkhani et al., 2018, Singhal et al., 2018), la recherche d'agents pathogènes (Khater et al., 2017, Svitková et al., 2017) ou encore la détection d'ions lourds métalliques (Saidur et al., 2017).

Le concept clé de ces différentes applications repose sur l'hybridation, ou spécificité d'appariement des bases, où des séquences d'acides nucléiques complémentaires (totalement ou partiellement) s'associent pour former des molécules double brins (ou duplex). D'un point de vue expérimental, des oligonucléotides, dont la structure est bien connue (sondes), sont utilisés afin d'identifier des séquences apparentées (cibles).

Les biocapteurs d'ADN les plus « aboutis » sont les puces à ADN, dont le premier prototype a été développé au milieu des années 90 (Skena et al., 1995). Ce sont des réseaux d'ADN sondes déposés sur une surface solide, qui vont s'hybrider avec les brins ADN complémentaires marqués par fluorescence. Une fois l'hybridation terminée, les produits chimiques fluorescents liés aux séquences cibles, sont scannés avec un équipement colorimétrique ou fluorimétrique automatisé, ce qui facilite la détection de leur présence. Les puces à ADN ont eu un impact considérable sur les applications de la génomique et de la protéomique. Elles permettent, par exemple, de mesurer l'expression des gènes de l'ensemble d'un génome, même complexe, en une seule hybridation (Baron et al., 2007). Malgré l'existence de puces à ADN commerciales de plus en plus fiables et de moins en moins chères, et de protocoles d'hybridation et d'analyses standardisées, ces dispositifs présentent de nombreuses limitations, dont une efficacité de marquage limitée et une analyse complexe en plusieurs étapes.

D'autres approches ont été proposées pour suivre l'hybridation des oligonucléotides de façon plus rapide, sensible et sans marquage préalable des cibles (Kowalczyk 2020, Peng et al., 2009, Pyrak et al., 2019, West 2020, Wu et al., 2019). Elles reposent principalement sur l'utilisation des capteurs gravimétriques et électrochimiques. C'est dans ce cadre que s'inscrivent nos études dédiées aux capteurs d'ADN.

La première étape de cette partie est dédiée à la mise au point du biocapteur SAW-ADN. Suivront deux applications dédiées à la détection du polymorphisme de l'apolipoprotéine E et d'analogues d'oligonucléotides à visées thérapeutiques.

3.2.2. Design de biocapteurs SAW-ADN

Le greffage de monocouches thiolées à une surface d'or nécessite un nettoyage préalable du substrat, une étape primordiale pour la réussite du processus d'auto-assemblage et donc la qualité de la monocouche formée (Carvalho et al., 2005). Divers types de prétraitements des surfaces d'or ont été rapportés dans la littérature : mécaniques, thermiques, électro-chimiques et chimiques (Burke et al., 2000, Carvalho, Sanches Freire et al., 2005, Ron et al., 1998a, Ron et al., 1994, Ron et al., 1998b). Le but principal étant d'obtenir une surface propre, sans éventuelles traces de contaminants organiques, et activée. Dans notre cas, nous avons fait le choix de nettoyer la zone sensible des capteurs SAW avec une solution de piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4 / \text{H}_2\text{O}_2$, 1/1 / v/v) pendant 30 min, et de la rincer ensuite copieusement avec l'eau distillée.

Pour cette application, nous avons utilisé le montage double oscillateurs : les oligonucléotides ont été injectés dans la cellule de mesure, et de l'eau désionisée a été injectée dans la cellule de référence pour compenser les paramètres d'influence, notamment la viscosité, la force ionique et la température. Le seul paramètre mesuré est donc la variation de masse induite par le greffage des sondes ou l'hybridation des cibles. Une représentation schématique du capteur d'ADN réalisé dans le cadre de cette étude est illustrée dans la Figure.3.1.a.

3.2.2.1. Immobilisation des sondes ADN

Avant de greffer les sondes, nous avons injecté, à l'aide d'une pompe péristaltique, une solution de chlorure de sodium (0.3 M) à un débit constant de 0,19 mL/min. Le choix de cette concentration a été fait sur la base de précédentes études bibliographiques qui ont rapporté que 0,3 M est la concentration optimale pour le greffage d'ADN sondes¹¹ (Mazouz et al., 2013, Okahata et al., 1998).

Une fois le signal stabilisé, nous avons introduit 10 μl de la sonde (H-S-S- $(\text{CH}_2)_6$ -5'-CCC CCC CCC CTT TTG CAA CCC ACT-3') dans le circuit fluide. La concentration finale des oligonucléotides était égale à 10 $\mu\text{g/ml}$. La variation temporelle de la fréquence, suite à l'injection des sondes, est représentée dans la Figure.3.1.b. Un décalage de fréquence, Δf_{sonde} , de l'ordre de 827 Hz a été enregistré.

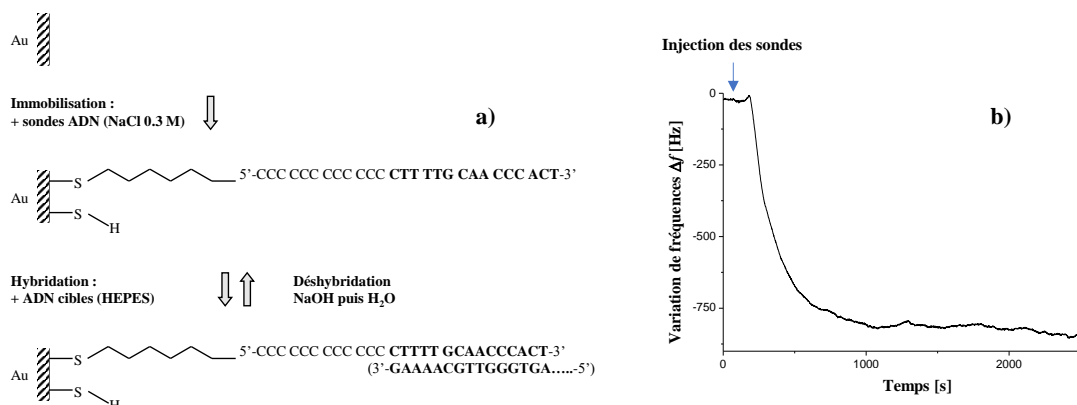


Figure.3.1. a) Représentation schématique des étapes de réalisation du capteur d'ADN. b) Suivi temporel de la variation de la fréquence suite à l'injection des ADN sondes.

¹¹ https://complements.lavoisier.net/9782257204196_genetique-moleculaire-humaine-4-ed_Chapitre7.pdf

La sensibilité du capteur a été calculée à partir de l'équation 3.1 :

$$S = \left| \frac{\Delta f_{\text{Sonde}}}{\Delta m} \right| \quad (\text{eq. 3.1})$$

Dans laquelle la variation de masse Δm a été déduite à partir de la relation :

$$\Delta m = \left| \frac{S_{\text{SAW}} \times M_{\text{Sonde}}}{S_{\text{ADN}} \times N_a} \right| \quad (\text{eq.3.2})$$

S_{SAW} est la surface active de la zone sensible du capteur SAW (13 mm²), M_{Sondes} est le poids moléculaire de la sonde ADN (8700 g / mol), S_{ADN} est la surface moyenne d'un ADN-sonde ($\approx 2,2 \text{ nm}^2$) (Okahata, Kawase et al., 1998) et N_a est le numéro Avogadro. La sensibilité S a été trouvée de l'ordre de (85,4 \pm 5) Hz / ng.

3.2.2.2. Suivi de la réaction d'hybridation

Une fois l'immobilisation des sondes validée, la solution de NaCl (en circulation dans les voies de référence et de mesure) a été drainée et remplacée par une solution à 0.05 M d'HEPES (acide 2-[4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine]éthanesulfonique) dans du NaCl à 0.3 M. L'hybridation a ensuite été initiée par l'injection de 10 μl d'une solution d'oligonucléotide constituée de 36 bases (5'-TTC TTG AAA CAC GGA CCA AGG AGT GGG TTG CAA AAG-3'). Comme pour l'immobilisation, la concentration finale de la solution d'ADN cibles était égale à 10 $\mu\text{g/ml}$. Une variation de phase Δf_{cible} de l'ordre de (578 \pm 12) Hz a été enregistrée à la fin de la réaction d'hybridation.

Les enregistrements des variations temporelles des fréquences normalisées suite aux étapes d'immobilisation des sondes et l'hybridation des cibles sont présentés sur la Figure.3.2. Nous avons modélisé ces variations avec des exponentielles décroissantes de premier ordre pour déterminer les cinétiques des deux réactions. Il en ressort que la constante de temps de la réaction d'hybridation [$\tau = (68 \pm 19) \text{ s}$] est quasiment trois fois plus faible que celle de la réaction d'immobilisation [$\tau = (187 \pm 1) \text{ s}$]. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la formation d'une couche auto-assemblée nécessite plus de temps qu'une reconnaissance entre paires de bases complémentaires.

Le taux d'hybridation τ a ensuite été calculé à partir de la relation :

$$\tau = \frac{\Delta f_{\text{cibles}} \times \Delta m_{\text{Sonde}}}{\Delta f_{\text{Sonde}} \times \Delta m_{\text{cibles}}} \quad (\text{eq. 3.3})$$

M_{cible} est le poids moléculaire des ADNs cibles (11600 g / mol), M_{Sondes} est le poids moléculaire de la sonde ADN (8700 g / mol). Le taux d'hybridation a été trouvé de l'ordre de 51%.

Nous avons étudié par la suite l'effet de la longueur de la cible en testant des oligonucléotides plus courts (15 bases : 5'- AGT GGG TTG CAA AAG-3') et d'autres plus longs (57 bases : 5'- AAT CTT GAA ACA CGG ACC AAG TTC TTG AAA CAC GGA CCA AGG AGT GGG TTG CAA AAG-

3'). En utilisant l'équation (3.3), les taux d'hybridation calculés τ_{15} et τ_{57} étaient de l'ordre de 56% et 44% respectivement.

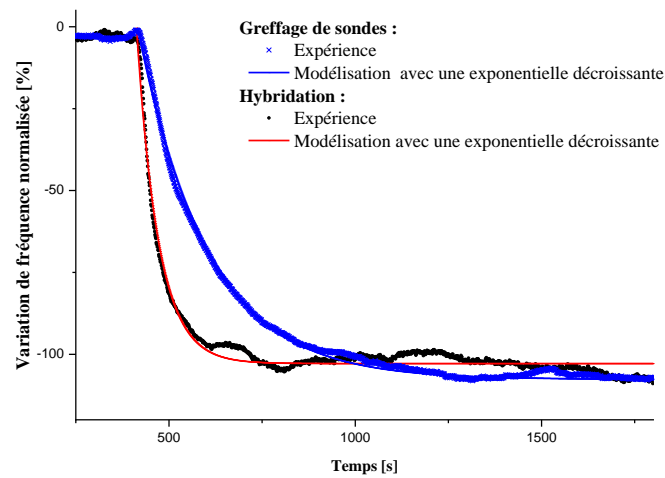


Figure.3.2. Variations normalisées de la fréquence en fonction du temps suite aux étapes d'immobilisation et d'hybridation

Les courbes de variations de fréquences et des rapports d'hybridation des trois cibles étudiées, (Figure.3.3) montrent une variation quasi-linéaire de ces deux paramètres en fonction du nombre de paires de bases, ce qui permet d'envisager la possibilité de détecter des cibles plus courtes.

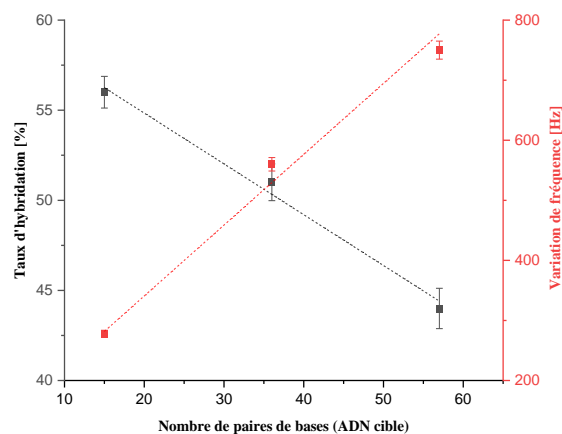


Figure.3.3. Variations des taux d'hybridation et de la fréquence en fonction du nombre de paires de bases des ADNs cibles

3.2.2.3. Régénération du biocapteur d'ADN

La régénération du biocapteur d'ADN passe nécessairement par des étapes de déshybridation (ou dénaturation) qui consistent à séparer les brins d'un complexe double brins par rupture des liaisons

hydrogène qui les maintiennent assemblés. Les techniques les plus courantes sont le chauffage, l'exposition du complexe à un milieu salin ou à un solvant très polaire, ou encore une forte augmentation du pH du milieu. Chacune de ces opérations rend les liaisons hydrogène instables ce qui induit une séparation des brins d'ADN.

Dans notre cas, nous avons fait le choix de régénérer le biocapteur en faisant circuler, en circuit ouvert, une solution de NaOH 0,1 M pendant 1 heure, puis de l'eau désionisée pendant 1 heure. Du point de vue gravimétrique, cette régénération se traduit par une augmentation de la fréquence, comme le montre la Figure.3.4.

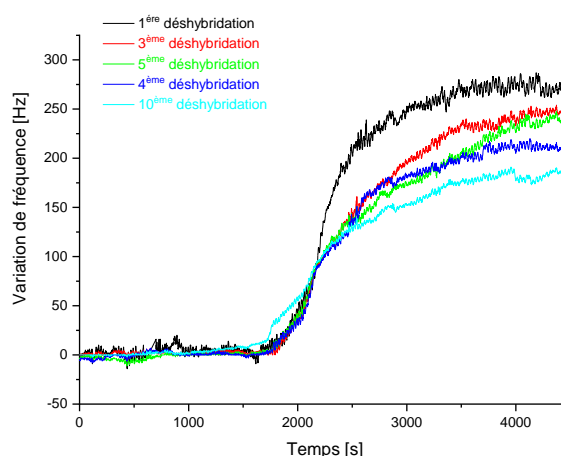


Figure.3.4. Variations temporelles de la fréquence suite à plusieurs régénérations

Plusieurs « cycles » d'hybridation / désybrisation ont été réalisés dans le cadre de cette étude. Le signal de sortie du capteur diminue de 24% après la septième régénération et d'environ 36% après la dixième désybrisation. Le biocapteur d'ADN développé est donc régénérable et renouvelable, jusqu'à une dizaine de fois, avec une baisse d'efficacité limitée et surtout prévisible.

Forts de ces résultats, nous avons envisagé deux applications qui relèvent du domaine médical, la détection d'analogues d'oligonucléotides à visées thérapeutiques, et le suivi du polymorphisme de l'apoE.

3.2.3. Détection d'analogues d'oligonucléotides à visées thérapeutiques

Au-delà du séquençage des oligonucléotides, c'est leur utilisation dans la discipline thérapeutique et les disciplines connexes qui suscitent l'intérêt. Les chercheurs, et notamment ceux travaillant sur la thérapie antisens et les thérapies à triple hélices, se sont donc intéressés à l'étude et à l'utilisation de nucléotides « non-naturels » en tant qu'agents thérapeutiques. Parmi les diverses modifications possibles des brins d'ADN, celles qui ont fait appel à des liaisons internucléosidiques se sont révélées très prometteuses, puisqu'elles rendent le squelette pratiquement insensible à l'hydrolyse acide/alcaline ou enzymatique. Parmi les équipes qui ont travaillé sur ce sujet, celle du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN, Limoges) a synthétisé, pour des visées de thérapie antisens, des analogues d'oligonucléotides dans lesquels les groupements phosphodiester des ADN

naturels ont été remplacés par des groupements triazols (Lucas *et al.*, 2008a, Lucas *et al.*, 2008b). La structure chimique de ces molécules est présentée dans la Figure. 3.5.

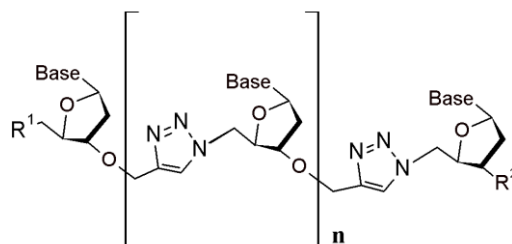


Figure.3.5. Oligonucléosides possédant une unité triazolique en tant que lien internucléosidique se substituant aux liaisons phosphodiester.

Un dimère ($n=0$), un trimère ($n=1$) et un tétramère ($n=2$) ont été synthétisés au sein du LCSN. Il était donc important de vérifier, à ce stade, si les tétrathymidines synthétisés présentaient une complémentarité avec des oligonucléotides naturels avant d'envisager la synthèse d'analogues d'oligonucléotides avec un plus grand nombre de bases. C'est ce que nous avons entrepris en utilisant les capteurs SAW associés à une chaîne de mesure en double oscillateurs.

Dans la première partie de cette étude, nous avons suivi l'hybridation d'ADNs « naturels ». Les sondes ont été choisies de manière à avoir une répartition uniforme des séquences -AAAA-, tout le long de la chaîne, ce qui permettrait par la suite de tester les oligothymidines ($n = 0, 1$ et 2).

Les séquences d'ADN sondes et cibles utilisées sont les suivantes :

- sonde : H-S-(CH₂)₆-5'-CCC CTT TTA AAA CAC TAA AAG GTC CTA AAA ACC TAA AAA CCT-3'
- cible : 5'-AGG TTT TTA GGT TTT TAG GAC CTT TTA GTG TTT T-3'.

L'immobilisation des sondes et l'hybridation des cibles ont été réalisées selon les procédures présentées dans le paragraphe 3.2.2. Les décalages de fréquences correspondants étaient de l'ordre de (840 ± 12) Hz et (590 ± 10) Hz. La constante de temps de la réaction d'hybridation, déterminée à partir d'une modélisation de la courbe de variations temporelles de la fréquence avec une exponentielle décroissante, était de l'ordre de 500 s, deux fois plus faibles que celle correspondant au greffage des sondes. Le taux d'hybridation, calculée à partir de l'équation 3.3 était de l'ordre de 56%, en accord avec nos précédents résultats.

Pour tester la complémentarité entre les ADN sondes et les azido-oligothymidine, nous avons utilisé le même capteur après l'avoir régénéré selon le procédé présenté dans le paragraphe 3.2.2.3. La complémentarité entre la sonde ADN et les analogues di-, tri- ou tetranucléotide a été ensuite étudiée. Une solution tampon HEPES a été systématiquement ajoutée après chaque ajout d'analogue, afin d'exclure un éventuel effet d'injection. L'ensemble des résultats est présenté dans la Figure.3.6.

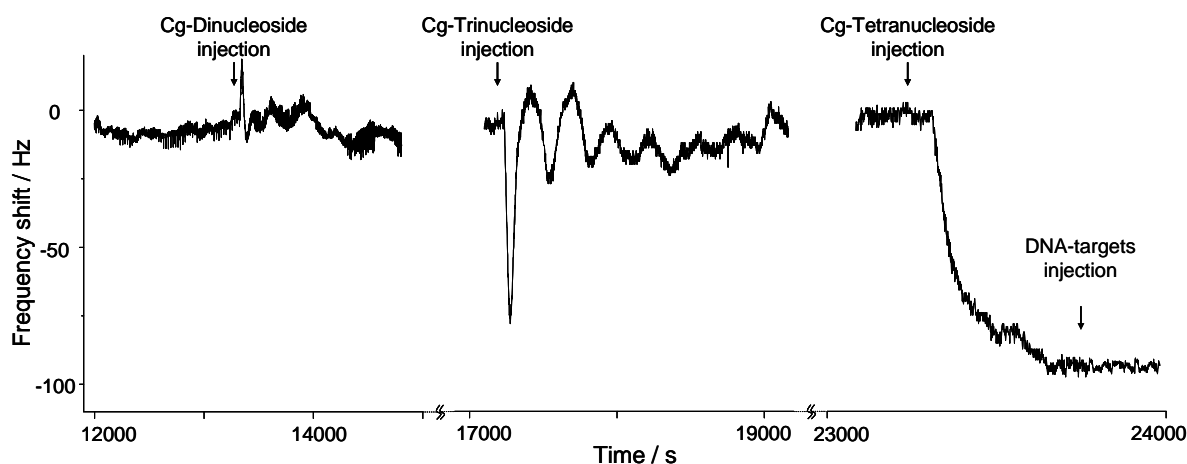


Figure.3.6. Variations temporelles de la fréquence suite à l'injection des di, tri et tetra nucléosides.

Il en ressort qu'aucun effet ne s'est produit après l'injection de dinucléotides. L'injection de trinucléotides a été suivie, quant-à-elle, d'oscillations amorties probablement dues à des liaisons instables, et ce malgré l'affinité naturelle entre la thymine et l'adénine. En revanche, l'injection des tétranucléotides a induit un décalage de fréquence de 96,3 Hz. Cette valeur est plus faible que celle enregistrée avec l'ADN « naturel », du fait que le nombre de bases impliquées dans la réaction d'hybridation est plus faible (34 bases pour l'ADN « naturel » et 4 x 4 bases pour les tétrathymidine). Une injection supplémentaire d'ADNs cibles (sans régénération préalable du capteur) n'a entraîné aucun changement de fréquence, ce qui montre que des liaisons hydrogène thymine-adénine ont bien été formées et qu'il n'y a plus de sites libres sur la sonde.

Sur la Figure. 3.7, nous avons représenté les variations temporelles de fréquences normalisées suite à l'injection d'ADNs cibles et de tétrathymidine. Les constantes de temps ont été estimées à (68 ± 19) s pour les ADNs et (59 ± 3) s pour les tétrathymidines. Ce capteur a été régénéré trois fois, et les constantes de temps, des réactions des hybridations des ADN, étaient quasiment constantes, aux incertitudes près.

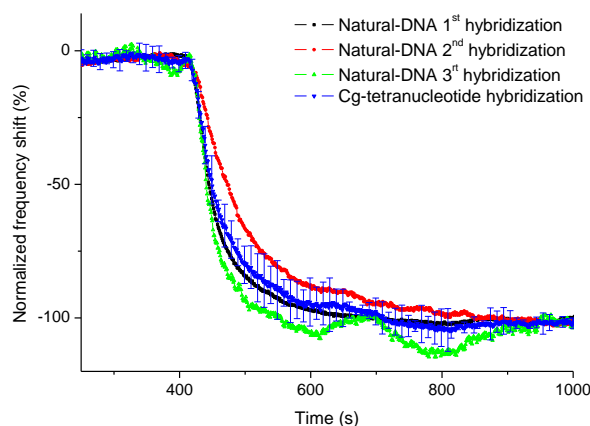


Figure.3.7. Variations temporelles des fréquences normalisées suite à l'injection d'ADNs cibles et de tétra thymidine

Ces essais de complémentarité nous ont donc permis de mettre en évidence, pour la première fois, une hybridation entre un oligonucléotide et un analogue nucléotidique. Un minimum de quatre bases était cependant nécessaire pour obtenir un complexe stable (Zerrouki *et al.*, 2010).

En dépit du nombre plus important d'atomes dans l'unité triazolique qu'un phosphodiester, il apparaît qu'il y a suffisamment d'espace et de flexibilité dans ce nouveau lien internucléosidique pour permettre une hybridation avec les bases adénines complémentaires.

3.2. 4. Détection d'un mésappariement ponctuel (SBM) dans une séquence d'ADN

L'information génétique, contenue dans l'ADN des cellules, peut subir spontanément ou sous l'action d'agents mutagènes, de nombreuses mutations, qui peuvent avoir des conséquences considérables pour le métabolisme cellulaire, pouvant aller jusqu'au déclenchement de cancers chez les eucaryotes supérieurs. L'identification précise de mésappariement dans les séquences d'ADN est donc d'une importance capitale pour l'étude de variants de phénotype / génotype et ainsi apporter des informations qui peuvent être utiles dans des applications cliniques, biologiques, industrielles et autres.

Les techniques conventionnelles, comme le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Nakashima *et al.*, 2003) l'hybridation inverse (Kleter *et al.*, 1999), la polarisation de fluorescence (Simeonov *et al.*, 2002), l'électrophorèse sur gel (Simeonov and Nikiforov 2002) et la spectrométrie de masse (Li *et al.*, 2011) sont toutes robustes, fiables et capables de discriminer une mutation au niveau d'une seule base (que nous appellerons SBM pour Single Base Mismatch dans la suite de ce manuscrit). Elles sont cependant onéreuses, consommatrices de temps, et nécessitent de « grandes » quantités d'ADN. C'est pour pallier ces inconvénients que des biocapteurs d'ADN électrochimiques (Ito *et al.*, 2007, Moradi *et al.*, 2013, Moradi *et al.*, 2016, Nasirizadeh *et al.*, 2011) et gravimétriques (Rasheed *et al.*, 2016, Tombelli *et al.*, 2000, Xu *et al.*, 2012) ont été développés. Ils offrent en effet plusieurs avantages : simplicité de mise en œuvre, faible coûts, détection en temps réel et sans marquage préalable des cibles.

C'est dans ce cadre que nous avons développé deux biocapteurs, un électrochimique et un gravimétrique, pour la détection du polymorphisme de l'apolipoprotéine E (ApoE), une protéine impliquée dans plusieurs pathologies neurodégénératives, cardiovasculaires et métaboliques. La détermination de son génotype permet donc non seulement de diagnostiquer avec précision la nature de la maladie concernée, mais aussi et surtout de la prédire suffisamment tôt pour augmenter significativement les chances de succès des traitements préconisés.

Trois isoformes majeurs peuvent être distingués pour l'ApoE : E2, E3 et E4, liés à deux sites polymorphes sur les codons 112 et 158 du gène situé sur le chromosome 19. Ces isoformes résultent de trois allèles, ϵ_2 , ϵ_3 et ϵ_4 , qui peuvent se combiner en six génotypes possibles (trois homozygotes et trois hétérozygotes : ϵ_2/ϵ_2 , ϵ_3/ϵ_3 , ϵ_4/ϵ_4 , ϵ_3/ϵ_2 , ϵ_4/ϵ_3 et ϵ_4/ϵ_2) correspondant à six phénotypes protéiques différents. En faisant le choix de travailler avec 2 sondes différentes, sonde 1 et sonde 2, il nous a été donc possible d'examiner les deux positions où le polymorphisme a lieu.

La sonde 1 (5'-CAGGCGGCCGCACACGTCCTCCA-3') est caractéristique des allèles ϵ_3 et ϵ_2 entourant le codon 112. Ses cibles parfaitement complémentaires (PC) sont les génotypes E2E2,

La sonde 2 (5'-CACTGCCAGGCGCTTCTGCAGGT-3') est quant à elle caractéristique des allèles $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ délimitant le codon 158. Ses génotypes PC sont les E3E3, E4E4 et E3E4, celui présentant 2 brins avec des SBM est le E2E2 et ceux présentant une combinaison d'un PC et d'un SBM sont les E2E3 et E2E4.

a) En vue de la transduction électrochimique

Les électrodes de travail ($S \approx 1 \text{ cm}^2$) ont été fonctionnalisées selon le protocole de (Gustavsson *et al.*, 2008). Elles ont été tout d'abord nettoyées dans un bain à ultrasons pendant 10 min dans un mélange de 2-propanol et tétrahydrofurane (1:1, v/v) puis séchées sous flux d'azote. Une solution de piranha (98% H_2SO_4 / 30% H_2O_2 , 1:1, v/v) a été ensuite déposée sur les surfaces des électrodes pendant 30 min. Cette opération a été suivie par un rinçage copieux à l'eau distillée puis par une immersion des électrodes pendant 4 h à 4°C dans un mélange 1 : 3 de CCl_4 et $n\text{-C}_7\text{H}_{16}$ auquel a été ajouté une solution 0.01 M de $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{ClO}_2\text{Si}$. Les électrodes ont été ensuite lavées, pour éliminer l'excès de silane, et puis immergées, pendant une nuit, dans une solution de HCl 37% (Figure.3.8).

Les surfaces des électrodes modifiées ont été activées par immersion, pendant 15 minutes, dans une solution d'éthanol contenant du chlorhydrate de 1-(3- diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbimide (EDC 0,1 M) et du pentafluorophénol (PFP 0,2 M). Les sondes ADN ont été par la suite directement déposées sur les électrodes fonctionnalisées pendant une heure à température ambiante. L'excès d'oligonucléotides non greffés a finalement été éliminé par un rinçage abondant au PBS (Figure.3.8).

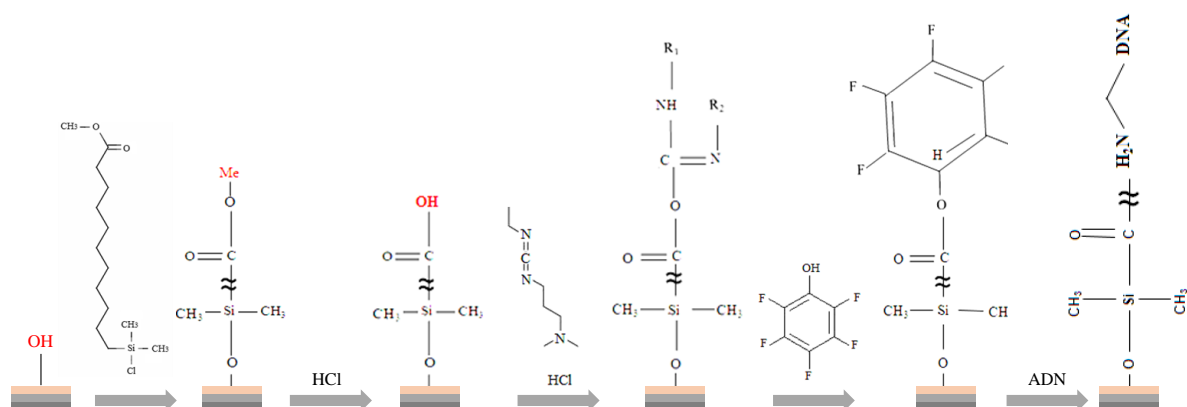


Figure.3.8. Schéma de fonctionnalisation des électrodes électrochimiques

Les réactions d'hybridation ont été suivies via l'enregistrement des variations de la capacité électrochimique en fonction du potentiel appliqué. Cette technique consiste à appliquer une rampe de tension aux bornes de la structure, de façon à se placer, successivement dans les trois régimes de polarisation : inversion, désorption et accumulation. Les mesures capacitatives ont été effectuées à une fréquence fixe de 10 kHz et avec une modulation de 10 mV. Une tension de polarisation continue de -4 V à 4 V a été appliquée aux structures de Si/SiO₂/Si₃N₄. Signalons qu'en dépit de la valeur de fréquence relativement élevée, les états d'interface rapides arrivent à suivre des signaux jusqu'à des fréquences de l'ordre du MHz.

Les caractéristiques C(V) permettent en effet de renseigner sur les différents phénomènes qui se produisent à la surface de l'électrode et notamment les phénomènes d'hybridation. Pratiquement, une injection d'une solution d'oligonucléotides à une concentration donnée, engendre un décalage « horizontal » de la courbe C(V), ou /et une variation de la capacité d'accumulation. Cette dernière peut être aussi bien une diminution, qui traduit le changement de l'épaisseur du diélectrique (cas des molécules biologiques neutres et apolaires), ou une augmentation qui traduit un changement de la permittivité diélectrique totale (cas d'insertion des molécules polaires dans la matrice d'un gel ou d'un polymère).

Un autre paramètre important a été étudié dans le cadre de ce travail : le potentiel de bandes plates V_{FB} , déterminé à partir de la relation de Mott-Schottky (Albery *et al.*, 1996, Gelderman *et al.*, 2007, Michaels 2013, Mott 1939, Schottky 1935). Suivant le signe des charges spécifiquement adsorbées, on assiste soit à un déplacement positif (cas des cations) ou négatif (cas des anions) de V_{FB} sur l'axe des potentiels.

En théorie, la capacité mesurée dans une solution électrolytique inclut celle de la couche diffuse du semi-conducteur (C_{SC}), celle de la couche d'Helmholtz ($C_{Helmholtz}$) et celle de la couche diffuse de Gouy-Chapman (C_{GC}), comme le montre l'équation 3.4 :

$$\frac{1}{C_{mesuré}} = \frac{1}{C_{Helmoltz}} + \frac{1}{C_{GC}} + \frac{1}{C_{SC}} \quad (\text{eq. 3.4})$$

Dans notre cas, il est possible de négliger $C_{Helmholtz}$ (très grande à cause de la faible épaisseur de la couche d'Helmholtz) et C_{GC} car la solution électrolytique est concentrée.

L'équation de Mott-Schottky (eq. 3.5) peut dans ce cas s'écrire sous la forme de :

$$\frac{1}{C_{SC}^2} = \frac{2}{e \epsilon_0 \epsilon_{SC} N_d} \times \left(|V - V_{FB}| - \frac{KT}{e} \right) \quad (\text{eq. 3.5})$$

e est la charge d'un électron, ϵ_0 est la permittivité du vide, ϵ_{SC} est la permittivité diélectrique relative du semi-conducteur, N_d est la densité des donneurs, V est le potentiel appliqué, V_{FB} est le potentiel de bandes plates, K est la constante de Boltzman et T est la température absolue.

Le potentiel de bandes plates peut donc s'obtenir en traçant la variation de l'inverse du carré de la capacité en fonction du potentiel appliqué.

Expérimentalement, nous avons placé le substrat de Si/SiO₂/Si₃N₄ fonctionnalisé avec des sondes ADN dans un montage potentiométrique à trois électrodes, puis procédé à des ajouts d'ADN à différentes concentrations allant de 0.14 à 4.3 μM. Nous avons suivi ensuite les variations de la capacité C en fonction du potentiel V pour une concentration donnée de cibles.

b) En vue de la transduction gravimétrique

Nous avons utilisé un capteur SAW intégré dans une chaîne de mesure impulsionnelle. Ce sont donc les variations temporelles de la phase Φ, à une fréquence donnée de l'ordre de 104 MHz, qui ont été enregistrées. L'ensemble des solutions (NaCl, tampons PBS, ADNs sondes et cibles) a été acheminé sur la zone sensible du capteur SAW à un débit constant de 0,19 ml/min.

Le même protocole que celui présenté dans le paragraphe 3.2.2.1, a été utilisé pour l'immobilisation des sondes : un flux continu d'une solution de NaCl (0.3 M) a été pompé sur la zone sensible du capteur, et une fois les signaux stabilisés, nous avons injecté les sondes thiolées. La solution de NaCl a été ensuite drainée, et remplacée par un tampon PBS, et les cibles d'ADN ont été par la suite injectées (Mazouz, Fourati et al., 2013).

10 μl de PBS (le même volume que celui des ADN) ont été systématiquement introduits 600 s après l'ajout des oligonucléotides pour prouver l'absence d'effet d'injection. Toutes les expériences ont été répétées au moins 5 fois pour avoir une estimation des incertitudes de nos mesures.

3.2.4.2. Détection d'une mutation ponctuelle dans une séquence d'ADN

Avant de détecter les polymorphismes génétiques de l'ApoE dans des ADN extraits du sang humain et amplifiés par PCR, nous avons suivi l'hybridation de cibles parfaitement complémentaires (PC), non complémentaires (NC) et présentant un SBM, et ce aussi bien pour la sonde 1 que la sonde 2. Les séquences des ADNs sondes et cibles sont regroupées dans le Tableau 3.1.

Tableau 3.1. Séquences des ADNs sondes et cibles

	Sonde 1 5'-CAG GCG GCC GCA CAC GTC CTC CA-3'	Sonde 2 5'-CACTGC CAG GC G CTT CTG CAG GT-3'
Oligo 3 3'-GTC CGC CGG CGT GTG CAG GAG GT-5'	(PC)	(NC)
Oligo 4 3'-GTC CGC CGG CG C GTG CAG GAG GT-5'	(SBM)	(NC)
Oligo 3b 3'-GTG ACG GTC CGC GAA GAC GTC CA-5'	(NC)	(PC)
Oligo 2 3'-GTG ACG GTC CG T GAA GAC GTC CA-5'	(NC)	(SBM)

Afin de comparer les résultats des mesures gravimétriques, nous avons fait le choix de les exprimer en termes de taux d'hybridation τ , calculé à partir de la relation 3.3. Les valeurs obtenues sont regroupées dans le Tableau 3.2.

Tableau 3. 2. Valeurs des taux d'hybridation τ pour les différentes sondes et cibles.

τ	PC	Présence d'un SBM	NC
Sonde 1	$(92 \pm 5) \%$	$(83 \pm 4) \%$	$(0 \pm 2) \%$
Sonde 2	$(88 \pm 4) \%$	$(75 \pm 4) \%$	$(0 \pm 2) \%$

Ces résultats montrent clairement que le capteur SAW est capable de distinguer parfaitement entre une complémentarité totale et une non-complémentarité. Cependant, la différence entre complémentarité totale et partielle est moins significative. Deux questions peuvent donc être posées :

- 1) Le capteur gravimétrique est-il suffisamment sensible pour détecter un SBM ?
- 2) Compte tenu de la différence entre les valeurs des taux d'hybridation des sondes 1 et 2 avec leurs SBM respectifs, peut-on lier l'absence de discrimination d'une mutation à sa nature et/ou à sa position dans une séquence ADN ?

Pour répondre à la première question, nous avons effectué des mesures de capacité $C(V)$ sur Les électrodes de $\text{Si/SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$, et nous avons calculé les valeurs de sa variation relative par rapport à la concentration d'ADN. Les valeurs de $\frac{\Delta C/C_0}{[\text{ADN}]}$ sont regroupées dans le Tableau 3.3, C_0 étant la valeur de la capacité avant l'injection des cibles.

Tableau 3.3. Valeurs de $\frac{\Delta C/C_0}{[\text{ADN}]}$ pour les différentes sondes et cibles

$\frac{\Delta C/C_0}{[\text{ADN}]}$	PC	Présence d'un SBM	NC
Sonde 1	(5.81 ± 0.56)	(1.21 ± 0.11)	(0.06 ± 0.01)
Sonde 2	(5.06 ± 0.50)	(0.61 ± 0.05)	(0.06 ± 0.02)

Ces résultats montrent que le capteur électrochimique, réalisé dans le cadre de ce travail, peut parfaitement distinguer une complémentarité totale, d'une non-complémentarité ou d'une mutation au niveau d'une seule base. Ceci peut être attribué au fait que l'hybridation entraîne à la fois des variations des propriétés diélectriques et des modifications de conformation dans la couche proche de la surface de l'électrode, et par conséquent des variations de la réponse électrique de l'électrode.

Ayant réussi à détecter les mutations au niveau d'une seule base, nous avons entrepris d'étudier l'effet de la nature et de la position de la mutation dans la séquence ADN. Signalons à ce niveau que plusieurs études électrochimiques ont conclu à une meilleure détection d'un SBM quand il est placé au milieu plutôt qu'à l'extrémité d'une séquence (He *et al.*, 2012, Mehrgardi *et al.*, 2011, Shamsi *et al.*, 2010). Nous avons choisi de suivre, par voie gravimétrique et électrochimique, l'hybridation de la sonde 2 avec des cibles contenant plusieurs types mutations impliquant la guanine "G" (GG, GA et GT) situées soit au milieu soit à l'extrémité de la séquence. Le détail des séquences étudiées est présenté ci-après. Les SBM sont soulignés, afin de simplifier la lecture, et les trimères sonde/cible sont écrit en tête de chaque ligne.

CGC/GAG 3'- GTG ACG GTC CGA GAA GAC GTC CA-5' (GA au milieu de la séquence)

CGC/GGG 3'-GTG ACG GTC CGG GAA GAC GTC CA-5' (GG au milieu de la séquence)

AGG/TTC 3'-GTG AGG GTC CGC GAA GAC GT CA-5' (GT à la fin de la séquence)

AGG/TAC 3'-GTG ACG GTC CGC GAA GAC GA CA-5' (GA à la fin de la séquence)

AGG/TGC 3'-GTG ACG GTC CGC GAA GAC GTG CA-5' (GG à la fin de la séquence)

La Figure.3.9 représente les variations du taux normalisé d'hybridation et de la capacité relative en fonction de la nature et de la position du mismatch « G ». Il apparaît clairement que les valeurs associées aux oligonucléotides situés au milieu, à l'exception du mismatch GT, sont plus faibles que celles associées à une complémentarité totale.

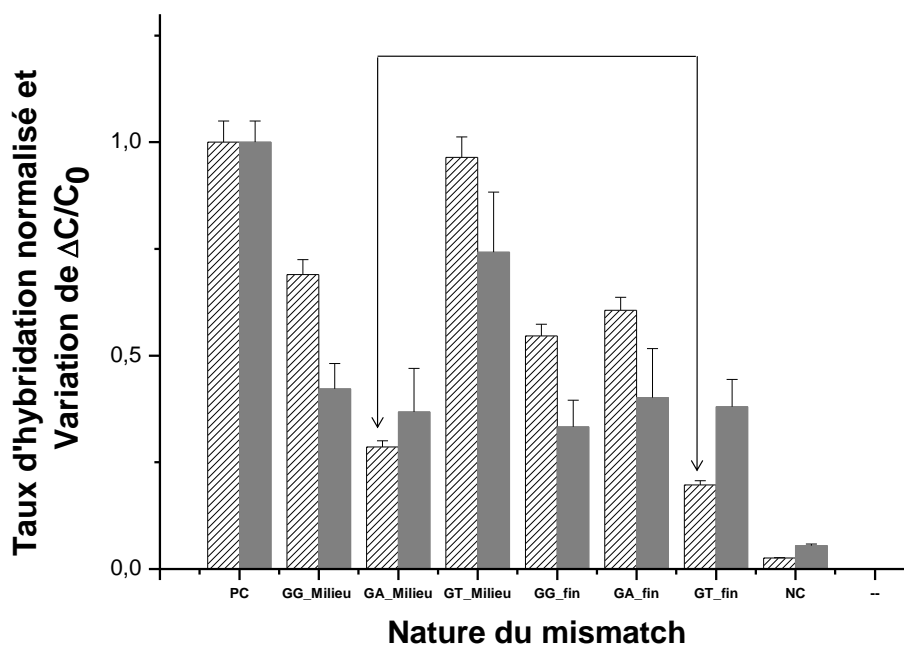


Figure.3.9. Variations des taux d'hybridation (colonnes rayées) et de la capacité relative (colonnes grises pleines) par rapport à la nature et la position du mismatch.

La Figure.3.9 met aussi en évidence le fait que le capteur gravimétrique est capable de discerner, mieux que le capteur électrochimique, entre des mismachs GA et GG selon qu'ils soient placés au milieu ou en fin de séquence. Il est donc plus sensible à la position et à la nature du mismatch. Ce qui montre toute la complexité de l'interprétation des résultats issus des biocapteurs, mais surtout tout l'intérêt d'utiliser plusieurs modes de transductions différents en complémentarité. Pour interpréter les résultats gravimétriques, nous avons utilisé le modèle du plus proche voisin (Near Neighbors), qui a mis en évidence le fait que les différentes liaisons hydrogène et l'empilement dans les mésappariements GT, GG et GA entraînent des tendances thermodynamiques différentes. Allawi et Santa Lucia Jr ont ainsi montré que le trimère $\underline{\text{CGC}} / \underline{\text{GTG}}$, est le plus stable de point de vue thermodynamique (Allawi *et al.*, 1997). Ce résultat permet donc d'expliquer le fait que le mésappariement GT, placé au milieu de nos séquences, présente le taux d'hybridation le plus important (Figure 3.9). La même équipe a estimé dans une autre étude les variations d'enthalpie libres pour 16 séquences de trimères uniques contenant le mismatch GA (Allawi *et al.*, 1998). Ils ont constaté que la séquence $\underline{\text{CGC}} / \underline{\text{GAG}}$ placée en fin de séquence est plus stable que celle placée au milieu, résultat en parfait accord avec nos valeurs de taux d'hybridation de GA.

Le dernier type de mismatch, GG, a été quant à lui étudié par plusieurs groupes, notamment par Peyret *et al.* qui ont conclu que le trimère $\underline{\text{GGC}} / \underline{\text{CGG}}$ placé au milieu est plus stable que les autres, confirmant, là aussi, nos données gravimétriques (Peyret *et al.*, 1999).

3.2.4. Application au cas clinique : suivi du polymorphisme de l'apoE

Nous avons choisi pour cette application de considérer la variation de la capacité relative en fonction de la concentration de trois génotypes de l'ApoE : E3E3, E2E2 et E3E2 (Figure.3.10). Ici le biocapteur électrochimique a été fonctionnalisé avec la sonde 2.

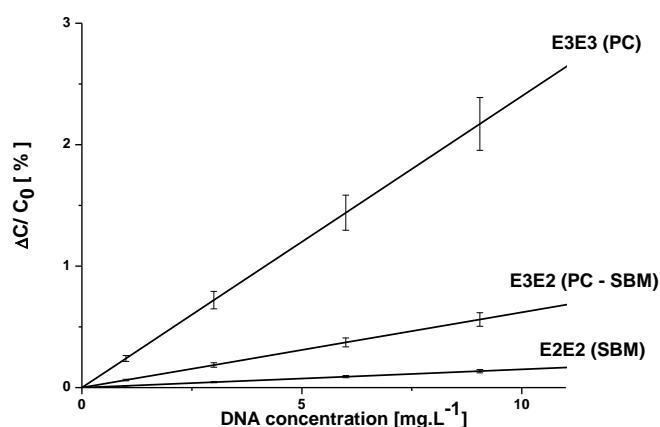


Figure.3.10. Suivi de la variation de la capacité relative en fonction de la concentration d'ADN cible pour trois échantillons réels. Le biocapteur électrochimique a été fonctionnalisé avec la sonde 2

Comme on peut le remarquer, dans la Figure.3.10., la discrimination entre les différentes configurations est nette. En effet, pour les génotypes E3E3 qui présentent une complémentarité totale (vis-à-vis de la sonde2) et E2E2 qui présente une mutation au niveau d'une seule base, la sensibilité du capteur est de l'ordre $(2,41 \pm 0,23) \text{ L.g}^{-1}$ et $(0,15 \pm 0,02) \text{ L.g}^{-1}$ respectivement. Cette différence

(un rapport 14 entre les deux valeurs de sensibilité) permet de discriminer parfaitement une complémentarité totale d'une complémentarité partielle dans le cas d'échantillons réels.

Nous avons également évalué la réponse du biocapteur vis-à-vis de ces trois génotypes en étudiant la variation de ΔV_{FB} en fonction de la concentration des ADN cibles. Les résultats obtenus sont illustrés sur la Figure.3.11.

De même que pour la capacité de la structure, nous remarquons que la réponse du biocapteur réalisé, en termes de variations du potentiel de bandes plates, permet de distinguer clairement une complémentarité parfaite d'une complémentarité partielle : le rapport entre les deux réponses étant de l'ordre de 10. Par ailleurs, pour le génotype E3E2 qui combine les deux configurations (PC- SBM), la réponse du capteur se situe à une valeur intermédiaire aussi bien pour $\frac{\Delta C}{C_0}$ que pour ΔV_{FB} .

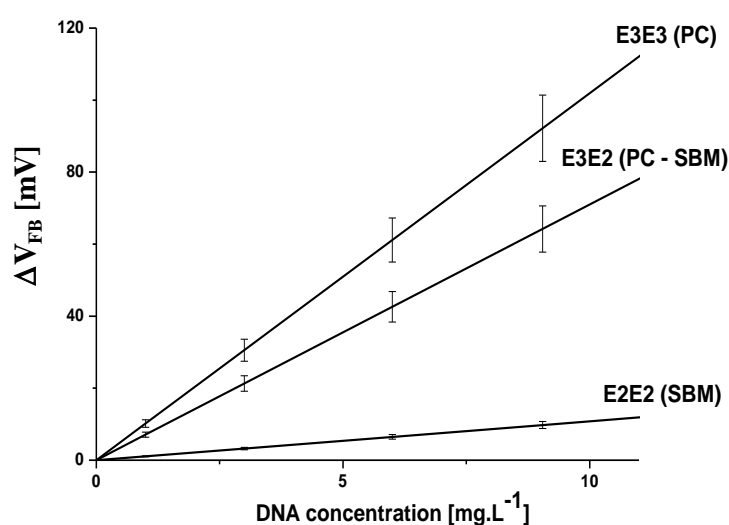


Figure.3.11. Suivi de la variation du potentiel de bande plate en fonction de la concentration d'ADN cible pour trois échantillons réels. Le biocapteur électrochimique a été fonctionnalisé avec la sonde 2.

Nous avons étudié par la suite la réponse du biocapteur électrochimique fonctionnalisé avec la sonde 1 vis-à-vis des génotypes suivants : E2E2, E3E3, E2E4 et E4E4. Les variations de la capacité relative et du potentiel de bandes plates en fonction des différentes concentrations (résultats non présentés dans ce rapport) confirment ceux obtenus précédemment, à savoir la capacité de notre biocapteur à distinguer sans ambiguïté des structures parfaitement complémentaires de celles présentant une mutation au niveau d'une seule base, et même ceux qui combinent les deux configurations (PC-SBM).

Les différentes mesures électrochimiques et gravimétriques, menées en complémentarité sur différents types d'oligonucléotides, ont ainsi mis en évidence la possibilité de discriminer parfaitement une complémentarité parfaite, d'une complémentarité partielle et une non-complémentarité. En outre, ces deux modes de transduction ont montré leur potentiel pour différencier les réponses des capteurs selon la nature et la position de la mutation dans la séquence ADN considérée. Cette approche nous a permis de discriminer sans ambiguïté des résultats relatifs à

une complémentarité parfaite de ceux traduisant une complémentarité partielle avec la mutation d'une seule base, pour des échantillons réels caractéristiques de l'ApoE.

3.3. Intérêt de la détection des protéines et applications

Le développement des capteurs de protéines comme ceux d'ADN devient de plus en plus indispensable pour explorer des questions d'une grande complexité des processus biologiques aussi bien en physiologie qu'en pathologie humaine. Les propriétés structurales des protéines leur confèrent des rôles différents et importants dans ces processus. Les protéines sont, en effet, constituées de plusieurs acides aminés, dont la séquence détermine la structure primaire propre à chaque protéine. La rotation des atomes des acides aminés d'une chaîne protéique caractérise sa structure secondaire alors que les différentes liaisons (hydrogène, hydrophobes, électrostatiques, covalentes...) pouvant s'établir entre ses acides aminés non consécutifs déterminent sa structure tertiaire. Au cas où plusieurs chaînes peptidiques sont reliées, la molécule protéique résultante est dotée en plus d'une structure quaternaire. Les liaisons de la structure quaternaire sont les mêmes que celles de la structure tertiaire. C'est ainsi que ces structures déterminent le rôle structural et/ou fonctionnel de la protéine considérée. Parmi les rôles importants que peuvent avoir certaines protéines dans l'organisme, on distingue :

- Un rôle structural, du fait qu'elles participent à la formation des membranes des cellules et des organites, au renouvellement des tissus musculaires, de la peau, des phanères (poils, ongles et cheveux) et de la matrice osseuse etc...
- Des rôles fonctionnels, dont :
 - La digestion, la biosynthèse et le métabolisme cellulaire, trois fonctions assurées par les enzymes. Sans ces protéines, la plupart de ces processus physiologiques se dérouleraient en effet très lentement, voire pas du tout ;
 - Le contrôle et la régulation de certains processus physiologiques, tels que la croissance, les niveaux de glucose dans le sang et la reproduction ;
 - Le transport d'oxygène dans l'organisme, par le biais de l'hémoglobine ;
 - La reconnaissance et, éventuellement, la destruction de pathogènes, deux fonctions assurées par les immunoglobines ;
 - Le dépistage et le suivi de l'évolution de traitements de certaines pathologies, comme les maladies neurodégénératives et les cancers, et ce à travers la mesure précise de la (ou des) concentration(s) de biomarqueur(s). Ces protéines peuvent aussi donner des indications sur le risque de développer ultérieurement d'un type particulier de pathologie, ou encore informer sur la nature et la gravité d'une tumeur donnée.

C'est ce dernier volet qui sera traité dans ce chapitre. Nous nous sommes en effet intéressé.e.s au développement de capteurs électrochimiques pour la détection du PSA, Prostate Specific Antigen, une protéine, utilisée dans la pratique hospitalière quotidienne, en tant que biomarqueur pour le dépistage et le suivi du traitement du cancer de la prostate. Ce travail s'est effectué dans le cadre du projet PHC Utique 16G0808 « Développement de capteurs gravimétriques et électrochimiques pour

la détection de nouveaux biomarqueurs tumoraux et des polymorphismes associés au cancer de la prostate ». Seuls les résultats électrochimiques seront présentés dans le cadre de ce manuscrit.

3.3.1. Eléments de contexte concernant le cancer de la prostate

Les données de 2020 de l'organisation mondiale de la santé ont révélé que les cancers masculins les plus diagnostiqués en Europe, sont ceux de la prostate, du poumon, du colon, de l'estomac et de la vessie¹². En France, ils représentaient 14,1 % du nombre de nouveaux cas pour les deux sexes (tout âge confondu) et 25,4 % du nombre de nouveaux cas chez les hommes (tout âge confondu)¹³. Le cancer de la prostate est généralement suspecté lorsqu'une masse est trouvée dans la prostate, après un toucher rectal, et/ou une concentration dans le sérum de PSA supérieure à la valeur seuil de 10 ng/mL. Actuellement, la confirmation du diagnostic est obtenue principalement à partir du score de Gleason après biopsie (Chistiakov *et al.*, 2018). Les causes de ce cancer ne sont pas encore totalement identifiées, mais les chercheurs ont trouvé plusieurs facteurs qui pourraient augmenter le risque de le contracter, dont l'âge (Badal *et al.*, 2020), les antécédents familiaux (Barber *et al.*, 2018), l'origine ethnique (Taitt 2018), le régime alimentaire (Kaiser *et al.*, 2019), et l'obésité (Bandini *et al.*, 2017).

Bien qu'il puisse être traité à un stade précoce, le cancer de la prostate (CP) devient résistant et difficile à prendre en charge à un stade avancé. Il est donc essentiel de faire un diagnostic rapide et précis avant le processus de la métastase. Plusieurs technologies fiables, sensibles et présentant de faibles limites de détection sont utilisées pour le dépistage du cancer de la prostate. Il s'agit notamment de l'ELISA (Arya *et al.*, 2018), de la PCR (Dietrich *et al.*, 2013) de la chromatographie et de la spectrométrie de masse (Chen *et al.*, 2019, Zhang *et al.*, 2013). Le « golden standard » est la technologie immunologique ELISA, utilisée en milieu hospitalier, pour doser le PSA. Cependant, l'ELISA présente un certain nombre de limitations, dont la dépendance aux réactifs marqués, la sensibilité aux variations de températures, la difficulté de faire des mesures exploratoires, puisque son principe repose sur l'utilisation de plaques, des durées d'analyses relativement longues, et surtout le fait que les mesures ne peuvent pas se faire in-situ. Ce qu'on attend donc d'un biocapteur est qu'il soit un dispositif fiable, sensible, simple d'utilisation, et capable de fournir des résultats d'analyse en un temps court (quelques secondes à quelques minutes) aux cliniciens. Divers types de biocapteurs ont ainsi été développés pour répondre à ces exigences, avec des transductions optiques (Kim *et al.*, 2019, Ouhibi *et al.*, 2021, Xiao *et al.*, 2020, Yang *et al.*, 2018), gravimétriques (Hwang *et al.*, 2017, Kwak *et al.*, 2019, Uludağ *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2015), magnétique (Feng *et al.*, 2019, Proença *et al.*, 2019, Rong *et al.*, 2019, Zourob *et al.*, 2017) et principalement électrochimiques (Jolly *et al.*, 2016, Traynor *et al.*, 2020). Les plus faibles limites de détection étaient de l'ordre du fg/ml (Kavosi *et al.*, 2015, Moon *et al.*, 2014, Sharafeldin *et al.*, 2017, Tang *et al.*, 2017), et les durées des mesures variaient de quelques secondes (Sun *et al.*, 2016) à 2 h30 (Yu *et al.*, 2006). Divers types de biocapteurs ont été réalisés dans le cadre de notre projet PHC, les premiers étant des immunocapteurs électrochimiques.

¹² <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/908-europe-fact-sheets.pdf>

¹³ <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/27-Prostate-fact-sheet.pdf>

3.3.2. Conception et réalisation d'immunocapteurs pour la détection du PSA

Les mesures électrochimiques ont été réalisées avec un potentiostat CHI 650 et un système conventionnel à trois électrodes composé d'une électrode de travail en oxyde d'indium-étain, ITO, d'une électrode de référence au calomel saturé et d'une électrode auxiliaire en platine.

Les mesures de spectroscopie d'impédance ont été effectuées au potentiel d'équilibre de 200 mV, sans polarisation externe, dans une gamme de fréquences allant de 0,1 Hz à 10 kHz avec une amplitude de 10 mV. Les voltammogrammes à onde carrée ont été enregistrés dans une gamme de potentiel allant de 0 à +0,6 V / SCE avec une fréquence de 15 Hz et une amplitude d'impulsion de 25 mV. Toutes les mesures électrochimiques ont été effectuées à pH 7,4 dans une solution de PBS à 0,01 M contenant 0,1 M de KCl et 10 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$. Toutes les expériences ont été répétées au moins 5 fois pour avoir une estimation des incertitudes de répétabilité de nos mesures.

Deux techniques de fonctionnalisation ont été adoptées dans le cadre de cette étude. La principale différence entre elles est liée à l'ajout de nanoparticules d'oxyde de fer¹⁴ suite à la modification chimique des surfaces d'ITO. Ce choix a été motivé par les raisons et hypothèses suivantes : i) les IONP sont biocompatibles et possèdent des propriétés physiques et chimiques remarquables, ii) elles permettraient d'augmenter la surface spécifique dans le milieu de détection, et donc la densité de biomolécules greffées, ce qui se traduirait par une diminution de la valeur de limite de détection, et iii) elles faciliteraient le transfert d'électrons entre les sondes redox et la surface de l'électrode, ce qui augmenterait, *in fine*, la valeur de sensibilité lors de détection du PSA. Aurait-on donc les résultats escomptés ? C'est ce que nous avons cherché à vérifier dans la suite de ce travail.

3.3.2.1. Nettoyage et fonctionnalisation des électrodes d'ITO

Les électrodes d'ITO ont été tout d'abord plongées dans un bain d'acétone, puis dans l'éthanol et après dans l'eau ultrapure pour éliminer les impuretés organiques (15 min pour chaque étape). Elles ont été par la suite immergées, pendant 1 heure, dans une solution de KOH 5 M afin de polir chimiquement leurs surfaces (Ismail *et al.*, 2016). Les électrodes ont été ensuite immergées dans une solution RCA [NH_4OH (28%), H_2O_2 (30%), H_2O , 1 :4 :20 v/v/v) pendant 30 min à 60°C, et rincées abondamment à l'eau ultra pure. Une solution de Piranha (98% H_2SO_4 / 30% H_2O_2 , 3 :1 v/v) a été enfin déposée sur les substrats pendant 2 min afin de favoriser la formation de fonctions -OH sur les surfaces ITO (Kumar *et al.*, 2011). Un agent de couplage époxy silane, le 3-(glycidoxypropyl) triméthoxysilane (GPTMS) a été choisi pour la modification de la surface de l'ITO. La silanisation a été réalisée en plongeant les électrodes fraîchement nettoyées, dans une solution de 2% de GPTMS dans le toluène pendant une nuit à température ambiante (25° C). Les substrats ont ensuite été rincés plusieurs fois au toluène puis à l'eau ultra pure, pour éliminer les traces de GPTMS non greffées, puis séchés sous azote. Les électrodes modifiées ont ensuite été séchées pendant une heure dans un four à 120°C.

L'ensemble des étapes de nettoyage et de modification des surfaces d'ITO a été suivi et validé par impédancemétrie (Blel *et al.*, 2016) et par microscopie à force atomique, pour le suivi des changements topographiques des surfaces (résultats non présentés dans ce rapport).

¹⁴ Appelées IONPs dans la suite de ce rapport pour Iron Oxyde Nano Particules

L'immobilisation des anticorps sur les surfaces des transducteurs est le point clé qui assure un fonctionnement précis d'un biocapteur donné. Comme précisé précédemment, deux stratégies d'immobilisation des anticorps ont été proposées dans le cadre de ce travail. Dans la première, nous avons déposé les anticorps anti PSA (200 µg/ml), pendant une nuit à 4 °C, sur les surfaces d'ITO modifiées. Les surfaces fonctionnalisées ont été ensuite délicatement rincées avec le PBS pour éliminer les anticorps qui ne se seraient pas greffés.

Dans la seconde stratégie, nous avons plongé les électrodes d'ITO/GPTMS, pendant 2 heures, dans une solution aqueuse contenant 2 mg/ml d'IONP préalablement modifiées avec l'APTES¹⁵ (Blel *et al.*, 2017), puis nous les avons rincées abondamment avec de l'eau ultrapure. Les électrodes d'ITO/GPTMS/IONPs/APTES ont ensuite été incubées, à 4°C pendant une nuit, dans une solution d'anticorps anti-PSA (200 µg/mL) préalablement activées par EDC¹⁶ (4 mg/ml) / NHS¹⁷ (11 mg/ml) pendant 15 min à 37°C. Les surfaces fonctionnalisées ont finalement été rincées plusieurs fois avec du PBS pour éliminer les anticorps non greffés.

Un schéma, résumant des différentes étapes de modification chimique des surfaces d'ITO et des deux techniques de fonctionnalisation, est présenté dans la Figure.3.12.

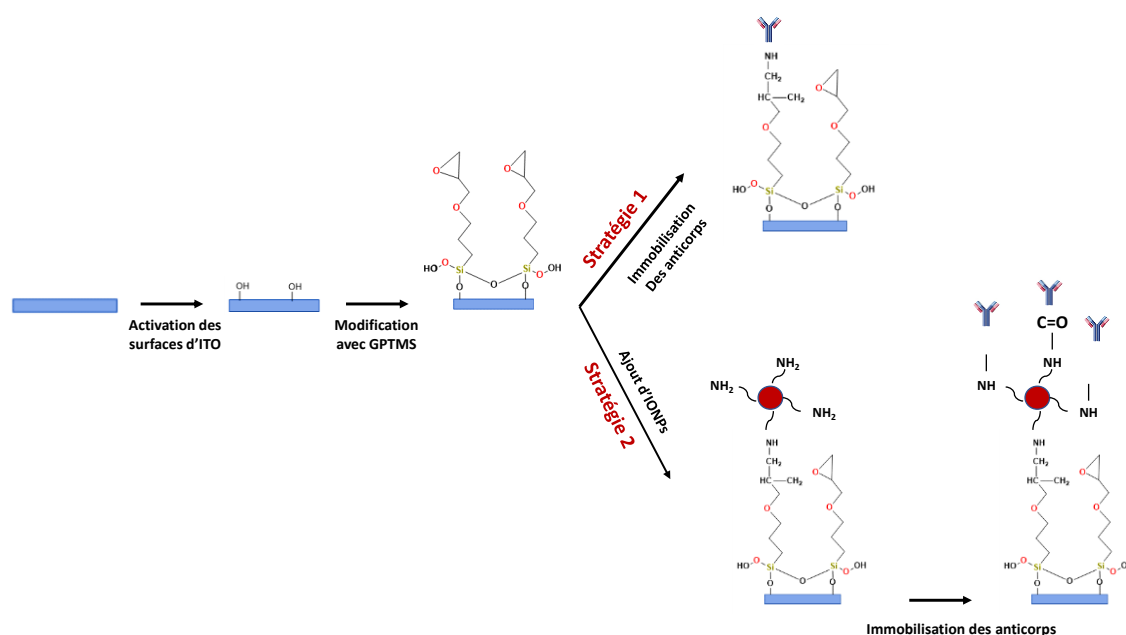


Figure.3.12. Schéma représentatif des différentes étapes de modification des surfaces d'ITO et des deux stratégies de fonctionnalisation

Ces deux processus de fonctionnalisation ont été suivis par une étape de « blocage » avec le BSA¹⁸ (1%) pendant 1 heure afin d'éviter toute adsorption non spécifique du PSA sur la surface des électrodes.

¹⁵ APTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane

¹⁶ EDC : 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride

¹⁷ NHS : (N-hydroxysulfosuccinimide)

¹⁸ BSA : Bovine Serum Albumine

Nous avons ensuite déterminé la concentration de PSA dans des milieux de plus en plus complexes : le tampon PBS en premier, afin de s'affranchir d'un éventuel effet des interférents, le sérum synthétique par la suite, et le sérum humain à la fin.

3.3.2.2. Etudes comparatives de détection du PSA dans différents milieux physiologiques

a) Dans un tampon PBS

Les premières mesures électrochimiques de détection de PSA ont été faites par spectroscopie d'impédance (EIS) et par voltammétrie à ondes carrées (SWV) dans un tampon physiologique (le PBS). La durée d'incubation de PSA (optimisée au préalable par différentes mesures électrochimiques) était de 15 min ; et la gamme de concentration étudiée s'étendait de 10 fg/ml à 1.66 ng/ml. L'ensemble des résultats des mesures, relatives aux deux immunocapteurs, est présenté dans la Figure.3.13.

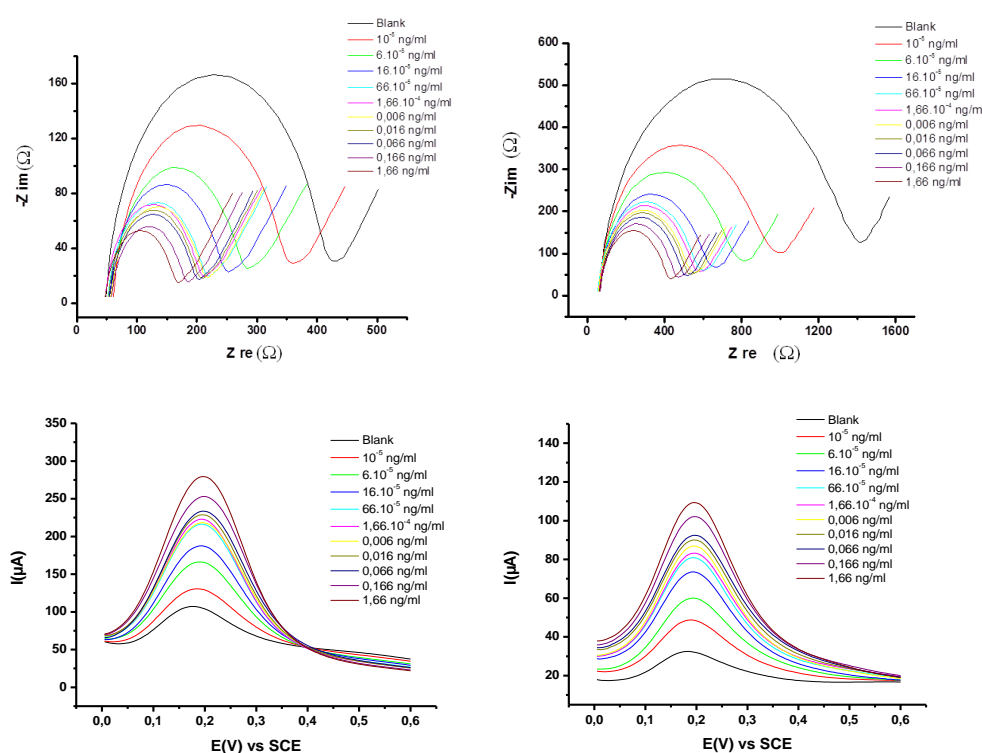


Figure.3.13. Réponses impédimétriques et ampérométriques en présence (à gauche) et en absence des IONPs (à droite) suite à la détection de PSA dans le PBS. Mesures faites dans du PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

Il en ressort qu'une augmentation de la concentration de PSA entraîne une diminution des valeurs de résistance de transfert de charge (obtenues à partir des mesures EIS) et une augmentation des pics de courant (enregistrés à partir des spectres de SWV), ce qui confirme la formation réussie d'un complexe immunologique entre le PSA et l'anti-PSA, dont la principale conséquence est l'augmentation de transfert des électrons vers l'électrode en raison du changement de la conformation de PSA durant la reconnaissance avec l'anticorps (Okuno *et al.*, 2007). La valeur de limite de détection (LOD) des deux types d'immunocapteurs était de l'ordre de 10 fg/ml, une valeur

comparable aux plus faibles valeurs rapportées dans la littérature (Andoy *et al.*, 2018, Chang *et al.*, 2016, Feng *et al.*, 2017, Moon, Kim *et al.*, 2014).

Dans la suite de ce rapport, nous avons fait le choix de ne présenter que les résultats des mesures ampérométriques obtenues à partir de la SWV. Sur la Figure.3.14 sont présentées les variations de $\Delta I = I - I_{\text{blank}}$ en fonction des concentrations de PSA, I_{blank} étant la valeur de pic de courant avant l'ajout de PSA.

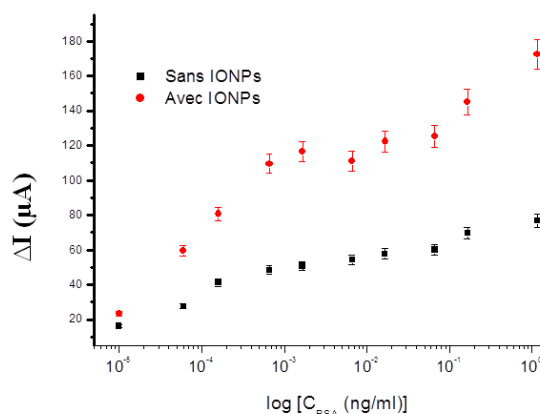


Figure.3.14. Variations de ΔI en fonction de la concentration de PSA dans du PBS.
Mesures faites dans le PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

La Figure 3.14 montre que les formes des courbes de réponse sont similaires indépendamment de la stratégie de fonctionnalisation considérée. Cependant, les valeurs de sensibilité S , calculées à partir de la pente à l'origine de chacune des deux courbes, sont 3 fois plus élevées pour le capteur fonctionnalisé avec des nanoparticules de fer : $S_{\text{Avec IONPs}} = (45,2 \pm 1,6) \mu\text{A} \cdot \text{fg}^{-1} \cdot \text{ml}$ et $S_{\text{Sans IONPs}} = (18,0 \pm 1,9) \mu\text{A} \cdot \text{fg}^{-1} \cdot \text{ml}$.

b) Détection dans le sérum artificiel

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons travaillé sur la détection de PSA dans un sérum artificiel, le Tris, contenant des protéines sériques. Les mêmes types de mesures électrochimiques que celles présentées précédemment ont été réalisés dans les mêmes conditions opératoires. Les variations de ΔI en fonction de la concentration de PSA sont présentées dans la Figure.3.15.

Les résultats indiquent que les valeurs de ΔI diminuent d'un ordre de grandeur par rapport à celles observées dans du PBS ; les valeurs de sensibilités seront donc plus faibles que celles obtenues précédemment. Néanmoins, les deux biocapteurs réalisés détectent toujours le PSA avec des concentrations aussi basses que 10 fg/ml.

Les valeurs de sensibilité étaient de l'ordre de $(9,9 \pm 0,5) \mu\text{A} \cdot \text{fg}^{-1} \cdot \text{ml}$ pour l'immunocapteur avec IONPs et $(0,7 \pm 0,3) \mu\text{A} \cdot \text{fg}^{-1} \cdot \text{ml}$ pour le capteur sans IONPs, confirmant ainsi notre hypothèse de départ.

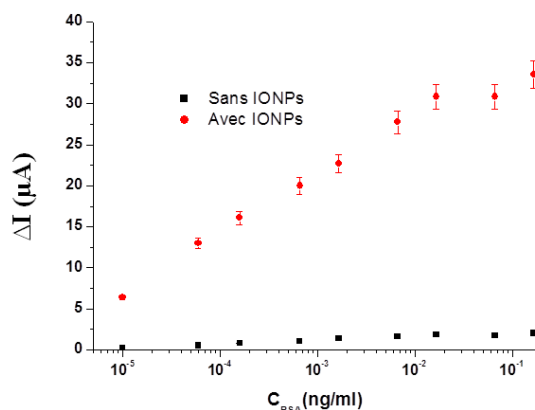


Figure.3.15. Variations de ΔI en fonction des concentrations de PSA dans le sérum artificiel. Mesures faites dans du PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$

c) Détection de PSA dans le sérum humain

Différentes études ont rapporté la détection du PSA dans le sérum humain. Cependant, dans la plupart des cas le sérum était dilué de 5 à 20 fois (Chikkaveeraiah *et al.*, 2011, Zani *et al.*, 2011). Ici, nous avons fait le choix de détecter le PSA dans le sérum humain sans dilution. Les résultats des mesures électrochimiques sont présentés dans la Figure.3.16. Il en ressort que : i) les deux types de capteurs sont parfaitement capables de détecter le PSA dans un milieu aussi complexe que le sérum humain, ii) comme observé pour le sérum artificiel, nous avons noté une diminution importante des valeurs de ΔI qui pourrait être attribuée au fait que la reconnaissance entre espèces biologiques est « relativement complexe » dans le sérum humain.

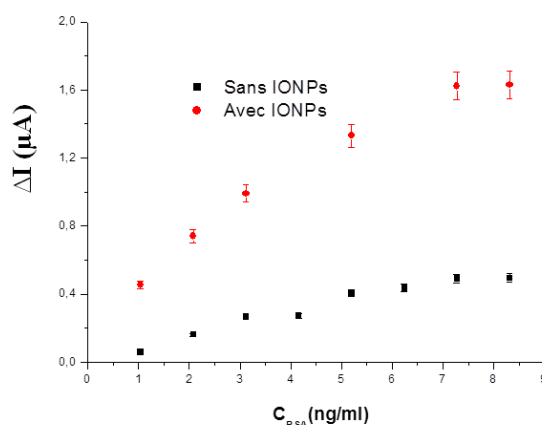


Figure.3.16. Courbes de variations de ΔI en fonction de la concentration de PSA dans un sérum humain non dilué. Mesures faites dans le PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $Fe(CN)_6^{3-/4-}$

Sur la base de ces résultats, nous avons choisi de faire des mesures avec l'immunocapteur le plus sensible, c'est-à-dire fonctionnalisé avec des nanoparticules de fer, et de présenter les résultats en termes de variations normalisées du pic de courant, $\Delta I / I$, pour s'affranchir des effets de la composition du sérum. Une courbe de calibration, moyenne obtenue à partir de mesures dans 3 sérums différents, est présentée dans la Figure.3.17.

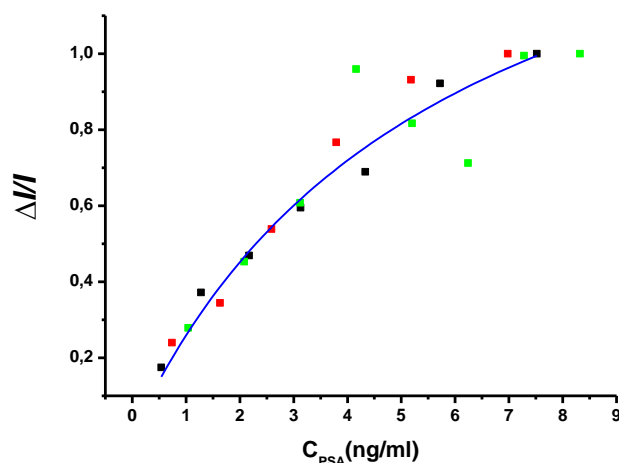


Figure.3.17. Courbe de calibration obtenue à partir de la moyenne de mesures faites sur 3 sérums différents.
Mesures faites dans le PBS 0.01 M à pH 7,4 contenant 0.1 M de KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$

La modélisation de cette courbe avec un modèle mathématique de type one site (eq.3.4) a permis de déterminer la valeur de constante de dissociation K_d , qui permet de renseigner sur l'affinité entre anticorps et antigènes :

$$y(C) = \frac{A \times C}{K_d + C} \quad (\text{eq.3.4})$$

A est une constante, C est la concentration de PSA dans le sérum et K_d est la constante de dissociation. K_d a été trouvée de l'ordre de (5.79 ± 1.39) ng/ml, une valeur supérieure à celle trouvée par la technologie ELISA de l'ordre de 0,3 ng/ml (Oto *et al.*, 2020). Cette différence peut être attribuée à la variabilité de la composition des sérums étudiés.

La dépendance de la valeur de constante d'affinité à la technique de transition est indéniable, mais qu'en est-il de l'effet de la technique de fonctionnalisation des surfaces ? Pour répondre à cette question, nous avons développé un nouveau biocapteur fonctionnalisé avec un polymère à empreintes moléculaires (MIP) pour la détection de PSA.

3.3.3. Conception et réalisation d'un biocapteur fonctionnalisé avec un polymère à empreintes moléculaires pour la détection du PSA

Malgré les nombreuses difficultés rencontrées lors de la détection d'ions et de petites molécules, la relative « simplicité » de mise en œuvre et la robustesse des polymères à empreintes moléculaires (MIP) ont motivé les chercheurs pour développer des matériaux synthétiques capables de reconnaître spécifiquement, ou à défaut avec une grande sélectivité, des entités biologiques de plus en plus

complexes, comme les peptides (Bossi *et al.*, 2012, Cenci *et al.*, 2018, Hoshino *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2020), les virus (Karthik *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2017, Soufi *et al.*, 2021, Zaidi 2021), les cellules (Patel *et al.*, 2020, Piletsky *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2019), ou encore les protéines, objet de ce rapport.

Plusieurs chercheurs ont essayé de porter un point de vue critique concernant la détection des protéines avec des polymères à empreintes moléculaires, en présentant à chaque fois leurs avantages et principales limitations (Culver *et al.*, 2017, Dabrowski *et al.*, 2018, Erdőssy *et al.*, 2016, Puiu *et al.*, 2017). Il en ressort que la réussite de construction d'un MIP dépend de plusieurs paramètres, dont un choix judicieux :

- Du (ou des) monomère(s) fonctionnel(s), capable(s) de former des interactions covalentes, semi-covalentes ou d'hydrogène avec la protéine d'intérêt (template). Ce choix conditionnera la configuration spatiale du complexe MIP/template, et permettra de prédire sa stabilité. C'est d'ailleurs pour cette raison que plusieurs équipes de recherche ont recours à la modélisation moléculaire préalablement à la synthèse de leurs MIPs. A notre connaissance, il n'existe actuellement que deux stratégies de modélisation dédiées au MIP : i) le template est une petite molécule et les calculs ont principalement concerné l'arrangement de quelques monomères autour de la cavité contenant le template et ii) le template est une macromolécule, et dans ce cas, seuls quelques monomères ont été soit « dockés » à la surface de la protéine (Boroznjak *et al.*, 2017), soit placés manuellement puis optimisés (Chianella *et al.*, 2002) ;
- Du solvant : qui sert à mettre dans la même phase toutes les molécules impliquées dans le processus de polymérisation : le template, le(s) monomère(s) fonctionnel(s) et éventuellement le(s) réticulant et l'initiateur. Lorsque la polymérisation se produit, les molécules du solvant occupent l'espace dans le réseau polymérique et créent des pores. Sa polarité affecte donc l'interaction template/monomère fonctionnel et par conséquent les propriétés d'adsorption des MIP (Puiu, Jaffrezic-Renault *et al.*, 2017) ;
- Du pH, du point isoélectrique et de la force ionique de la protéine : trois paramètres cruciaux qui peuvent affecter aussi bien la charge électrique de la protéine, que sa stabilité physique en modifiant sa conformation et en modulant la force d'interactions électrostatiques avec la matrice polymérique (Tlili *et al.*, 2021) ;
- De l'agent d'extraction : élémentaire pour enlever le template de la matrice polymérique et donc rendre les cavités, qui lui sont complémentaires en forme et en fonctions chimiques, accessibles aux analytes à détecter. La Figure.3.18 rassemble les problématiques qui peuvent être rencontrées lors de l'extraction du template, et qui peuvent être dues soient à un mauvais choix de la nature de l'extracteur ou à une mauvaise optimisation du temps d'extraction. Différentes stratégies d'extraction de protéines ont été rapportées dans la littérature. Elles sont généralement basées sur une ou sur une combinaison des approches suivantes : i) l'utilisation de solvants qui interagissent fortement avec le polymère et qui peuvent conduire à son gonflement, ce qui permet de libérer la protéine (El-Sharif *et al.*, 2017, Erdőssy, Horváth *et al.*, 2016) , ii) l'utilisation d'acides ou de bases afin de perturber les interactions électrostatiques entre la protéine et la matrice polymérique (Lorenzo *et al.*, 2011), et c) l'extraction « physique » par ultrasons, micro-ondes ou sous pression.

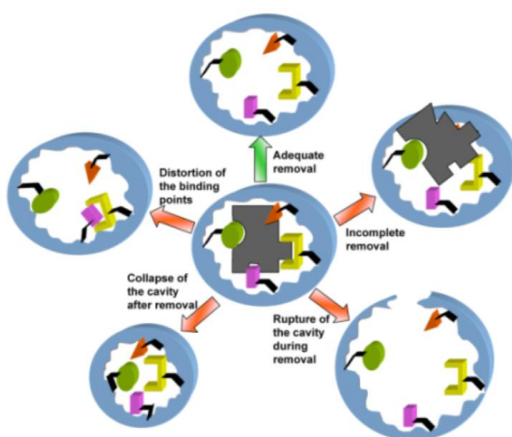


Figure.3.18 : représentation schématique des différentes problématiques qui peuvent être rencontrées lors de l'étape d'extraction (Lorenzo, Carro et al., 2011)

- Et de la technique de polymérisation : l'électrosynthèse est la technique la plus couramment utilisée pour l'impression de protéines. Elle peut se faire selon plusieurs méthodologies, représentées schématiquement dans la Figure.3.19.

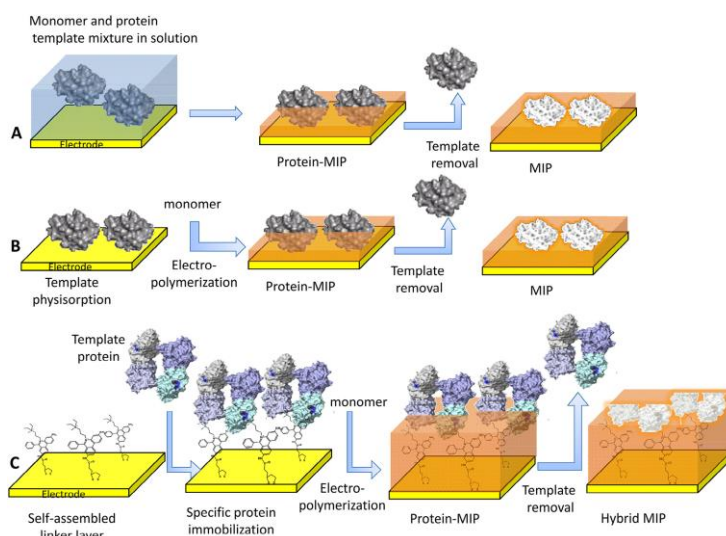


Figure.3.19. Méthodologies d'électrosynthèse d'une protéine sur le surface d'une électrode :
A) électropolymérisation d'un mélange de protéine et de monomère à partir d'une solution;
B) Physisorption de la protéine sur la surface puis électropolymérisation ; C) utilisation d'une couche auto-assemblée pour une immobilisation orientée de la protéine

Chacune d'elles présente des avantages et des inconvénients. Le choix de la méthodologie est donc un compromis entre : 1) facilité de mise en œuvre, en veillant cependant à ne pas dénaturer les protéines pendant la polymérisation, 2) nombre d'étapes de fonctionnalisation de la surface, et leur reproductibilité, et 3) le coût et durées des différentes étapes nécessaires.

3.3.3.1.Choix du monomère fonctionnel

Nous avons choisi le polypyrrole (PPy) comme matrice polymérique pour le design du polymère à empreintes moléculaires de PSA. Le PPy étant en effet un polymère conducteur et biocompatible qui peut être utilisé en milieu neutre. Il est stable et peut être facilement électropolymérisé sur divers types de substrats. Une étude préalable par modélisation dynamique moléculaire a permis de valider ce choix (Mazouz *et al.*, 2020). Les calculs ont en effet indiqué que quelles que soient les orientations de départ du système PSA/PPy, toutes les molécules de PSA restent insérées dans le polymère PPy, ce qui suggère une forte liaison entre le MIP conçu et la protéine (Figure.3.20).

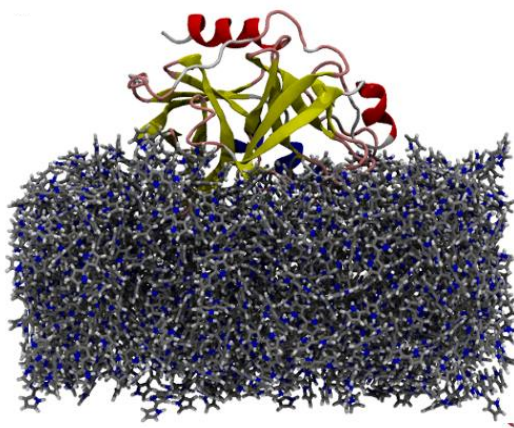


Figure.3.20. Vue globale de la protéine PSA insérée dans la matrice polymérique en PPy.

A notre connaissance, la modélisation proposée dans l'article de Mazouz *et al.*, est la seule, au jour d'aujourd'hui, qui reproduit assez fidèlement la structure type d'un polymère à empreintes moléculaires (Mazouz, Mokni *et al.*, 2020).

3.3.3.2.Électrosynthèse du polymère à empreintes de PSA

Les surfaces des électrodes de travail en or ont été tout d'abord nettoyées avec l'éthanol et l'acétone puis activées avec une solution de piranha (H_2SO_4 98% / H_2O_2 30%, 1:1 v/v). Les substrats ont été ensuite abondamment rincés à l'eau ultra pure puis à l'éthanol avant d'être séchés à l'air ambiant. Une fine couche de PPy a été par la suite électrodéposée sur la surface fraîchement nettoyée afin d'empêcher la formation de complexes PSA/or et de réduire le potentiel d'oxydation du pyrrole lors de la préparation du MIP. Cette couche de blocage (barrier layer) a été électrodéposée par chronoamérométrie (CA) à un potentiel constant de 1.05 V vs SCE. Le MIP-PSA-PPy a été ensuite préparé par CA, à un potentiel fixe de 1.05 V vs SCE, à partir d'une solution contenant du Py (10^{-2} M), du PSA ($3 \cdot 10^{-8}$ M) et un sel de fond, le LiClO_4 , (à 10^{-1} M). Le pH de la solution de prépolymérisation était égal à 7,4. Un polymère non imprimé (NIP) a été préparé dans les mêmes conditions, mais en l'absence de PSA.

Divers paramètres ont été optimisés pour garantir l'efficacité du capteur fonctionnalisé avec un MIP : la durée d'incubation des protéines, l'épaisseur du MIP, la nature de l'extracteur et la durée de l'élution (Mazouz, Mokni *et al.*, 2020). Dans le présent travail, l'élution du PSA a été effectuée en plongeant, pendant 3 min, les électrodes fonctionnalisées avec un MIP, dans une solution de NaCl sursaturée et en les rinçant ensuite avec de l'eau ultrapure. Les fortes concentrations d'électrolytes peuvent en effet

provoquer le repliement des protéines, ce qui conduit, in fine, à leur élimination de la matrice polymérique (Chi *et al.*, 2003, Dill 1990). Les différentes étapes de construction de ce MIP sont schématisées dans la Figure.3.21.

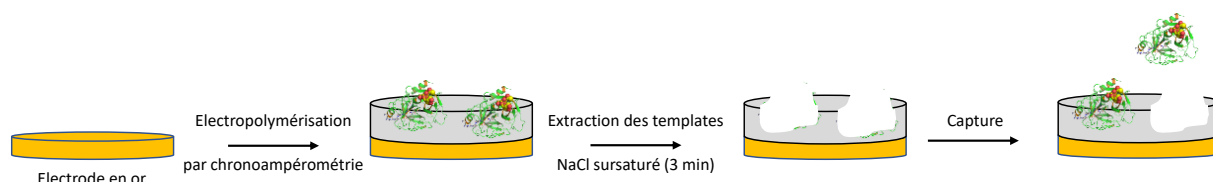


Figure.3.21. Représentation schématique de la construction du polymère en polypyrrole à empreintes moléculaires de PSA

3.3.3.2.1. Performances analytiques des capteurs

La voltampérométrie à ondes carrées (SWV) a été utilisée pour suivre la réponse du capteur fonctionnalisé avec un MIP à des concentrations croissantes de PSA allant de 3×10^{-8} ng/ml à 300 ng/ml. Le milieu de détection était le PBS. Les voltammogrammes présentés dans la Figure.3.22, indiquent que la valeur du pic de courant, correspondant au potentiel d'oxydation du PSA, augmente avec la concentration de la protéine.

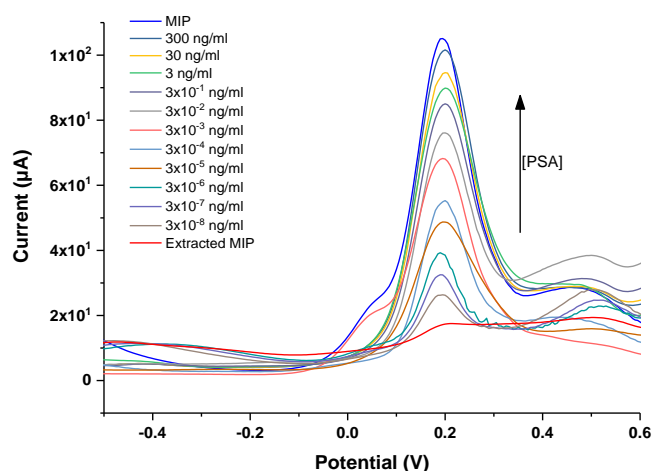


Figure.3.22. Voltammogrammes à ondes carrées après incubation du MIP extrait dans des solutions contenant des concentrations croissantes de PSA

Les mêmes expériences ont été menées avec les capteurs fonctionnalisés avec un NIP. Les valeurs de pics de courants enregistrés étaient quasi-constantes sur toute la gamme de concentration de PSA, et largement inférieures à celles obtenues à partir du MIP. Ces valeurs quasi constantes pourraient donc être attribuées à l'adsorption non spécifique de la protéine sur la surface polymérique en PPy.

A partir de l'ensemble des relevés, nous avons tracé la courbe d'étalonnage du capteur. Les variations des pics de courant en fonction des concentrations de PSA sont présentées dans la Figure.3.23. La limite de détection du capteur était égale à 10^{-2} fg/ml et la sensibilité, calculée à partir de la pente à l'origine, était de l'ordre de $(8,91 \pm 0,19)$ ($\mu\text{A}/\text{fg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

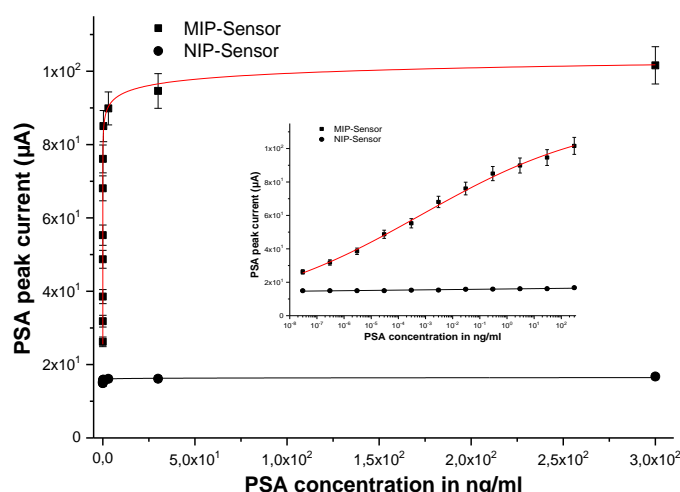


Figure.3.23. Variations des pics de courant du PSA enregistrés à partir de capteurs fonctionnalisés avec un MIP et un NIP, en fonction des concentrations de PSA, en échelles linéaire et logarithmique (insert)

Les résultats de la Figure.3.23 ont été modélisés avec l'équation de Hill (eq.3.5), qui s'est avérée être la plus précise pour ajuster les données expérimentales :

$$I(C) = \frac{A \times C^\alpha}{K_d^\alpha + C^\alpha} \quad (\text{eq.3.5})$$

$I(C)$ correspond aux variations des pics de courants pour une concentration donnée de PSA (C) K_d est la constante de dissociation, A est une constante empirique, et α est le coefficient de Hill.

La constante de dissociation K_d , qui rend compte de la force de la liaison entre le PSA et son empreinte dans le film PPy, a été estimée à $K_d = (1.02 \pm 0.54) \times 10^{-14}$ M, une valeur largement inférieure à celles rapportées dans la littérature. Cette faible valeur de K_d confirme ainsi une parfaite reconnaissance de la cible par son empreinte, le polymère à empreintes moléculaires joue bien donc le rôle d'un anticorps artificiel.

Le fait que les valeurs expérimentales puissent être ajustées avec précision par une fonction donnée, rend possible la quantification de la concentration de PSA dans des milieux complexes tels que les sérums humains non identifiés.

3.3.3.3. Quantification du PSA dans les sérums humains

Trente-cinq sérum de patients ont été considérés pour évaluer la fiabilité du capteur MIP. Des tests en aveugle ont été réalisés pour déterminer la concentration de PSA de chaque échantillon, à partir de la courbe d'étalonnage du capteur (Figure.3.23). Les valeurs estimées ont été ensuite comparées à celles obtenues par le test immuno-enzymatique ELISA (Figure. 3.24).

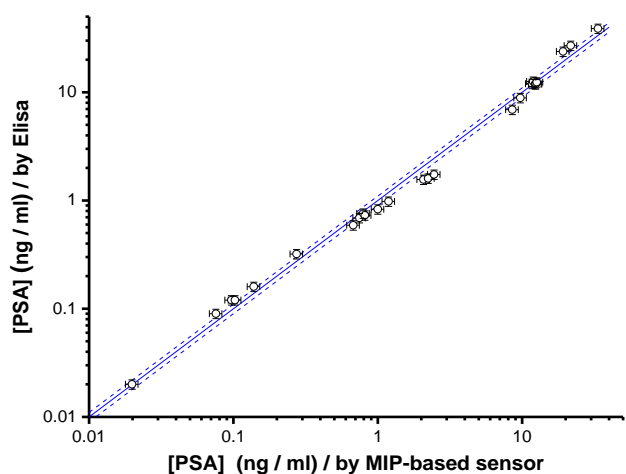


Figure.3.24. Comparaison des concentrations de PSA dans 35 échantillons de sérums de patients. Les mesures ont été faites avec le capteur à base de MIP et le « golden standard » ELISA.

La Figure.3.24 montre clairement que les concentrations de PSA estimées à partir du capteur fonctionnalisé avec un MIP et par ELISA sont quasi-identiques. Une ligne droite est en effet obtenue avec une pente proche de l'unité : 0.990 ± 0.017 . Ces résultats très encourageants ouvrent la voie à une nouvelle méthode fiable qui utilise des polymères à empreintes moléculaires comme récepteurs artificiels.

3.3.4. Synthèse

Trois biocapteurs ont été réalisés dans le cadre de cette étude sur la détection du PSA. Les tests de sélectivité ont montré que leurs réponses ampérométriques, vis-à-vis du PSA, étaient supérieures à celles des interférents considérés (Blel, Fourati et al., 2017, Mazouz, Mokni et al., 2020). Les biocapteurs développés sont donc parfaitement sélectifs du PSA.

Un comparatif des performances métrologiques des trois biocapteurs, lors de la détection du PSA dans le tampon PBS, est présenté dans le tableau 3.4. Il en ressort que les immunocapteurs, et notamment celui fonctionnalisé avec les nanoparticules d'oxydes de fer, sont plus sensibles que le capteur fonctionnalisé avec un polymère à empreintes moléculaires de PSA. Cependant ce dernier a une plus faible limite de détection et une réponse ampérométrique quasi linéaire (en échelle semi-logarithmique) sur une gamme de concentration plus étendue que celle explorée avec les immunocapteurs (Cf. Figures 3.14 et 3.23).

Tableau 3.4. Comparatif des performances métrologiques des trois biocapteurs, développés dans le cadre de cette étude, lors de la détection du PSA dans le tampon PBS

	Immunocapteurs		Capteur fonctionnalisé avec un MIP
	Sans IONPs	Avec IONPs	
LOD (fg/ml)	10	10	0,01

S ($\mu\text{A}/\text{fg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	$18,00 \pm 1,95$	$45,15 \pm 1,61$	$8,91 \pm 0,19$
--	------------------	------------------	-----------------

Il est donc indéniable que tous ces biocapteurs sont robustes, sélectifs et très sensibles. Le choix de la technique de fonctionnalisation reste cependant un savant compromis entre plusieurs paramètres dont le nombre d'étapes de fonctionnalisation, la sensibilité, la limite de détection, la gamme dynamique, et le coût des produits utilisés. A partir de là, il n'y a pas une mais plusieurs réponses, car le poids de chacun des paramètres importants du compromis peut changer selon l'application et les performances visées.

Références bibliographiques

- Albery WJ, O'Shea GJ, Smith AL. Interpretation and use of Mott–Schottky plots at the semiconductor/electrolyte interface. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 1996;92(20):4083-5.
- Allawi HT, SantaLucia J. Nearest Neighbor Thermodynamic Parameters for Internal G⊙ A Mismatches in DNA. *Biochemistry*. 1998;37(8):2170-9.
- Allawi HT, SantaLucia J. Thermodynamics and NMR of internal G⊙ T mismatches in DNA. *Biochemistry*. 1997;36(34):10581-94.
- Andoy NM, Filipiak MS, Vetter D, Gutiérrez-Sanz Ó, Tarasov A. Graphene-Based Electronic Immunosensor with Femtomolar Detection Limit in Whole Serum. *Advanced Materials Technologies*. 2018;3(12):1800186.
- Arya SK, Estrela P. Recent advances in enhancement strategies for electrochemical ELISA-based immunoassays for cancer biomarker detection. *Sensors*. 2018;18(7):2010.
- Badal S, Aiken W, Morrison B, Valentine H, Bryan S, Gachii A, et al. Disparities in prostate cancer incidence and mortality rates: Solvable or not? *The Prostate*. 2020;80(1):3-16.
- Bandini M, Gandaglia G, Briganti A. Obesity and prostate cancer. *Current opinion in urology*. 2017;27(5):415-21.
- Barber L, Gerke T, Markt SC, Peisch SF, Wilson KM, Ahearn T, et al. Family history of breast or prostate cancer and prostate cancer risk. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(23):5910-7.
- Baron D, Raharijaona M, Houlgatte R. Puces à ADN. *IRBM*. 2007;28(5):210-5.
- Blel N, Fourati N, Souiri M, Zerrouki C, Omezzine A, Bouslama A, et al. Ultrasensitive electrochemical sensors for psa detection: related surface functionalization strategies. *Current topics in medicinal chemistry*. 2017;17(26):2913-25.
- Blel N, Yaakoubi N, Omezzine A, Fourati N, Zerrouki C, Othmane A, et al., editors. Self assembled monolayers versus iron oxide nanoparticles modified surfaces: two functionalization strategies for femtomolar detection of prostate specific antigen: comparative study between two electrochemical biosensors for femtomolar detection of prostate specific antigen. 2016 IEEE SENSORS; 2016: IEEE.
- Bossi AM, Sharma PS, Montana L, Zoccatelli G, Laub O, Levi R. Fingerprint-imprinted polymer: rational selection of peptide epitope templates for the determination of proteins by molecularly imprinted polymers. *Analytical chemistry*. 2012;84(9):4036-41.
- Burke L, Collins J, Horgan M, Hurley L, O'Mullane A. The importance of the active states of surface atoms with regard to the electrocatalytic behaviour of metal electrodes in aqueous media. *Electrochimica acta*. 2000;45(25-26):4127-34.
- Carvalho RF, Sanches Freire R, Kubota LT. Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer Formation. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*. 2005;17(14):1251-9.

- Cenci L, Tatti R, Tognato R, Ambrosi E, Piotto C, Bossi AM. Synthesis and characterization of peptide-imprinted nanogels of controllable size and affinity. *European Polymer Journal*. 2018;109:453-9.
- Chang H, Kang H, Ko E, Jun B-H, Lee H-Y, Lee Y-S, et al. PSA detection with femtomolar sensitivity and a broad dynamic range using SERS nanoprobe and an area-scanning method. *ACS Sensors*. 2016;1(6):645-9.
- Chen Y-T, Tsai C-H, Chen C-L, Yu J-S, Chang Y-H. Development of biomarkers of genitourinary cancer using mass spectrometry-based clinical proteomics. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2019;27(2):387-403.
- Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical Research*. 2003;20(9):1325-36.
- Chikkaveeraiah BV, Mani V, Patel V, Gutkind JS, Rusling JF. Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011;26(11):4477-83.
- Chistiakov DA, Myasoedova VA, Grechko AV, Melnichenko AA, Orekhov AN, editors. *New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer*. Seminars in cancer biology; 2018: Elsevier.
- Culver HR, Peppas NA. Protein-Imprinted Polymers: The Shape of Things to Come? *Chemistry of Materials*. 2017;29(14):5753-61.
- Dabrowski M, Lach P, Cieplak M, Kutner W. Nanostructured molecularly imprinted polymers for protein chemosensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018;102:17-26.
- Dietrich D, Hasinger O, Bañez LL, Sun L, van Leenders GJ, Wheeler TM, et al. Development and clinical validation of a real-time PCR assay for PITX2 DNA methylation to predict prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer patients following radical prostatectomy. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2013;15(2):270-9.
- Dill KA. Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*. 1990;29(31):7133-55.
- El-Sharif HF, Stevenson D, Reddy SM. MIP-based protein profiling: A method for interspecies discrimination. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2017;241:33-9.
- Erdőssy J, Horváth V, Yarman A, Scheller FW, Gyurcsányi RE. Electrosynthesized molecularly imprinted polymers for protein recognition. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;79:179-90.
- Faria HAM, Zucolotto V. Label-free electrochemical DNA biosensor for Zika virus identification. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;131:149-55.
- Feng J, Li Y, Li M, Li F, Han J, Dong Y, et al. A novel sandwich-type electrochemical immunosensor for PSA detection based on PtCu bimetallic hybrid (2D/2D) rGO/g-C₃N₄. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;91:441-8.
- Feng Z, Zhi S, Guo L, Zhou Y, Lei C. An integrated magnetic microfluidic chip for rapid immunodetection of the prostate specific antigen using immunomagnetic beads. *Microchimica Acta*. 2019;186(4):1-14.

Gelderman K, Lee L, Donne S. Flat-band potential of a semiconductor: using the Mott–Schottky equation. *Journal of chemical education*. 2007;84(4):685.

Gustavsson J, Altankov G, Errachid A, Samitier J, Planell JA, Engel E. Surface modifications of silicon nitride for cellular biosensor applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008;19(4):1839-50.

Hájková A, Barek J, Vyskočil V. Electrochemical DNA biosensor for detection of DNA damage induced by hydroxyl radicals. *Bioelectrochemistry*. 2017;116:1-9.

He Y, Zhang X, Zhang S, Kris MKL, Man FC, Kawde A-N, et al. Visual detection of single-base mismatches in DNA using hairpin oligonucleotide with double-target DNA binding sequences and gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012;34(1):37-43.

Hoshino Y, Kodama T, Okahata Y, Shea KJ. Peptide imprinted polymer nanoparticles: a plastic antibody. *Journal of the American Chemical Society*. 2008;130(46):15242-3.

Hwang DG, Chae YM, Choi N, Cho I-J, Kang JY, Lee SH. Label-free detection of prostate specific antigen (PSA) using a bridge-shaped PZT resonator. *Microsystem Technologies*. 2017;23(5):1207-14.

Ilkhani H, Farhad S. A novel electrochemical DNA biosensor for Ebola virus detection. *Analytical biochemistry*. 2018;557:151-5.

Ismail M, Pastor N, Soler E, Soltani A, Othmane A. A Comparative Study on Surface Treatments in the Immobilization Improvement of Hexahistidine-tagged Protein on the Indium Tin Oxide Surface. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*. 2016;2016.

Ito T, Hosokawa K, Maeda M. Detection of single-base mismatch at distal end of DNA duplex by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(8):1816-9.

Jolly P, Tamboli V, Harniman RL, Estrela P, Allender CJ, Bowen JL. Aptamer–MIP hybrid receptor for highly sensitive electrochemical detection of prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016;75:188-95.

Kaiser A, Haskins C, Siddiqui MM, Hussain A, D’Adamo C. The evolving role of diet in prostate cancer risk and progression. *Current opinion in oncology*. 2019;31(3):222.

Karadurmuz L, Kurbanoglu S, Uslu B, A Ozkan S. Electrochemical DNA biosensors in drug analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2017;13(3):195-207.

Karthik A, Margulis K, Ren K, Zare R, Leung L. Rapid and selective detection of viruses using virus-imprinted polymer films. *Nanoscale*. 2015;7(45):18998-9003.

Kavosi B, Salimi A, Hallaj R, Moradi F. Ultrasensitive electrochemical immunosensor for PSA biomarker detection in prostate cancer cells using gold nanoparticles/PAMAM dendrimer loaded with enzyme linked aptamer as integrated triple signal amplification strategy. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015;74:915-23.

Khater M, de la Escosura-Muñiz A, Merkoçi A. Biosensors for plant pathogen detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;93:72-86.

Kim H-M, Uh M, Jeong DH, Lee H-Y, Park J-H, Lee S-K. Localized surface plasmon resonance biosensor using nanopatterned gold particles on the surface of an optical fiber. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019;280:183-91.

Kleter B, Van Doorn L-J, Schrauwen L, Molijn A, Sastrowijoto S, ter Schegget J, et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(8):2508-17.

Kowalczyk A. Trends and perspectives in DNA biosensors as diagnostic devices. *Current Opinion in Electrochemistry*. 2020;23:36-41.

Kumar S, Singh J, Agrawal V, Ahamad M, Malhotra B. Biocompatible self-assembled monolayer platform based on (3-glycidoxypopyl) trimethoxysilane for total cholesterol estimation. *Analytical Methods*. 2011;3(10):2237-45.

Kurbanoglu S, Dogan-Topal B, Rodriguez EP, Bozal-Palabiyik B, Ozkan SA, Uslu B. Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2016;775:8-26.

Kwak J, Lee SS. Highly sensitive piezoelectric immunosensors employing signal amplification with gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 2019;30(44):445502.

Li J, Zhu M, Wang M, Qi W, Su R, He Z. Molecularly imprinted peptide-based enzyme mimics with enhanced activity and specificity. *Soft Matter*. 2020;16(30):7033-9.

Li N, Liu Y-J, Liu F, Luo M-F, Wan Y-C, Huang Z, et al. Bio-inspired virus imprinted polymer for prevention of viral infections. *Acta biomaterialia*. 2017;51:175-83.

Li Y, Sun S-k, Yang J-l, Jiang Y. Label-free DNA hybridization detection and single base-mismatch discrimination using CE-ICP-MS assay. *Analyst*. 2011;136(23):5038-45.

Lorenzo RA, Carro AM, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. To remove or not to remove? The challenge of extracting the template to make the cavities available in molecularly imprinted polymers (MIPs). *International journal of molecular sciences*. 2011;12(7):4327-47.

Lucas R, Neto V, Bouazza AH, Zerrouki R, Granet R, Krausz P, et al. Microwave-assisted synthesis of a triazole-linked 3'–5' dithymidine using click chemistry. *Tetrahedron Letters*. 2008a;49(6):1004-7.

Lucas R, Zerrouki R, Granet R, Krausz P, Champavier Y. A rapid efficient microwave-assisted synthesis of a 3', 5'-pentathymidine by copper (I)-catalyzed [3+ 2] cycloaddition. *Tetrahedron*. 2008b;64(23):5467-71.

Mazouz Z, Fourati N, Zerrouki C, Ommezine A, Rebhi L, Yaakoubi N, et al. Discriminating DNA mismatches by electrochemical and gravimetric techniques. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013;48:293-8.

Mazouz Z, Mokni M, Fourati N, Zerrouki C, Barbault F, Seydou M, et al. Computational approach and electrochemical measurements for protein detection with MIP-based sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020;151:111978.

- Mehrgardi MA, Ahangar LE. Silver nanoparticles as redox reporters for the amplified electrochemical detection of the single base mismatches. *Biosensors and bioelectronics*. 2011;26(11):4308-13.
- Michaels PE. Development of a Stable Sensing Interface For an Electrochemical Impedance Label-free DNA Hybridisation Biosensor. 2013.
- Moon J-M, Kim YH, Cho Y. A nanowire-based label-free immunosensor: direct incorporation of a PSA antibody in electropolymerized polypyrrole. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014;57:157-61.
- Moradi N, Mousavi MF, Mehrgardi MA, Noori A. Preparation of a new electrochemical biosensor for single base mismatch detection in DNA. *Analytical Methods*. 2013;5(22):6531-8.
- Moradi N, Noori A, Mehrgardi MA, Mousavi MF. Scanning Electrochemical Microscopy for Electrochemical Detection of Single-base Mismatches by Tagging Ferrocenecarboxylic Acid as a Redox Probe to DNA. *Electroanalysis*. 2016;28(4):823-32.
- Mott NF. The theory of crystal rectifiers. *Proceedings of the Royal Society of London Series A Mathematical and Physical Sciences*. 1939;171(944):27-38.
- Nakashima H, Akahoshi M, Tanaka Y. Mutation Detection Using RT-PCR-RFLP. *PCR Protocols: Springer*; 2003. p. 319-22.
- Nasirizadeh N, Zare HR, Pournaghi-Azar MH, Hejazi MS. Introduction of hematoxylin as an electroactive label for DNA biosensors and its employment in detection of target DNA sequence and single-base mismatch in human papilloma virus corresponding to oligonucleotide. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011;26(5):2638-44.
- Okahata Y, Kawase M, Niikura K, Ohtake F, Furusawa H, Ebara Y. Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27-MHz Quartz Crystal Microbalance. *Analytical Chemistry*. 1998;70(7):1288-96.
- Okuno J, Maehashi K, Kerman K, Takamura Y, Matsumoto K, Tamiya E. Label-free immunosensor for prostate-specific antigen based on single-walled carbon nanotube array-modified microelectrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007;22(9):2377-81.
- Oto J, Fernández-Pardo Á, Royo M, Hervás D, Martos L, Vera-Donoso CD, et al. A predictive model for prostate cancer incorporating PSA molecular forms and age. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-10.
- Ouhibi A, Raouafi A, Lorrain N, Guendouz M, Raouafi N, Moadhen A. Functionalized SERS substrate based on silicon nanowires for rapid detection of prostate specific antigen. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2021;330:129352.
- Patel M, Feith M, Janicke B, Alm K, El-Schich Z. Evaluation of the impact of imprinted polymer particles on morphology and motility of breast cancer cells by using digital holographic cytometry. *Applied Sciences*. 2020;10(3):750.
- Peng H, Zhang L, Soeller C, Travas-Sejdic J. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. *Biomaterials*. 2009;30(11):2132-48.
- Peyret N, Seneviratne PA, Allawi HT, SantaLucia J. Nearest-Neighbor Thermodynamics and NMR of DNA Sequences with Internal A⊙ A, C⊙ C, G⊙ G, and T⊙ T Mismatches. *Biochemistry*. 1999;38(12):3468-77.

Piletsky S, Canfarotta F, Poma A, Bossi AM, Piletsky S. Molecularly imprinted polymers for cell recognition. *Trends in biotechnology*. 2020;38(4):368-87.

Proença CA, Freitas TA, Baldo TA, Materón EM, Shimizu FM, Ferreira GR, et al. Use of data processing for rapid detection of the prostate-specific antigen biomarker using immunomagnetic sandwich-type sensors. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2019;10(1):2171-81.

Puiu M, Jaffrezic-Renault N, Bala C. Chapter Five - Biomimetic Sensors Based on Molecularly Imprinted Interfaces. In: Palchetti I, Hansen P-D, Barceló D, editors. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 77: Elsevier; 2017. p. 147-77.

Pyrak E, Krajczewski J, Kowalik A, Kudelski A, Jaworska A. Surface Enhanced Raman Spectroscopy for DNA Biosensors—How Far Are We? *Molecules*. 2019;24(24):4423.

Ron H, Matlis S, Rubinstein I. Self-assembled monolayers on oxidized metals. 2. Gold surface oxidative pretreatment, monolayer properties, and depression formation. *Langmuir*. 1998a;14(5):1116-21.

Ron H, Rubinstein I. Alkanethiol monolayers on preoxidized gold. Encapsulation of gold oxide under an organic monolayer. *Langmuir*. 1994;10(12):4566-73.

Ron H, Rubinstein I. Self-assembled monolayers on oxidized metals. 3. Alkylthiol and dialkyl disulfide assembly on gold under electrochemical conditions. *Journal of the American Chemical Society*. 1998b;120(51):13444-52.

Rong Z, Bai Z, Li J, Tang H, Shen T, Wang Q, et al. Dual-color magnetic-quantum dot nanobeads as versatile fluorescent probes in test strip for simultaneous point-of-care detection of free and complexed prostate-specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019;145:111719.

Saidur M, Aziz AA, Basirun W. Recent advances in DNA-based electrochemical biosensors for heavy metal ion detection: a review. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;90:125-39.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270(5235):467-70.

Schottky W. Über den Mechanismus der Ionenbewegung in festen Elektrolyten. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 1935;29(1):335-55.

Shamsi MH, Kraatz H-B. Probing nucleobase mismatch variations by electrochemical techniques: exploring the effects of position and nature of the single-nucleotide mismatch. *Analyst*. 2010;135(9):2280-5.

Sharafeldin M, Bishop GW, Bhakta S, El-Sawy A, Suib SL, Rusling JF. Fe₃O₄ nanoparticles on graphene oxide sheets for isolation and ultrasensitive amperometric detection of cancer biomarker proteins. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;91:359-66.

Simeonov A, Nikiforov TT. Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection. *Nucleic acids research*. 2002;30(17):e91-e.

Singhal C, Dubey A, Mathur A, Pundir C, Narang J. Paper based DNA biosensor for detection of chikungunya virus using gold shells coated magnetic nanocubes. *Process Biochemistry*. 2018;74:35-42.

- Sohrabi N, Valizadeh A, Farkhani SM, Akbarzadeh A. Basics of DNA biosensors and cancer diagnosis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016;44(2):654-63.
- Soufi GJ, Iravani S, Varma RS. Molecularly imprinted polymers for the detection of viruses: challenges and opportunities. *Analyst*. 2021.
- Sun X, Zhi S, Lei C, Zhou Y. Investigation of contactless detection using a giant magnetoresistance sensor for detecting prostate specific antigen. *Biomedical microdevices*. 2016;18(4):1-7.
- Svitková V, Labuda J. Construction of electrochemical DNA biosensors for investigation of potential risk chemical and physical agents. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*. 2017;148(9):1569-79.
- Taitt HE. Global trends and prostate cancer: a review of incidence, detection, and mortality as influenced by race, ethnicity, and geographic location. *American journal of men's health*. 2018;12(6):1807-23.
- Tang Z, Wang L, Ma Z. Triple sensitivity amplification for ultrasensitive electrochemical detection of prostate specific antigen. *Biosensors and Bioelectronics*. 2017;92:577-82.
- Tlili A, Attia G, Khaoulani S, Mazouz Z, Zerrouki C, Yaakoubi N, et al. Contribution to the Understanding of the Interaction between a Polydopamine Molecular Imprint and a Protein Model: Ionic Strength and pH Effect Investigation. *Sensors*. 2021;21(2):619.
- Traynor SM, Pandey R, Maclachlan R, Hosseini A, Didar TF, Li F, et al. Recent Advances in Electrochemical Detection of Prostate Specific Antigen (PSA) in Clinically-Relevant Samples. *Journal of The Electrochemical Society*. 2020;167(3):037551.
- Uludağ Y, Tothill IE. Development of a sensitive detection method of cancer biomarkers in human serum (75%) using a quartz crystal microbalance sensor and nanoparticles amplification system. *Talanta*. 2010;82(1):277-82.
- Wang H-Y, Cao P-P, He Z-Y, He X-W, Li W-Y, Li Y-H, et al. Targeted imaging and targeted therapy of breast cancer cells via fluorescent double template-imprinted polymer coated silicon nanoparticles by an epitope approach. *Nanoscale*. 2019;11(36):17018-30.
- West RM. Electrical Manipulation of DNA Self-Assembled Monolayers: Electrochemical Melting of Surface-Bound DNA. *Journal of The Electrochemical Society*. 2020;167(3):037544.
- Wu Q, Zhang Y, Yang Q, Yuan N, Zhang W. Review of electrochemical DNA biosensors for detecting food borne pathogens. *Sensors*. 2019;19(22):4916.
- Xiao P, Sun Z, Huang Y, Lin W, Ge Y, Xiao R, et al. Development of an optical microfiber immunosensor for prostate specific antigen analysis using a high-order-diffraction long period grating. *Optics express*. 2020;28(11):15783-93.
- Yang L, Li N, Wang K, Hai X, Liu J, Dang F. A novel peptide/Fe₃O₄@ SiO₂-Au nanocomposite-based fluorescence biosensor for the highly selective and sensitive detection of prostate-specific antigen. *Talanta*. 2018;179:531-7.
- Yu X, Munge B, Patel V, Jensen G, Bhirde A, Gong JD, et al. Carbon Nanotube Amplification Strategies for Highly Sensitive Immunodetection of Cancer Biomarkers. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(34):11199-205.

Zaidi SA. An Overview of Bio-Inspired Intelligent Imprinted Polymers for Virus Determination. *Biosensors*. 2021;11(3):89.

Zani A, Laschi S, Mascini M, Marrazza G. A new electrochemical multiplexed assay for PSA cancer marker detection. *Electroanalysis*. 2011;23(1):91-9.

Zerrouki C, Fourati N, Lucas R, Vergnaud J, Fournion J-M, Zerrouki R, et al. Biological investigation using a shear horizontal surface acoustic wave sensor: Small “Click generated” DNA hybridization detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010;26(4):1759-62.

Zhang F, Li S, Cao K, Wang P, Su Y, Zhu X, et al. A microfluidic love-wave biosensing device for PSA detection based on an aptamer beacon probe. *Sensors*. 2015;15(6):13839-50.

Zhang T, Watson DG, Wang L, Abbas M, Murdoch L, Bashford L, et al. Application of holistic liquid chromatography-high resolution mass spectrometry based urinary metabolomics for prostate cancer detection and biomarker discovery. *PloS one*. 2013;8(6):e65880.

Zourob M, Suaifan G. Paper based magnetic nanoparticles biosensor for rapid prostate specific antigen detection. *WSEAS Trans Biol Biomed*. 2017;14:2224-902.

Les capteurs chimiques et biologiques

Challenges et perspectives

1. Préambule

Je vais commencer la dernière partie de ce rapport par une revue des éléments de contexte qui ont entraîné, ou qui entraîneront à court terme, une forte expansion des marchés des capteurs chimiques et biologiques.

Dans le cas des biocapteurs, il s'agit de :

- L'émergence de crises pandémiques sanitaires comme celle que nous vivons actuellement qui a démontré la nécessité de disposer rapidement de dispositifs capables de « traquer » le SARS-Cov-2 et ses nouveaux variants ;
- L'incidence accrue de diverses pathologies, dont les maladies neurodégénératives, liées à la hausse de l'espérance de vie et donc à une population mondiale de plus en plus vieillissante ;
- La nécessité de détection précoce et de diagnostic précis de diverses maladies, notamment les cancers et les maladies cardiovasculaires ;
- La nécessité de disposer « d'outils » permettant le diagnostic précoce des maladies familiales qui sont transmissibles aux descendants telles que la microcéphalie, l'hypercholestérolémie familiale etc...
- La nécessité de disposer « d'outils » permettant de réaliser des analyses médicales, notamment le dosage de biomarqueurs, de façon non invasive (dans la salive par exemple) ;
- La forte demande pour disposer de nouveaux dispositifs médicaux implantables pour les patients atteints de diabète, capables de : i) doser en continu la glycémie, ii) « corriger » l'indice glycémique en envoyant directement une commande à la pompe à insuline et iii) envoyer un message d'alerte au médecin en cas de besoin ;
- Et la nécessité de suivre à distance des patients atteints de maladies chroniques et/ou qui ne peuvent pas se déplacer dans des hôpitaux, à cause de l'éloignement géographique, de difficultés de mobilité ou du contexte pandémique par exemple.

Et dans le cas des capteurs chimiques, il s'agit de :

- L'évolution actuelle des normes environnementales avec une baisse considérable des limites pour la teneur des substances chimiques dans l'organisme, l'eau, les sols... ;
- La nécessité de suivre l'évolution de concentrations de pesticides et de métaux lourds dans les sols, les cours d'eau et dans l'air, suite à l'usage démesuré de ces substances au siècle précédent et encore aujourd'hui dans certaines régions du monde, ainsi qu'aux nombreuses catastrophes écologiques qui sont survenues partout dans le monde ;
- La surveillance accrue de la qualité de l'air intérieur dans les habitations et les établissements publics, en mesurant notamment les concentrations de gaz comme le CO et le CO₂, le taux d'humidité, ou encore la présence (ou non) de composés organiques volatils.

Cependant, et malgré les progrès indéniables liés aux techniques de fonctionnalisation des surfaces, à la transduction, à la microfluidique et à l'intégration des capteurs dans des laboratoires sur puces (ou LOC pour Lab-on-Chip), seuls quatre succès commerciaux ont été enregistrés, depuis le début

des années 80, dans le domaine de la biodétection : les glycomètres, les tests de grossesse, les puces à ADN et plus récemment les dispositifs à flux latéral pour le dosage antigénique du SARS-CoV-2. Côté détection chimique, ce ne sont que les capteurs d'humidité et de gaz qui « dopent » le marché actuel.

Ci-après, est présentée donc ma vision des défis à relever pour que les capteurs soient LES dispositifs analytiques de choix qui permettent une détection fiable, reproductible, ultrasensible, spécifique et avec une très faible limite de détection d'un analyte donné. Elle est construite en suivant le schéma classique d'un capteur, c'est-à-dire en partant de la surface d'une électrode et en allant jusqu'à son intégration dans un Lab-On-Chip.

2. Les défis à relever

2.1. Les milles et une surfaces d'or

La première étape de construction d'un capteur consiste à choisir l'électrode en fonction de la technique de transduction envisagée.

Une large partie de ces électrodes est en or massif ou plus couramment en or déposé, par évaporation ou par PCVD¹⁹, sur un substrat qui peut être en verre, en polymère ou sur un wafer piézoélectrique dans le cas des capteurs à ondes acoustiques.

Dans tous ces cas, la surface qui sera fonctionnalisée est une surface en or, mais peut-on pour autant parlé d'une seule et unique surface d'or ?

Pour répondre à cette question, nous avons fait un test de caractérisation chimique, par voltammétrie à ondes carrées, avec les quatre surfaces suivantes :

- or massif (électrode de marque CHI),
- or déposé par PCVD sur du verre,
- or déposé par PCVD sur un substrat polymérique en kapton,
- or déposé par PCVD sur du silicium.

Les mesures ont été réalisées, avec le même opérateur, dans les mêmes conditions expérimentales avec le même montage électrochimique, formé d'une électrode de référence en Ag/AgCl et une contre électrode en platine, et en utilisant le même potentiostat (CHI 1222C).

Les résultats, présentés dans la Figure.4.1, montrent clairement que : i) les transferts de charges vers la surface sont plus importants dans le cas d'or massif que dans le cas d'or déposé sur un substrat donné, ii) les potentiels sont légèrement décalés en fonction de la nature de l'or : 0,44 mV pour l'or massif contre 0,39 mV pour l'or déposé.

Une revue d'articles, dans lesquels ont été présentés des voltamogrammes d'électrodes « en or » réalisés dans les mêmes conditions opératoires et de mesures que les nôtres, confirme ce constat et montre clairement une différence notable entre les spectres en fonction de la nature de l'or (massif ou déposé sur un substrat) et du fournisseur.

¹⁹ PCVD : Pressure Chemical Vapor Deposition

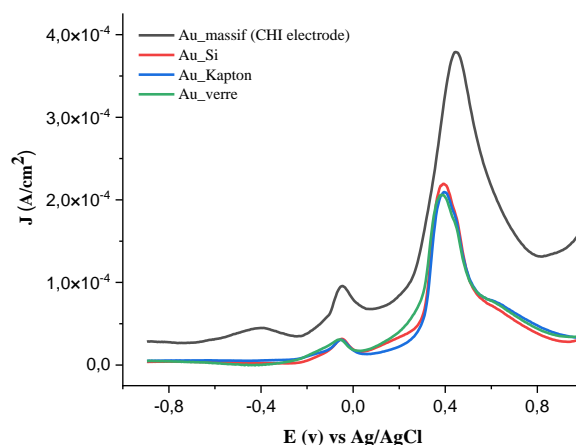


Figure.4.1. Voltammogrammes de 4 électrodes « en or » : variations des densités de courant en fonction du potentiel. Mesures réalisées dans une solution d'eau contenant du LiClO_4 0,1 M (pH = 6,11). $E_{\text{initial}} = -0,9$ V, $E_{\text{final}} = 1$ V, incrément = 5 mV, amplitude = 10 mV, fréquence = 25 Hz

Là, je n'ai considéré que l'exemple de l'or, matériau noble qui recouvre la quasi-totalité de nos électrodes. Mais le constat fait pour les surfaces d'or peut être généralisé à tout type d'électrodes, notamment des électrodes en ITO, en graphite ou encore en papier (utilisé pour la réalisation des électrodes SPE, pour Screen Printed Electrodes). Pour ces dernières, il est d'ailleurs très fréquent de trouver, dans un même lot, des réponses électrochimiques très différentes d'une électrode à l'autre.

Ce facteur, variabilité de la qualité de surface d'un même matériau ou d'une même électrode, rend difficile les transferts technologiques, notamment lors des phases exploratoires.

2.2. Le nettoyage des surfaces

La capacité de générer des surfaces ultra-propres de détection est une exigence lors de la conception d'un capteur chimique ou biologique. Or généralement, quel que soit le matériau, les surfaces des électrodes adsorbent des contaminants pendant les post-traitements, le stockage ou encore le transport. Divers moyens sont mis en œuvre pour limiter cet effet. A titre d'exemple, les surfaces des transducteurs SAW sont généralement recouverts d'une couche de protection en résine à la sortie de salle blanche ; cette couche permet de les protéger lors de la découpe, d'éventuels débris de tantalate qui pourraient rayer la zone sensible. Toutefois, un nettoyage efficace est essentiel avant l'étape de fonctionnalisation des capteurs.

De nombreuses techniques ont été décrites dans littérature pour le nettoyage des surfaces des électrodes. Dans cette partie, je ne présenterai que le cas de deux matériaux : l'ITO et l'or, matériaux utilisés lors de nos différentes études.

2.2.1. Nettoyage des surfaces d'or

Divers traitements peuvent être utilisés pour le nettoyage des surfaces d'or. Le plus courant consiste à déposer une solution "piranha", un mélange H_2O_2 / H_2SO_4 , sur la surface. Les proportions de ces deux produits et la durée de nettoyage sont cependant très variables d'une publication à l'autre. Par ailleurs, au sein de notre équipe, nous nous sommes par exemple rendu compte qu'il n'était pas possible d'utiliser le même protocole de nettoyage d'une surface d'or, selon que le substrat soit du kapton (un substrat flexible) ou du tantalate de lithium (un cristal). Ceci est très probablement lié à l'état de surface des couches superficielles, elles-mêmes dépendant étroitement de l'état de surface et des caractéristiques physiques du substrat utilisé.

D'autres techniques, rapportées dans la littérature, comportent soit des traitements par plasma O_2 ou électrochimiques (par réduction ou par oxydation), soit un polissage mécanique avec des grains d'alumine de tailles variables (Bhalla *et al.*, 2010). A ces différents éléments s'ajoute « l'adaptabilité » du support de transduction : un traitement "piranha" ne pourra par exemple pas être utilisé pour des électrodes d'or commerciales, généralement protégées par une gaine de protection.

2.2.2. Nettoyage des surfaces d'ITO

Nous avons présenté, dans le paragraphe 3.3.2.1 de ce rapport, les différentes étapes de nettoyage et d'activation des surfaces d'ITO²⁰. Les voltamogrammes correspondants sont présentés dans la Figure.4.2.

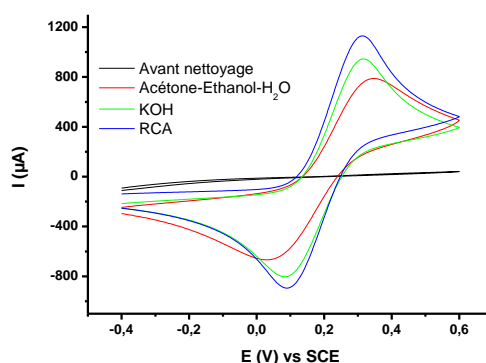


Figure.4.2. Suivi par CV des différentes étapes de nettoyage et d'activation de surface d'ITO. Les mesures ont été réalisées dans une solution de PBS 0,01 M, à pH 7,4, contenant 0,1 M KCl et 10 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

Il en ressort que : i) sans ces différentes étapes, il aurait été quasi-impossible de construire le biocapteur pour la détection du PSA, le signal électrochimique de départ étant en effet très faible, ii) chacune des étapes de nettoyage entraîne une augmentation du transfert de charges vers la surface de l'électrode, ce qui se traduit par des augmentations des pics de courants.

Ces différents exemples et cas de figures illustrent donc toute la complexité des étapes de nettoyage, le défi « majeur » restant sa reproductibilité.

²⁰ Le protocole optimisé de nettoyage et d'activation est le suivant : 1) rinçage avec l'acétone, puis l'éthanol puis l'eau 2) incubation pendant 1 h dans une solution de KOH 3) élimination de toute trace résiduelle de polluants et activation des surfaces par RCA puis Piranha.

2.3. Les différents types de fonctionnalisation : avantages, inconvénients et challenges

Dans le Tableau 4.1 sont présentées les principales techniques de fonctionnalisation, ainsi que leurs avantages, inconvénients et challenges.

Comme présenté précédemment dans ce manuscrit, le choix d'une technique de fonctionnalisation est un compromis entre les moyens dont on dispose et les résultats escomptés. Il n'existe pas actuellement LA technique de fonctionnalisation qui pourrait être appliquée de façon reproductible à l'ensemble des entités biologiques par exemple. Ceci est dû, à mon avis, au fait qu'on ne maîtrise toujours pas la façon avec laquelle se « greffe » une molécule, ou un film donné, à la surface d'un substrat. De plus, les états de surfaces peuvent être très différents aux échelles nanométriques, contrastant avec des similitudes aux échelles microscopiques. Or c'est bien aux échelles nanométriques, voire plus bas, que se créent et s'établissent les liens intimes entre les substrats et les différentes entités qui y sont greffées.


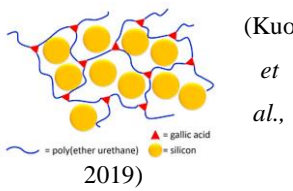
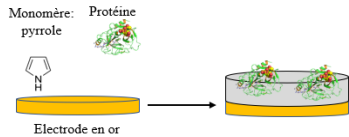
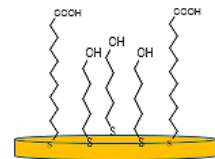
Maîtriser une fonctionnalisation reproductible et fiable et limiter au maximum « la part d'aléas » est un des défis à relever pour la construction de capteurs chimiques et biologiques à grande échelle.

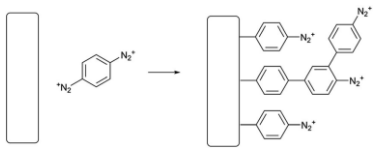
2.4. Intérêt de la multi-transductions

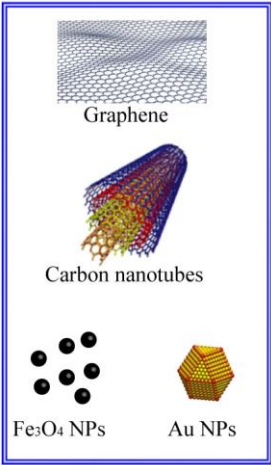
La plupart des études rapportées dans la littérature concernent des comparaisons entre des résultats de détection obtenus à partir de deux techniques de transductions différentes, principalement l'électrochimie et l'optique. Cependant, plus rares sont les études dédiées à une utilisation combinée ou simultanée de deux techniques de transduction. La référence étant la microbalance électrochimique à quartz (EQCM).

Les différentes études présentées dans ce manuscrit ont mis en évidence la nécessité de disposer de plusieurs techniques de transduction. La redondance étant en effet un moyen efficace d'éliminer tous les biais expérimentaux, de valider les résultats obtenus et de donner accès à des informations complémentaires. C'est d'ailleurs pour ces différentes raisons que nous avons développé le E-SAW. Bien plus que la redondance, c'est la complémentarité des modes de mesures qui est porteuse de richesse d'informations mais aussi de facilité d'adaptation à toute situation. Une non-sélectivité en gravimétrie peut être facilement contournée par électrochimie par simple déconvolution a posteriori. Inversement, des constructions successives de couches biologiques particulières peuvent être nécessaires pour approcher une spécificité, au prix d'une réduction drastique de transferts de charges. Cela peut constituer une limitation en électrochimie, alors que l'effet est faible voire absent en gravimétrie.

Tableau. 4.1. Principales techniques de fonctionnalisation avec leurs avantages, inconvénients et challenges
La partie relative aux nanomatériaux est revue et adaptée à partir de la revue de (Kowalczyk *et al.*, 2019)

Technique de fonctionnalisation		Avantages	Inconvénients	Challenges
Adsorption		Processus d'adsorption réversible : ⇒ Possibilité de désorber les molécules ⇒ Possibilité de réutilisation de la matrice	Orientation aléatoire des entités greffées Faibles forces de liaison avec la surface (de type Van der Waals en général) Globalement non reproductible	La reproductibilité
Réticulation		Evite le relargage du récepteur Simple à mettre en œuvre Bonne stabilité du système	Matrice non réutilisable Possibilité de perte d'activité du récepteur	La réutilisation de la matrice après le relargage des entités captées
Impression moléculaire ou ionique		Possibilité de contrôler l'épaisseur et la densité du film Homogénéité des films réalisés Grande stabilité Coût plus faible notamment dans le cas des MIPs destinés à la détection d'antigènes	Grand nombre de paramètres à optimiser pour assurer la reproductibilité du polymère imprimé Nécessité d'effectuer un grand nombre de tests pour trouver le meilleur agent extracteur Cinétiques d'incubations généralement lentes	Améliorer les propriétés physico-chimiques des films réalisés La reproductibilité L'extraction Réduire la forte influence des sels de fond
Couches autoassemblées		Permet d'assurer une forte liaison entre les récepteurs et la matrice Stable Facile à mettre en œuvre	Processus d'adsorption irréversible ⇒ Il est donc difficile de désorber les molécules après greffage Technique consommatrice de temps Nécessite d'activation des groupements réactifs Risque de modification chimique du récepteur	- Élimination de la formation de défauts pour les courtes chaînes thiolées - Amélioration de la conductivité des couches formées

<p>Sels de diazonium</p>	 <p>(Mahouche-Chergui <i>et al.</i>, 2011)</p>	<p>"Compatibles" avec tout type de surface</p> <p>Présence de groupes fonctionnels qui facilitent le greffage moléculaire</p> <p>Forte liaison covalente aryle-surface</p> <p>Préparation simple</p> <p>Possibilité de contrôler l'épaisseur de la couche par potentiel appliqué</p>	<p>Réaction secondaire indésirable</p> <p>Passivation de l'électrode rendant un capteur électrochimique inopérant</p>	<p>Contrôle de l'épaisseur de la couche (notamment en solution aqueuse)</p> <p>Formation d'une couche uniforme</p>
---------------------------------	---	--	---	--

Ajout de nano-matériaux	 <p>(Lahcen <i>et al.</i>, 2019)</p>	<p>Pour le graphène : Excellentes conductivités électrique et thermique Biocompatibles et chimiquement stable Forte résistance mécanique Haute capacité d'adsorption</p> <p>Pour les nanotubes de carbone : Propriétés électriques et conductrices "remarquables" Activité catalytique spécifique dans les réactions électrochimiques Grande surface permettant une fonctionnalisation multiple Espace interne vide permettant l'encapsulation et le transport des molécules</p> <p>Pour les nanoparticules en oxydes métalliques Propriétés optoélectriques uniques Bonne conductivité thermique Bonne activité catalytique Biocompatibles et biodégradables</p> <p>Pour les nanoparticules magnétiques Les propriétés superparamagnétiques empêchent l'aggrégation des particules Grand nombre de sites actifs en surface Efficacité d'adsorption élevée Séparations faciles et rapides de petites molécules et biomolécules dans un champ magnétique</p>	<p>Pour le graphène : Faible dispersion dans l'eau en raison de leur hydrophobie Tendance à s'agglomérer en raison de leur surface élevée et de leur énergie de surface</p> <p>Pour les nanotubes de carbone : Non biodégradables Forte tendance à l'aggrégation Manque de solubilité dans les solvants aqueux</p> <p>Pour les nanoparticules en oxydes métalliques Tendance à s'agglomérer Possibilité d'oxydation et de corrosion Possibilité d'influencer la stabilité, la structure et la fonction des protéines</p> <p>Pour les nanoparticules magnétiques Instabilité chimique en fonction du type de nanoparticules magnétiques Faible dispersion dans les solutions aqueuses</p>	<p>Pour le graphène : Meilleure dispersion dans l'eau Tendance à l'agglomération</p> <p>Pour les nanotubes de carbone : Remédier au problème d'agglomération</p> <p>Pour les nanoparticules en oxydes métalliques Contrôle de l'orientation des molécules adsorbées</p> <p>Pour les nanoparticules magnétiques Degré d'aimantation résiduelle Contrôle de la taille et de la chimie de surface Propriétés catalytiques</p>
-------------------------	---	---	--	---

2.5. Intégration de la microfluidique

La microfluidique est une technologie extrêmement attrayante en raison de : i) son faible coût, ii) sa capacité à manipuler de très faibles volumes de fluides (micro à nanolitres) dans des dispositifs de dimensions réduites, et iii) la facilité de multiplexage et d'intégration dans des laboratoires sur puces (LoC, pour Lab-on-Chip) ou dans des plateformes PoC (pour Point-of-Care). A ceci s'ajoute la possibilité d'utiliser plusieurs types de matériaux dont les polymères, et notamment le PDMS²¹, le verre ou encore les semi-conducteurs. C'est donc une technologie en plein essor qui trouve des applications dans des domaines aussi variés que l'analyse enzymatique, la protéomique, l'immunologie, le diagnostic, la détection de virus et de pathogènes...

La microfluidique est donc une technologie mature, le seul défi à relever reste donc sa parfaite intégration aux capteurs chimiques et biologiques.

2.6. PoC/LoC : rêve hors de portée ou proche réalité ?

Diverses épidémies, Zika, Ebola, HIV (Human immunodeficiency virus), dengue et plus récemment SARS-Cov-2, ont mis en évidence la nécessité de disposer de plateformes point-of-care (POC) pour effectuer un diagnostic rapide, en vue d'une intervention préventive ou thérapeutique efficaces. De plus, en dehors de ces contextes, ce type de plateformes peut répondre à une demande croissante, émanant notamment du secteur médical, de pouvoir réaliser à faible coût des analyses rapides et in-situ d'échantillons biologiques et d'avoir les résultats d'analyse en très peu de temps.

On assiste donc aujourd'hui à une forte augmentation des marchés des PoC et des LoC, dont les prévisions de croissance sont de l'ordre de 9,4%²² pour les premiers (période 2021-2028) et de 8,9%²³ pour les seconds (période 2020-2025). Cependant, la plupart des tests réalisés avec ces dispositifs ont révélé une sensibilité moindre, comparativement aux technologies conventionnelles de laboratoires. Une illustration de ces propos peut là aussi être empruntée à l'actualité récente des tests antigéniques du SARS-Cov-2. Le pourcentage actuel de résultats faux-négatifs obtenus par ces nouveaux outils est de l'ordre de 30%, une valeur relativement élevée qui a pour conséquence immédiate que des personnes contaminées continuent à être en contact avec des personnes saines. C'est pour cette raison d'ailleurs que la référence actuelle reste la PCR.

Les LoCs et les PoCs ne sont donc pas des rêves, mais bel est bien une proche réalité. Il faudrait cependant résoudre plusieurs problématiques récurrentes comme le manque de sensibilité et la fiabilité, lors des transferts des Laboratoires vers les réalisations à grande échelle.

21 PDMS: polydimethylsiloxane

22 <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/point-of-care-diagnostics-market-101072>

23 <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/lab-on-a-chip-market>

3. Conclusion

Pour conclure, il est fort probable que, grâce aux progrès enregistrés dans les domaines de l'ingénierie, de la micro-électronique et la micro-technologie, des sciences des matériaux et de la communication sans fils, les capteurs chimiques et biologiques deviendront les dispositifs analytiques de choix qui répondront à une large partie des challenges présentés au tout début de cette partie. Mordor intelligence²⁴ avait d'ailleurs estimé le marché actuel des capteurs « biomédicaux » à 10,79 milliards de dollars en 2020, et prévoit que ce chiffre atteigne 15,13 milliards de dollars d'ici 2026. Le marché des capteurs chimiques a été, quant à lui, estimé à 21.39 milliards de dollars en 2020 et devrait atteindre 32.96 milliards de dollars d'ici 2026²⁵.

4. Projet

Mon projet, s'inscrit dans la continuité de cette thématique qui se trouve aux confluent de plusieurs domaines scientifiques et technologiques. Il illustre parfaitement la richesse des apports multiples de tous les "artisans de la science" et leurs contributions à la beauté de l'édifice « sciences au service de l'humain ».

Il s'agira de relever plusieurs défis parmi ceux cités précédemment. Il concernera le développement d'un laboratoire sur puce avec une détection simultanée électrochimique et gravimétrique. L'application principale est la détection non-invasive et corrélée de plusieurs biomarqueurs de cancers.

Le savoir-faire acquis lors des précédentes années et les collaborations établies avec différentes équipes de recherche m'ont permis de me rendre compte des différentes améliorations qui pourraient être apportées lors de la réalisation de cette plateforme de détection. La première d'entre elles concernera le design du ESAW, le transducteur qui permettra une détection simultanée électrochimique et gravimétrique. Certes le dispositif réalisé dans notre Laboratoire est robuste et fiable, comme en témoigne les résultats obtenus lors de la détection de l'atrazine, mais la surface de la zone centrale du capteur SAW (et donc l'électrode de travail du capteur électrochimique) est relativement grande (22 mm²). Il en résulte une utilisation conséquente de produits chimiques et biologiques lors des étapes de fonctionnalisation et de tests. A ceci s'ajoute le fait que, compte tenu de la verticalité du montage, il ne nous a pas été possible d'envisager une configuration classique respectant une certaine proportion entre les différentes électrodes. L'idée consiste donc à réaliser une structure planaire miniaturisée dans laquelle la zone sensible du capteur SAW (dont la taille serait de l'ordre de 4-5 mm²) serait placée en vis-à-vis de l'électrode de référence et de la contre-électrode. Cette dernière pourrait avoir une surface trois fois supérieure à celle de l'électrode de travail, tel que l'exigerait un fonctionnement optimum des capteurs électrochimiques.

Consciente par ailleurs de la nécessité de faire une multi-détection d'analytes dans un même fluide biologique, il nous a semblé opportun de réaliser un laboratoire sur puce intégrant non pas un mais plusieurs ESAW. Chacun d'eux sera fonctionnalisé pour la détection spécifique

²⁴ <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/biomedical-sensors-market>

²⁵ <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-chemical-sensors-market-industry>

d'un biomarqueur donné. La combinaison des résultats obtenus fournira une aide précieuse aux médecins pour la prise de décisions, quant à l'état de leurs patientes et patients.

La dernière amélioration concernerait l'intégration de la microfluidique dans la plateforme de détection. Une combinaison de valves et de mélangeurs permettra de mieux faire circuler les faibles volumes de liquides qui seront injectés sur les zones sensibles des capteurs.

Ce projet sera mené dès ses premières phases avec le souci constant d'une maîtrise de chaque étape, en mettant à profit toute l'expertise acquise. Cette condition est la garantie d'un transfert fiable et viable vers le monde médical, avec l'espoir de retombées fort bénéfiques dans le domaine du diagnostic précoce de cancers.

Plus particulièrement, à court terme le projet concernera la détection simultanée de plusieurs biomarqueurs du cancer du sein dans la salive. Avec un objectif ambitieux, celui d'améliorer les scores de la sensibilité et de la spécificité, par rapport aux références actuelles basées sur les résultats des imageries (77-96% pour la sensibilité et 94-97% pour la spécificité). Cette recherche d'une diminution notable des pourcentages de faux positifs et de faux négatifs, s'appuiera sur des analyses corrélées des taux de plusieurs biomarqueurs dans des échantillons salivaires. Les résultats obtenus seront confrontés à ceux obtenus à partir des techniques cliniques classiques, notamment l'imagerie médicale.

A plus long termes, les résultats de ce projet serviront de base pour la mise en place de capteurs versatiles, assurant une détection fiable compatible avec le diagnostic précoce de plusieurs maladies. Cette transposition pourra se faire à toute affection ou dérèglement médical qui s'accompagne par la surexpression d'un ou plusieurs marqueurs biologiques dans la salive ou dans un autre liquide physiologique.

Références bibliographiques

Bhalla V, Carrara S, Stagni C, Samorì B. Chip cleaning and regeneration for electrochemical sensor arrays. *Thin Solid Films*. 2010;518(12):3360-6.

Kowalczyk A, Matysiak-Brynda E, Nowicka AM. Proteins and peptides voltammetry: Trends, potential, and limitations. *Current Opinion in Electrochemistry*. 2019;14:44-52.

Kuo T-C, Chiou C-Y, Li C-C, Lee J-T. In situ cross-linked poly (ether urethane) elastomer as a binder for high-performance Si anodes of lithium-ion batteries. *Electrochimica Acta*. 2019;327:135011.

Lahcen AA, Amine A. Recent advances in electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers and nanomaterials. *Electroanalysis*. 2019;31(2):188-201.

Mahouche-Chergui S, Gam-Derouich S, Mangeney C, Chehimi MM. Aryl diazonium salts: a new class of coupling agents for bonding polymers, biomacromolecules and nanoparticles to surfaces. *Chemical Society Reviews*. 2011;40(7):4143-66.

Titre : Capteurs gravimétriques et électrochimiques et leurs applications dans le domaine de la santé et de l'environnement : défis et solutions

Mots clés : Capteurs chimiques, biocapteurs, transduction gravimétrique, capteurs à ondes acoustiques de surface, transduction électrochimique

Résumé : Les dernières décennies ont vu émerger une forte demande d'outils fiables, ultrasensibles et peu coûteux permettant d'identifier et de doser des analytes (ou une famille d'analytes) dans un milieu complexe. La technologie des capteurs chimiques et biologiques s'est ainsi développée pour accompagner ces besoins et répondre aux exigences sociétales de deux secteurs clés : l'environnement et la santé.

C'est dans ces deux domaines que s'inscrivent mes recherches dédiées à la conception et à la réalisation de capteurs électrochimiques et à ondes acoustiques de surface pour la détection d'espèces biologiques (ADN et protéines) et de divers types de polluants environnementaux (pesticides, ions lourds, etc.).

Les techniques de fonctionnalisation des surfaces des capteurs (impression moléculaire, couches auto-assemblées, adsorption physique) ont été à chaque fois optimisées en fonction de l'analyte à détecter pour s'assurer de la robustesse et de la sélectivité du capteur réalisé. Par ailleurs, et pour s'affranchir de biais expérimentaux, nous avons quasi-systématiquement utilisé une double transduction (électrochimie / gravimétrie ou électrochimie / ELISA).

S'il est indéniable que la technologie des capteurs a beaucoup gagné en maturité, il reste néanmoins plusieurs défis à relever pour que ces outils deviennent LES dispositifs analytiques de choix pour la détection ultra-sensible et spécifique d'espèces chimiques et biologiques dans un milieu donné.

Title : Gravimetric and electrochemical sensors and their applications in health and the environment: challenges and solutions)

Keywords : Chemosensors, biosensors, gravimetric transduction, surface acoustic wave sensors, electrochemical transduction

Abstract : Over the past decades, there has been a sky rocketing demand for reliable, ultra-sensitive and low-cost tools capable to identify and quantify a considered analyte (or a family of analytes) in a complex environment. Chemosensors and biosensors can meet these needs and respond to the strict requirements of two key domains: environment and health.

My research concerns the design of electrochemical and surface acoustic wave sensors for the detection of biological entities (DNA and proteins) and various types of environmental pollutants (pesticides, heavy ions, etc.).

Depending on the analyte to be detected, we have optimized the functionalization technique of the sensors surfaces (molecular printing, self-assembled layers or physical adsorption) to ensure the robustness and selectivity of the designed devices. In addition, and to avoid experimental bias, we have quasi-systematically used a dual transduction (electrochemistry/gravimetry or electrochemistry/ELISA).

While it is indisputable that sensor technology has reached maturity, there are still several challenges to be met before these tools become THE analytical devices of choice for ultrasensitive and specific detection of chemical and biological species.